



Molekulargenetische Charakterisierung der Synthese und Stabilisierung Transgen-induzierter siRNAs in *Paramecium tetraurelia*

Vom Fachbereich Biologie der Technischen Universität Kaiserslautern zur Verleihung des akademischen Grades Doktor der Naturwissenschaften genehmigte

Dissertation

Vorgelegt von

Dipl. Bio. Ulrike Götz

Kaiserslautern, 13.03.2015

Vorsitzender der Prüfungskommission:
Herr Prof. Dr. Dr.-Ing. h.c.* H. Schmidt

Gutachten:
Herr Prof. Dr. J. Cullum
Herr Junior Prof. Dr. M. Simon

D386

*Shonan Institute of Technology, Japan

Inhaltsverzeichnis

I Abbildungsverzeichnis	6
II Tabellenverzeichnis	7
1. Einleitung	8
1.1 RNA-Interferenz (RNAi)	8
1.1.1 Wichtige Komponenten des RNAi-Mechanismus	10
1.1.1.1 Dicer (Dcr).....	10
1.1.1.2 RNA abhängige RNA-Polymerasen (RdRP)	11
1.1.1.3 Argonauten- (Ago) / Piwi-Proteine.....	12
1.2 Stabilisierung von siRNAs durch die 2'-O-Methyltransferase Hen1.....	13
1.3 RNAi-vermitteltes Gensilencing	15
1.3.1 Exogen induziertes Gensilencing.....	17
1.4 <i>Paramecium</i> als Modellorganismus für RNAi.....	17
1.5 Transgen-induziertes Silencing in <i>Paramecium</i>	19
1.6 Zielsetzung dieser Arbeit	20
2. Material und Methoden	22
2.1 Verwendete Stämme.....	22
2.2 Verwendete Nährmedien	22
2.2.1 LB-Medium / LB-Agar	22
2.2.2 WGP (wheat grass powder).....	22
2.2.3 Verwendete Stocklösungen.....	23
2.3 Verwendete Plasmide	23
2.4 Verwendete Antikörper.....	24
2.5 Verwendete Oligonukleotide	24
2.6 Verwendete Kits	26
2.7 Verwendete Größenstandards	26
2.8 Methoden spezifisch für <i>Paramecium</i>	27
2.8.1 Immobilisierung.....	27
2.8.2 Trichozysten-Ausstoß	27
2.8.3 DAPI-Färbung.....	27
2.8.4 dsRNA-Feeding	28
2.8.5 Injektion eines Konstruktes in den Makronukleus von <i>Paramecium</i>	29
2.8.5.1 Vorbereitung der Zellen	30
2.8.5.2 Vorbereitung des Konstruktes.....	30
2.8.5.3 Injektion und Handhabung.....	30

2.9 Methoden spezifisch für <i>E. coli</i>	31
2.9.1 Herstellung elektrokompetenter Zellen	31
2.9.2 Transformation von Bakterien	31
2.9.2.1 Elektroporation	31
2.9.2.2 Hitzeschock.....	32
2.9.3 Isolierung von Plasmiden	32
2.9.4 dsRNA-Isolierung (Gesamt-Nukleinsäuren-Isolierung).....	33
2.10 RNA-chemische Methoden	33
2.10.1 RNA-Isolierung mit Trizol [®]	33
2.10.2 Denaturierendes Agarosegel.....	34
2.10.3 Aufkonzentrieren der RNA	34
2.10.4 Nachweis einer 3' Modifikation (β -Eliminierung)	34
2.10.5 Northernblot der kleinen siRNA-Spezies.....	35
2.10.6 Northernblot von mRNA-Spezies	36
2.10.7 Hybridisieren von Northernblots mit radioaktiv markierten Oligosonden.....	37
2.10.7.1. 5' Markierung mittels ATP [γ - ³² P]	37
2.10.7.2 Markierung mittels dCTP [α - ³² P]	38
2.10.7.3 Waschen der markierten Northernblots.....	38
2.10.7.4 Strippen von Northernblots	38
2.11 DNA-chemische Methoden	38
2.11.1 Agarose-Gelelektrophorese	38
2.11.2 Polymerasen-Kettenreaktion (PCR).....	39
2.11.2.1 Quantitative PCR (real time)	39
2.11.3 Isolierung intakter Chromosomen aus <i>Paramecium</i>	40
2.11.4 Southernblot.....	41
2.12 Protein-chemische Methoden.....	42
2.12.1 Gesamt-Proteinisolierung aus <i>Paramecium</i>	42
2.12.2 Isolierung intakter Nuclei aus <i>Paramecium</i>	43
2.12.3 Natrium-Dodecylsulfat-Elektrophorese (SDS-PAGE)	43
2.12.4 Westernblot.....	45
2.12.5 Dotblot.....	47
2.12.6 Überexpression der Antigene in <i>E. coli</i>	47
2.12.6.1 Aufreinigung der überexprimierten Proteine über Ni/NTA-Beads zur Immunisierung eines Hasen	48
2.12.7 Affinitätsaufreinigung der Antiseren.....	49

2.12.8 Immunfluoreszenzfärbung	50
2.12.8.1 Fixierung von Zellen mit Paraformaldehyd	50
2.12.8.2 Immunmarkierung mit spezifischen Antikörpern	51
2.13 Tiefensequenzierung kleiner RNA-Spezies und deren bioinformatische Analyse	51
2.13.1 Konstruktion von allgemeinen siRNA-Libraries	51
2.13.2 Konstruktion von spezifischen siRNA-Libraries	52
2.13.3 Bioinformatische Auswertung	53
2.13.3.1 Alignments und Aufbereitung der siRNAs	53
2.13.3.2 Normalisierung der Reads	53
3. Ergebnisse	55
3.1 Allgemeine Charakteristika des Transgen-induzierten RNAi-Mechanismus	56
3.1.1 Einfluss der Kopienzahl des Transgens	56
3.1.2 Einfluss der Menge an akkumulierten siRNAs	58
3.1.3 Einfluss der Temperatur auf den Transgen-induzierten RNAi-Mechanismus	60
3.2 Tiefensequenzierung kleiner RNA-Spezies aus transgenen Zelllinien	66
3.2.1 Größenverteilung der Reads	69
3.2.2 Vorkommen von sekundären siRNAs und durch sie vermittelte Transitivität	70
3.3 Methylierung der siRNAs durch die 2'-O-Methyltransferase Hen1	72
3.4 Lokalisation von Hen1	78
3.5 Involvierung weiterer Komponenten in die Akkumulation der siRNAs	89
3.5.1 Rolle der analysierten Komponenten im Transgen-induzierten RNAi-Mechanismus	91
4. Diskussion	101
4.1 Allgemeine Charakteristika des Transgen-induzierten RNAi-Mechanismus	101
4.1.1: Schwellenwert zur Replikation des injizierten Transgens	101
4.1.2: Schwellenwert zum Stilllegen eines Zielgens durch ein injiziertes Transgen	102
4.1.3: Temperaturabhängigkeit des Transgen-induzierten RNAi-Mechanismus	103
4.2 Tiefensequenzierung	106
4.2.1: Größenverteilung der Transgen-induzierten siRNAs	106
4.2.2: Vorkommen sekundärer siRNAs im Transgen-induzierten RNAi-Mechanismus	107
4.2.2.1: Primäre und sekundäre Transgen-induzierte siRNAs: Zusammenhänge und Abhängigkeiten	108
4.2.3: Transitivität	109
4.3 Methylierung der siRNAs durch die 2'-O-Methyltransferase Hen1	110
4.3.1: Aufbau der MTase-Domäne von Hen1 und die Gewinnung eines Antiserums gegen diese MTase-Domäne	111

4.3.2: Lokalisation von Hen1	113
4.4 Involvierung weiterer Komponenten in den Transgen-induzierten RNAi-Mechanismus	116
4.4.1: Die Ptiwis 8, 13 und 14 im Transgen induzierten RNAi-Mechanismus	116
4.4.2: Die RNA abhängige RNA-Polymerasen 2 und 3 und die Nukleotidyltransferase Cid2 im Transgen-induzierten RNAi-Mechanismus	119
4.5: Möglicher Ablauf des Transgen-induzierten RNAi-Mechanismus in <i>Paramecium</i>	122
5. Zusammenfassung	123
6. Abkürzungsverzeichnis	125
7. Literaturverzeichnis	126
8. Anhang	136
8.1 Sequenz des Hen1-Antigens (5' → 3')	136
8.2 Hen1-Homologe aus anderen Organismen	136
8.3 verwendete Software	136
8.4 Expressionsprofile der untersuchten Gene während der Autogamie	137
8.5 Nachweis der sekundären Transgen-induzierten siRNAs mittels Northernblot	138
8.6 p-Werte der Berechnung des Signifikanzniveaus mittels T-Test der qPCR-Daten	139
8.7 Verteilung der Reads der einzelnen Libraries	139
8.8 Liste der Kontaminationssequenzen	140
8.9 Alignment der Sequenzen der in den Northernblot-Analysen verwendeten Vektor-Sonde mit den Vektoren pTI- und L4400	143
8.10 Analyse des letzten Nukleotids am 3' Ende der Transgen-induzierten siRNAs	144
9. Danksagung	145
10. Eidesstattliche Erklärung	146
11. Curriculum vitae	147

I Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der RNA-Interferenz im Allgemeinen.	9
Abbildung 1.2: Schematische Übersicht unterschiedlicher RNAi-Mechanismen in verschiedenen Organismen aus Meister und Tuschl, 2004.	10
Abbildung 1.3: Schematische Darstellung der Domänen unterschiedlicher Dicer Homologe aus verschiedenen Organismen nach Meister und Tuschl, 2004.	11
Abbildung 1.4: Schematische Darstellung der Domänen unterschiedlicher Ago Homologe aus verschiedenen Organismen nach Meister und Tuschl, 2004.	12
Abbildung 1.5: Schematische Übersicht der Proteindomänen von Hen1.	15
Abbildung 2.1: Schematische Darstellung des L4400-Vektors (Kamath <i>et al.</i> , 2000).	29
Abbildung 2.2 : Schematische Darstellung des Aufbaus eines Southernblots.	41
Abbildung 2.3: Schematische Darstellung der bei der Konstruktion der Libraries durchgeführten Schritte des verwendeten Kits von NEB.	52
Abbildung 3.1: Verwendete Transgen-Konstrukte.	55
Abbildung 3.2: Southernblot isolierter intakter Chromosomen verschiedener transgener <i>Paramecium</i> -Zelllinien. I.	57
Abbildung 3.3: Trichozystenausstoß in transgenen Zelllinien.	58
Abbildung 3.4: Northernblot der siRNA-Menge transgener Zelllinien.	59
Abbildung 3.5: Phänotypische Analyse transgener Zelllinien bei verschiedenen Temperaturen.	61
Abbildung 3.6: Northernblot der siRNA-Menge transgener Zelllinien bei verschiedenen Temperaturen.	62
Abbildung 3.7: Northernblot der Transkriptmengen des Transgens.	63
Abbildung 3.8: Fluoreszenzaufnahmen des GFPs transgener pTI- Zelllinien bei verschiedenen Temperaturen.	64
Abbildung 3.9: Relative Expressionslevel der RNAi-Komponenten bei verschiedenen Temperaturen.	65
Abbildung 3.10: Aufreinigungsschritte des Klonierungsverfahrens der siRNA-Libraries.	68
Abbildung 3.11: Northernblot als Kontrolle der siRNA-Libraries, die spezifisch methylierte siRNAs enthalten.	69
Abbildung 3.12: Größenverteilung der sequenzierten Reads.	70
Abbildung 3.13: Verteilung der sequenzierten Reads der pTI-/kleb-Library über die endogene <i>nd169</i> -Sequenz.	71
Abbildung 3.14: Nachweis der Involvierung von Hen1 in den Transgen-induzierten RNAi-Mechanismus.	73
Abbildung 3.15: Nachweis der Methylierung sekundärer Transgen-induzierter siRNAs an Hand der Tiefensequenzierungen.	75
Abbildung 3.16: Verteilung der sequenzierten Reads über die endogene <i>nd169</i> -Sequenz der pTI- <i>hen1</i> -Library (Hen1) im Vergleich zur pTI- <i>icl</i> -Library (ICL).	77
Abbildung 3.17: Analyse der Proteindomänen verschiedener Hen1-Homologe.	79
Abbildung 3.18: Alignment der MTase-Domänen der Hen1-Homologe aus verschiedenen Organismen.	80
Abbildung 3.19: Mit Blue-Silver gefärbtes SDS-Gel des über eine Ni/NTA-Säule aufgereinigten Hen1-Antigens.	81
Abbildung 3.20: Dotblot des Hen1-Antigens.	82
Abbildung 3.21: Westernblot des aufgereinigten Hen1-Antikörpers.	83
Abbildung 3.22: Dotblot der Hen1-Flagtag-Fusionsproteine.	84

Abbildung 3.23: Westernblot der Hen1-Flagtag-Fusionsproteine.	85
Abbildung 3.24: Immunfluoreszenzfärbung der Fusionsproteine.	88
Abbildung 3.25: Prozentualer Anteil der Trichozyten ausstoßenden Zellen der transgenen Kulturen im dsRNA-Feeding.	90
Abbildung 3.26: Northernblot der siRNA-Menge der transgenen Feeding-Kulturen.	91
Abbildung 3.27: Northernblot der β -eliminierten Gesamt-RNA transgener Feeding-Kulturen.	93
Abbildung 3.28: Verteilung der sequenzierten Reads über die endogene <i>nd169</i> -Sequenz der Komponenten Rdr2, Cid2 und Ptiwi 13.	95
Abbildung 3.29: Verteilung der sequenzierten Reads über die endogene <i>nd169</i> -Sequenz der Komponenten Ptiwi 8/14.	97
Abbildung 3.30: Vergleich zwischen methylierten und unmethylierten transgenen siRNAs im Ptiwi 8/14 Silencing.	99
Abbildung 4.1: Schematische Darstellung des Transgen-induzierten RNAi-Mechanismus mit den in dieser Arbeit untersuchten Komponenten.	122
Abbildung 8.1: Expressionsprofile der getesteten Gene während der Autogamie.	137
Abbildung 8.2: Northernblot zum Nachweis sekundärer <i>nd169</i> spezifischer siRNAs.	138
Abbildung 8.3: Auszug aus den Alignments der Sequenz der Vektor-Sonde mit der Sequenz im Vektorbereich des Transgens pTI- (A) und dem dsRNA-Feeding-Vektor L4400 (B).	143
Abbildung 8.4: Analyse des 3' Endes der siRNAs in den Sequenzierungen der pTI- <i>icl</i> -Library (ICL) sowie der pTI- <i>hen1</i> -Library (Hen1).	144

II Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1: Argonauten-Proteine und deren Verteilung in diversen Organismen.	13
Tabelle 2.1: Verwendete Stocklösungen.	23
Tabelle 2.2: Verwendete Plasmide.	24
Tabelle 2.3: Verwendete Antikörper.	24
Tabelle 2.4: Verwendete Oligonukleotide.	25
Tabelle 2.5: Verwendete Kits.	26
Tabelle 2.6: Verwendete Größenstandards.	27
Tabelle 2.7: Für das Feeding verwendete Genfragmente.	29
Tabelle 2.8: Gelansätze der Natrium-Dodecylsulfat-Elektrophorese.	44
Tabelle 8.1: Hen1-Homologe und deren Bezeichnung aus verschiedenen Organismen.	136
Tabelle 8.2: p-Werte der Berechnung des Signifikanzniveaus mittels T-Test der qPCR-Daten.	139
Tabelle 8.3: Verteilung der Reads der einzelnen Libraries.	139
Tabelle 8.4: Liste der Kontaminationssequenzen.	140

1. Einleitung

1.1 RNA-Interferenz (RNAi)

RNAi beschreibt einen Mechanismus, der in Eukaryoten weit verbreitet ist und dessen charakteristisches Merkmal kleine regulatorische RNAs sind. Diese regulatorischen RNAs werden meist aus längeren doppelsträngigen RNAs (dsRNA) geschnitten bzw. synthetisiert und markieren Homologie vermittelt, komplementäre messenger RNAs (mRNA) und führen so zu deren Abbau. Durch diesen Mechanismus können Gene reguliert und stillgelegt werden. Zuerst wurde dieses Phänomen in Petunien (*Petunia hybrida*) beschrieben. Hier wurden zusätzliche Kopien eines Gens, welches für die Blütenfarbe kodiert, in die Pflanzen eingebracht um neue Farbvarianten zu generieren. Diese zusätzlichen Genkopien führten jedoch zu einem post-transkriptionellen Gen silencing (PTGS) des endogenen Gens und deshalb zu fast farblosen Blüten (Napoli *et al.*, 1990). Wenig später beschrieben A. Fire und Kollegen die Rolle von dsRNA in der RNAi-Maschinerie in *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) (Fire *et al.*, 1998). Sie konnten mit ihren Versuchen zeigen, dass eine doppelsträngige RNA den Abbau einer homologen messenger RNA viel effizienter triggert als die jeweiligen Einzelstränge. Heute weiß man, dass RNAi ein weit verbreitetes Instrument ist um sowohl exogene RNAs wie z.B. virale RNA oder Retro-Transposons (Girard und Hannon, 2007) unschädlich zu machen, als auch um die Expression endogener Gene zu regulieren. Neben dem PTGS gibt es auch den Weg des transkriptionellen silencings (TGS). Hierbei werden die regulatorischen RNAs nicht zu einer mRNA geleitet und deren Abbau vermittelt, sondern binden direkt an das Chromatin oder an naszierende Transkripte davon und rekrutieren modifizierende Enzyme. Diese können verschiedene Modifizierungen, wie z.B. Methylierungen oder Acetylierungen setzen, die das Chromatin in seinem Zustand halten oder ändern. So vermittelt z.B. eine Trimethylierung des neunten Lysins am Histon 3 (H3K9me3) eine dichtere Packung des Chromatins und daher begünstigt solch eine Modifikation eher den Zustand von Heterochromatin (Le Thomas *et al.*, 2013). Wohingegen eine Acetylierung bestimmter Regionen, wie z.B. die Promotorregion oder das 5' Ende des kodierenden Bereichs eher den Zustand des transkriptionell aktiven Euchromatins begünstigt (Kouzarides, 2007).

RNAi ist ein komplexer Mechanismus (Abbildung 1.1) bei dem mehrere Komponenten eine wichtige Rolle spielen. Zu den Kernkomponenten zählen Dicer, RNA abhängige RNA-Polymerasen (RdRP) und Argonauten bzw. Piwi-Proteine (vgl. Kapitel 1.1.1). Dicer sind in die initiale Synthese von doppelsträngigen regulatorischen RNAs, die sogenannten primären RNAs involviert (Bernstein *et al.*, 2001). Die RdRPs sind dagegen in die Amplifizierung der von den Dicer synthetisierten RNAs involviert. Sie generieren eine andere Klasse an regulatorischen RNAs, die sogenannten sekundären RNAs. Beide Klassen an regulatorischen RNAs werden jedoch anschließend durch das Binden an ein Argonauten-Protein stabilisiert und zum Zielort in der Zelle gebracht, wo sie an homologe Stellen binden und somit eine Reaktion in der Zelle hervorrufen können (Buck und Blaxter, 2013; Naqvi *et al.*, 2009).

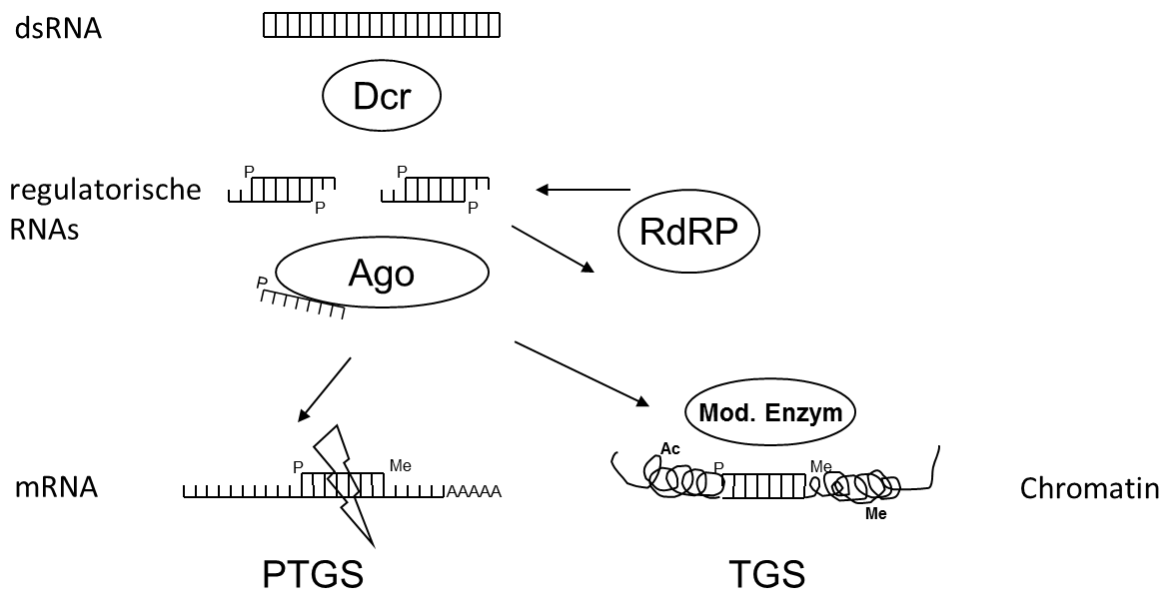


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der RNA-Interferenz im Allgemeinen. Eine doppelsträngige RNA wird von einem Dicer-Enzym (Dcr) zu 21-23 nt großen regulatorischen RNAs geschnitten, die an den jeweiligen Enden des Duplexes einen Überhang von 2 nt aufweisen (Bernstein *et al.*, 2001). Der guide-Strang des siRNA-Duplexes wird an ein Argonauten-Protein (Ago) gebunden. RNA abhängige RNA-Polymerasen (RdRP) können weitere regulatorische RNAs synthetisieren, indem sie den passender-Strang des primären siRNA-Duplexes gebunden an eine RNA als Template nutzen. Der vom Ago gebundene guide-Strang kann Homologie abhängig entweder eine mRNA zur Degradation (PTGS) oder modifizierende Enzyme (mod. Enzym) zum Chromatin rekrutieren und dessen Zustand so beeinflussen (TGS).

RNAi-Mechanismen sind in den meisten Eukaryoten hoch konserviert. Die initiale Doppelstrang-RNA kann jedoch unterschiedlichen Ursprungs sein. So können einfache Doppelstränge aber auch Hairpin-Konstrukte als Trigger dienen um zu kleinen RNAs prozessiert zu werden. Dabei entstehen verschiedene regulatorische RNA-Spezies, die wiederum verschiedene RNAi-vermittelte Reaktionen in der Zelle, wie z.B. das TGS, das PTGS aber auch eine Repression der Translation bewirken können (Meister und Tuschl, 2004). Eine Übersicht aus diesem Review ist in Abbildung 1.2 dargestellt.

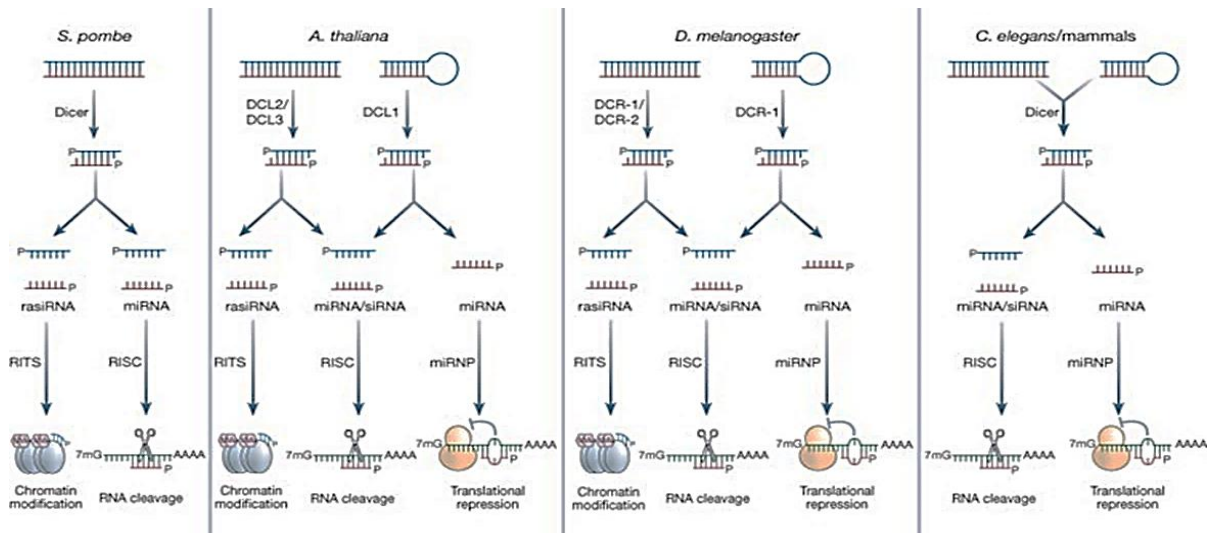


Abbildung 1.2: Schematische Übersicht unterschiedlicher RNAi-Mechanismen in verschiedenen Organismen aus Meister und Tuschl, 2004. Dargestellt sind RNAi-Wege aus *Schizosaccharomyces pombe* (*S. pombe*), *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*), *Drosophila melanogaster* (*D. melanogaster*) und *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*). Als initialer Trigger werden Doppelstränge und Hairpin-Konstrukte beschrieben, die vermittelt durch verschiedene Dicer unterschiedliche Klassen an siRNAs, wie z.B. si- (short interfering), mi- (micro) oder rasiRNAs (repeat associated siRNAs) synthetisieren. Diese vermitteln die entsprechende Reaktion in der Zelle wie z.B. die Degradation einer mRNA, die Repression der Translation oder die Modifizierung von Chromatin.

1.1.1 Wichtige Komponenten des RNAi-Mechanismus

1.1.1.1 Dicer (Dcr)

Dicer-Enzyme (Dcr) oder Dicer-like-Proteine (Dcl) sind Endoribonukleasen des Typs III. Sie weisen eine Vielzahl an verschiedenen Domänen auf (vgl. Abbildung 1.3), mit Hilfe derer sie RNA erkennen, binden und zu kleinen RNA-Spezies prozessieren können (Naqvi *et al.*, 2009; Meister und Tuschl, 2004). Dabei erkennen Dicer ausschließlich lange doppelsträngige RNAs und schneiden sie zu kleinen doppelsträngigen RNAs, deren Länge durch den Abstand der RNase III-Domänen festgelegt wird. So weisen z.B. siRNAs eine Länge von 18-26 nt auf und tragen einen charakteristischen 2 nt langen Überhang am 3' Ende (Bernstein *et al.*, 2001). Bernstein und Kollegen haben bei Studien an Zellextrakten aus *Drosophila* zuerst entdeckt, dass die initiale Synthese der siRNAs von anderen Proteinen vermittelt wird, als die RNAi-vermittelte Degradation einer mRNA (Bernstein *et al.*, 2001). Nachdem jedoch bekannt war, dass das initiale Enzym eine Ribonuklease sein musste, die spezifisch für doppelsträngige RNAs ist, überprüfte die Arbeitsgruppe um Bernstein sämtliche bekannten Enzyme dieser Art und entdeckte, dass nur die Endoribonukleasen des Typs III die für *Drosophila* charakteristische Länge an 21-23 nt siRNAs synthetisiert und gaben diesem Enzym den Namen Dicer (Bernstein *et al.*, 2001). Danach wurden auch für andere Organismen Dicer-Enzyme beschrieben, die solch eine Aktivität beschrieben (Sontheimer, 2005). Da Dicer in die initiale Synthese der siRNAs involviert sind, sind sie essentiell für die RNAi-Maschinerie (Fukagawa *et al.*, 2004; Elbashir *et al.*, 2001).

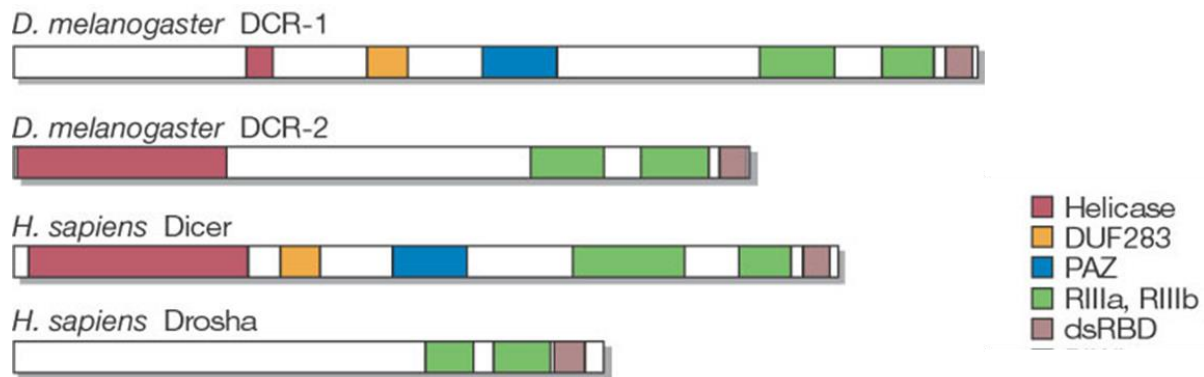


Abbildung 1.3: Schematische Darstellung der Domänen unterschiedlicher Dicer Homologe aus verschiedenen Organismen nach Meister und Tuschl, 2004. Über die dsRBD-Domäne (Doppelstrang-RNA-Bindedomäne; braun) kann doppelsträngige RNA erkannt und gebunden werden. Die zwei RNase III-Domänen (grün) prozessieren das Template zu kleinen regulatorischen RNAs. Die PAZ-Domäne (blau) interagiert mit dem 3' Ende der gebundenen RNA. Die genaue Funktion der DUF 283-Domäne (gelb) ist ungeklärt. Die Helikase-Domäne (rot) kann Nucleinsäuren entwinden und Proteininteraktionen lösen und somit dem Enzym den Zugang zur dsRNA ermöglichen.

1.1.1.2 RNA abhängige RNA-Polymerasen (RdRP)

RdRPs sind Polymerasen, die RNA als Template benutzen um RNA zu synthetisieren. In RNAi-Mechanismen tragen sie dazu bei, dass immer neue kleine regulatorische RNAs, die zum Silencing des Zielgens führen, synthetisiert werden. Diese sekundären regulatorischen RNAs sind somit für die Amplifizierung des Signals und damit für die Verstärkung des Phänotyps notwendig. Ob RdRPs jedoch ein einzelnes langes Transkript synthetisieren, das anschließend zu einzelsträngigen regulatorischen RNAs gespalten wird, oder ob sie *de novo* kleine RNAs synthetisieren, konnte bis jetzt nicht eindeutig geklärt werden und hängt von der einzelnen RdRP ab.

Die ersten Beschreibungen beruhen auf Beobachtungen bei Augenbohnen, die mit einem Mosaicvirus infiziert waren. Hier konnte beobachtet werden, dass die RdRPs der Pflanzen verstärkt exprimiert wurden (Zabel *et al.*, 1974). Daraus schloss man, dass die pflanzeigenen RdRPs vom Virus benutzt werden um die virale RNA abzulesen. Heute weiß man, dass die RdRPs der Pflanze stark exprimiert werden um siRNAs zu synthetisieren, die die virale RNA stilllegen und die Pflanze somit gegen den Virus schützen.

Allen eukaryotischen RdRPs ist eine C-terminale RdRP-Domäne gleich, die meist ein DLDGD-Motiv enthält. Das Leucin an zweiter Stelle des Motivs kann jedoch auch durch andere Aminosäuren ersetzt werden. Allerdings ist das nur für wenige Ausnahmen beschrieben (Wassenegger *et al.*, 2006). Das terminale Aspartat dieses Motivs wurde als essentiell für die Aktivität einiger RdRPs *in vitro* beschrieben (Wassenegger *et al.*, 2006). Es bleibt jedoch zu erwähnen, dass nicht in jedem RNAi-Mechanismus zwingend RdRPs vorkommen müssen. Bei Säugern konnten bis jetzt keine RdRPs nachgewiesen werden.

Transitivität ist ein Phänomen, das bei RNAi-Mechanismen von einer RdRP-Aktivität und damit von der Bildung sekundärer siRNAs abhängt. Transitivität beschreibt folglich das Vorkommen von sekundären siRNAs und die Ausbreitung des damit verbundenen Phänotyps über das ursprüngliche Triggermolekül hinaus. Die gebildeten sekundären siRNAs bewirken nicht nur ein Silencing des Zielgens, sondern bewirken auch das Stilllegen unmittelbar benachbarter Regionen (Vazquez und Hohn, 2012). Dabei werden die sekundären siRNAs vorzugsweise von RNAs gebildet, die ursprünglich das Ziel von primären siRNAs waren (Cuperus *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2010). In *Arabidopsis* wurde die Synthese der sekundären transitiven siRNAs ausführlich untersucht und beschrieben. Es konnte

gezeigt werden, dass zunächst 22 nt lange primäre kleine RNAs (small RNAs, sRNAs) an Ago1 gebunden werden und das Schneiden einer homologen mRNA mit Hilfe der Slicer-Aktivität von Ago1 vermitteln (Cuperus *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2010). Das Binden einer 22 nt langen miRNA an Ago1 induziert zudem eine Konformationsänderung des Ago1, was die Rekrutierung der RNA-abhängigen RNA-Polymerase 6 (RdR6) und einem weiteren Protein SGS3 vermittelt (Manavella *et al.*, 2012). Die genaue Funktion von SGS3 ist nicht vollständig aufgeklärt, jedoch konnte belegt werden, dass dieses Protein die von Ago1 geschnittenen Hälften der mRNA stabilisiert und vor Abbau schützt (Yoshikawa *et al.*, 2005). Die von Ago1 geschnittene Hälfte der mRNA, die das 5' Ende enthält, wird von RdR6 und SGS3 zu einem Doppelstrang umgesetzt, welcher anschließend von einem Dicer-like Protein, dem Dcl4, zu sekundären sogenannten tasiRNAs (trans-acting small interfering RNA) geschnitten wird, welche dann weitere RNAs zur Degradation markieren (Manavella *et al.*, 2012; Yoshikawa, 2013). Durch eine solche Transitivität können Stilllegungs-Kaskaden in Gang gebracht werden, bei denen das Stilllegen von einem Locus ausgehend auf angrenzende Regionen überspringt (Vermeersch *et al.*, 2010).

Für Pflanzen wurde ein weiteres Phänomen entdeckt, das von einer RNA-abhängigen RNA-Polymerase und deren gebildeten sekundären siRNAs abhängt und als „Spreading“ bezeichnet wird. Es beschreibt das systemische Verbreiten von sekundären siRNAs von Zelle zu Zelle und über das Phloem durch die ganze Pflanze (Dunoyer *et al.*, 2010; Molnar *et al.*, 2010; Liang *et al.*, 2012).

1.1.1.3 Argonauten- (Ago) / Piwi-Proteine

Argonauten (Ago) sind Proteine, die über ihre PAZ-Domäne („PIWI-Argonaut-Zwille-Domäne“) kleine RNA-Spezies binden und zu einem Zielort in der Zelle leiten können (Naqvi *et al.*, 2009). Zudem besitzen sie eine PIWI-Domäne („P element-induced wimpy testis-Domäne“), welche auch eine Endonukleaseaktivität besitzen kann (vgl. Abbildung 1.4). Einige Proteine dieser Klasse sind dadurch in der Lage, die gebundene RNA zu spalten. Dies wird auch als Slicing-Aktivität bezeichnet (Gunawardane *et al.*, 2007).

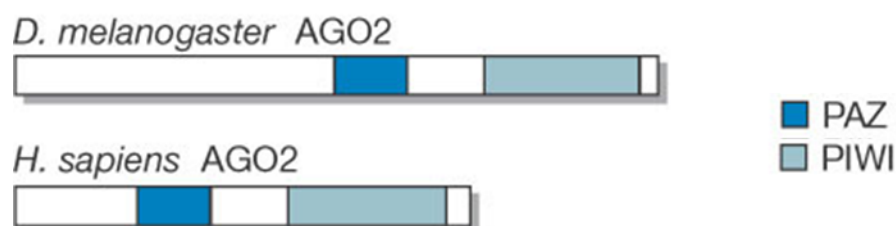


Abbildung 1.4: Schematische Darstellung der Domänen unterschiedlicher Ago Homologe aus verschiedenen Organismen nach Meister und Tuschl, 2004. Die PAZ-Domäne (dunkelblau) ist eine konservierte Domäne in allen bekannten Ago/Piwi-Proteinen. Ihre Funktion ist das Binden der RNA-Spezies. Die PIWI-Domäne (hellblau) beinhaltet einen RNase H ähnlichen Abschnitt, durch welchen die Sliceraktivität einiger Piwis zustande kommt. Zudem vermittelt diese Domäne die dsRNA-vermittelte Hydrolyse von kleinen einzelsträngigen RNAs.

Die Piwi-Proteine bilden eine Unterklasse innerhalb der Argonauten Familie. Argonauten und Piwis sind sowohl in Pflanzen als auch in Tieren hoch konserviert, jedoch besitzt jeder Organismus eine unterschiedliche Anzahl von ihnen (vgl. Tabelle 1.1).

Tabelle 1.1: Argonauten-Proteine und deren Verteilung in diversen Organismen. Aufgeführt sind die Organismen, die Klasse der Proteine mit der Anzahl, der bisher beschriebenen Vertreter und die Quelle der Angabe.

Organismus	Argonauten	Piwis	Quelle
<i>Paramecium tatraurelia</i>	-	15 (+3)	Bouhouche <i>et al.</i> , 2011
<i>Tetrahymena thermophila</i>	-	12	Couvillion <i>et al.</i> , 2009
<i>Drosophila melanogaster</i>	3	2	Williams und Rubin, 2002
<i>Arabidopsis thaliana</i>	10	-	Hunter <i>et al.</i> , 2003
<i>Cenorhabditis elegans</i>	18(Wago) 5 (Ago)	3	Faehnle <i>et al.</i> , 2007 Montgomery <i>et al.</i> , 2012
<i>Homo sapiens</i>	4	4	Sasaki <i>et al.</i> , 2003

Durch ihre Fähigkeit RNA-Spezies zu binden und zu transportieren, ist diese Klasse an Proteinen ein wichtiger Faktor in der Regulation von Genen, da sie sowohl transkriptionelles als auch post-transkriptionelles Silencing vermitteln können. Zudem stellen die Argonauten eine wichtige Komponente des sogenannten RISC-Komplexes (RNA induced silencing complex) bei RNAi-Mechanismen dar.

Argonauten werden meist konstitutiv exprimiert, während Piwis oftmals auf die Keimbahnen beschränkt, exprimiert werden. Dort wurden sie auch zuerst bei Untersuchungen der Keimzellen von *Drosophila* beschrieben (Höck *et al.*, 2008).

1.2 Stabilisierung von siRNAs durch die 2'-O-Methyltransferase Hen1

Das Enzym Hua Enhancer (Hen1) wurde zuerst in *A. thaliana* entdeckt und beschrieben, als die Gruppe um Chen Entwicklungsstudien der Blüte durchgeführt hatten (Chen *et al.*, 2002). Sie untersuchten den Phänotyp des Blütenstandes in *hua1-1* und *hua1-2* Doppelmутanten, wobei sie feststellten, dass die Blüte später begann und die Pflanzen unförmige Blütenstände aufwiesen, die zur Unfruchtbarkeit der Pflanze führten (Chen *et al.*, 2002). Dieser Phänotyp konnte später darauf zurückgeführt werden, dass die für die Regulierung dieser Phänotypen wichtigen kleinen RNAs in den Hen-Mutanten stark reduziert waren und ihre Aufgabe somit nicht mehr ausführen konnten. In einer weiteren Studie wurden miRNAs aus *Arabidopsis* genauer charakterisiert und dabei entdeckt, dass diese eine Methylgruppe an ihrem 3' Ende tragen (Yu *et al.*, 2005). Im Laufe der Studie konnte gezeigt werden, dass diese Methylgruppe von Hen1 am 2'-OH der Ribose des letzten Nukleotids angehängt wird (Yu *et al.*, 2005). Zudem konnte hier gezeigt werden, dass in Hen1-Mutanten, die Größe der miRNAs stark variiert und die detektierbare Menge an miRNAs erheblich abnimmt (Yu *et al.*, 2005). Die Variabilität der Größe der miRNAs beruht auf dem Anhängen eines poly-U-Schwanzes, wie von Ji und Chen später beschrieben wurde (Ji und Chen, 2012). Diese Polyuridylierung ist vermutlich eine Markierung für die Zelle, die miRNA abzubauen. Somit stellt die Methylierung kleiner RNA-Spezies in *A. thaliana* einen Schutz gegen die Polyuridylierung und den daraus resultierenden 3'-5' Abbau durch Nukleasen dar (Ji und Chen, 2012). Durch Studien an Hen1-Mutanten konnte belegt werden, dass die Methylierung einer RNA-Spezies diese vor dem Anhängen zusätzlicher Nukleotide, die schließlich als Markierung für die Degradation gilt, schützt (Yu *et al.*, 2005; Li *et al.*,

2005; Kurth und Mochizuki, 2009). Das Methylieren einer RNA-Spezies dient also der selektiven Stabilisierung dieser und ist eine weit verbreitete Modifikation (Huang, 2012).

Eine Methylierung kleiner RNA-Spezies wurde auch in tierischen Organismen wie *Drosophila* oder der *Maus* beschrieben (Saito *et al.*, 2007; Horwich *et al.*, 2007) und auch hier wurden Hen1 und seine Homologe als die Enzyme beschrieben, welche für die Methylierung verantwortlich sind. Allerdings unterscheiden sich tierische und pflanzliche Hen1-Homologe voneinander. Als die Gruppe um Mui Chan die biochemischen Eigenschaften und die Struktur von Hen1-Homologen genauer untersuchten, konnten sie ebenfalls pflanzliche und tierische Hen1-Homologe unterscheiden (Mui Chan *et al.*, 2009). Sie erkannten, dass pflanzliche Hen1-Homologe relativ große Proteine sind, die aus ca. 940 Aminosäuren aufgebaut sind und deren MTase-Domäne am C-terminalen Ende dieser Aminosäuresequenz liegt. Sie konnten zudem in *in vitro* Versuchen zeigen, dass pflanzliche Hen1-Homologe ausschließlich doppelsträngige RNAs einer Größe von 21-24 nt methylieren, die einem klassischen Dicerschnitt zufolge einen 2 nt langen Überhang an ihrem 3' Ende aufweisen (Mui Chan *et al.*, 2009). Tierische Hen1-Homologe dagegen sind mit 340 Aminosäuren gerade einmal halb so groß wie die pflanzlichen und die MTase-Domäne der tierischen Vertreter liegt am N-terminalen Ende des Proteins. Zudem zeigte sich hier, dass Hen1-Homologe tierischen Ursprungs ausschließlich in der Lage sind einzelsträngige RNA-Spezies zu methylieren, wie sie z.B. durch die Slicer-Aktivität von Piwi-Proteinen zustande kommen, nicht jedoch doppelsträngige Dicer generierte RNA-Spezies (Mui Chan *et al.*, 2009). Allerdings könnte auch nur ein Strang der doppelsträngigen Dicer-generierten RNAs stabilisiert und anschließend methyliert werden (Kawamata *et al.*, 2010; Tomari *et al.*, 2004; Schwarz *et al.*, 2003; Khvorova *et al.*, 2003).

Eine Klassifizierung der Hen1-Homologe aus verschiedenen Organismen wurde auch von Raven H. Huang beschrieben. Huang hat phylogenetische Studien mit Hen1-Sequenzen durchgeführt und dabei, wie Mui Chan und seine Kollegen, herausgefunden, dass die meisten der untersuchten Hen1-Homologe in drei großen Gruppen clustern (Huang, 2012). Gruppe 1 besteht aus 18 Vertretern der Viridiplantae. Dieses Cluster zeichnet sich durch die Größe der Hen1-Proteine aus. Sie weisen alle eine Größe von 810-970 Aminosäuren auf und tragen die MTase-Domäne an ihrem C-terminalen Ende (Huang, 2012). Dies bestätigt die Ergebnisse von Mui Chan und seinen Kollegen. Die zweite Gruppe besteht aus 65 analysierten Aminosäuresequenzen der Metazoa, 14 Sequenzen von Pilzen, vier der Euglenozoa und zwei Sequenzen der Alveolata. All diesen untersuchten Aminosäuresequenzen ist im Vergleich zu den pflanzlichen gemein, dass sie die MTase-Domäne dagegen am N-terminalen Ende tragen (Huang, 2012). Dies stimmt ebenfalls mit der Studie von Mui Chan und seinen Kollegen überein. Eine Übersicht des Aufbaus der Homologe von einzelnen Vertretern ist an Abbildung 1.5 dargestellt. Das dritte große Cluster der Studie von Huang beinhaltet Aminosäuresequenzen der bakteriellen Hen1-Homologe (Huang, 2012). Das bakterielle Hen1 ist in die Reparatur von RNA-Schäden involviert. Es interagiert direkt mit einer Polynukleotidkinase (PnK) und methyliert reparierte RNA-Spezies um diese so vor Abbau zu schützen (Huang, 2012).

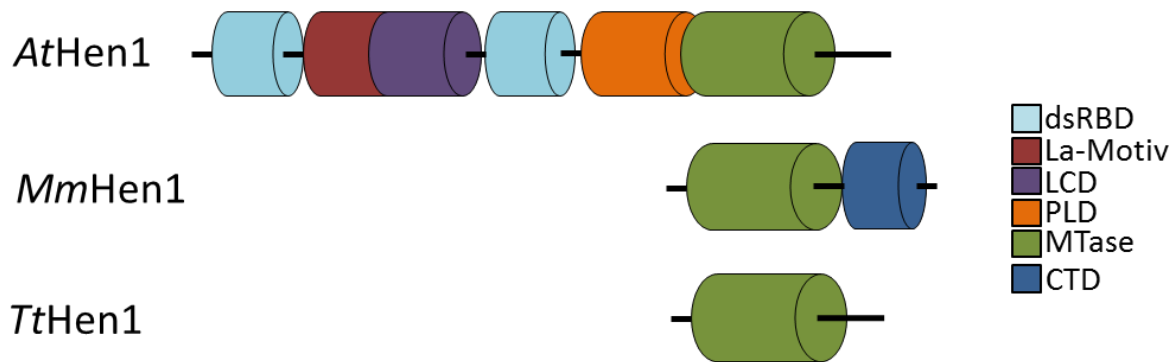


Abbildung 1.5: Schematische Übersicht der Proteindomänen von Hen1. Vergleichend sind hier die Domänen eines pflanzlichen Vertreters *A. thaliana*, und zwei Vertreter der Tiere *M. musculus* und *T. thermophila*. Die MTase-Domäne (grün) transferiert Magnesiumabhängig eine Methylgruppe auf die zu modifizierende RNA-Spezies, die bei Pflanzen durch die dsRBD-Domäne (hellblau) gebunden wird. Die La-containing-Domain (lila) beinhaltet ein La-Motiv (rot), das spezifisch an Transkripte der RNAPol III bindet. Die Funktion der PLD-Domäne (orange) ist nicht eindeutig geklärt. Die C-terminale-Domäne (dunkelblau) stellt eine Proteinbindedomäne dar.

Allen Hen1-Proteinen ist jedoch die MTase-Domäne gemein, die in allen untersuchten Organismen eine Methylgruppe an das 2'-OH-Ende der Ribose des letzten Nukleotids am 3' Ende einer RNA anhängt. Diese Reaktion ist abhängig von Magnesium und hoch konserviert (Huang *et al.*, 2009).

Ein weiteres Merkmal zur Unterscheidung von tierischen und pflanzlichen Hen1-Homologen ist deren assoziierte Funktion. Hen1 überträgt in beiden zwar eine Methylgruppe an RNA-Spezies, bei den tierischen Vertretern ist dies jedoch meist nur auf RNA-Spezies der Keimbahn beschränkt. In *Drosophila* methyliert Hen1 piRNAs (Piwi interacting RNAs), die während der Synthese der Keimzellen wichtig sind um repetitive oder transposable Elemente für deren anschließende Eliminierung zu markieren (Horwich *et al.*, 2007). Für *C. elegans* wurde beschrieben, dass das Hen1-Homolog Henn-1 ebenfalls spezifisch kleine RNA-Klassen der Keimbahn methyliert. Auch hier sind es piRNAs, die notwendig dafür sind, die Integrität der RNA zu wahren (Billi *et al.*, 2012). Dies wurde ebenso für das Hen1-Homolog aus dem Zebrafisch (Kamminga *et al.*, 2010) beschrieben, wobei Hen1 mit der Keimbahn spezifischen Struktur „Nuage“ assoziiert ist. Für die Maus *M. musculus* wurde beschrieben, dass die Keimbahn-assoziierten piRNAs in den Hoden ebenfalls durch ein entsprechendes Hen1-Homolog methyliert sind (Kirino *et al.*, 2007 a, b und c). Auch für *Tetrahymena* wurde Ähnliches beschrieben (Kurth und Mochizuki, 2009). Da es sich hier um einen einzelligen Organismus handelt, befinden sich Keimbahn und Soma innerhalb einer Zelle nahe beieinander, sind aber trotzdem räumlich getrennt. Die Funktion der piRNAs wird hier von sogenannten scanner RNAs (scnRNAs) übernommen, welche ebenfalls durch ein Hen1-Homolog methyliert werden (Kurth und Mochizuki, 2009). Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass die tierischen Hen1-Homologe mit der Keimbahn assoziiert sind und die dabei involvierten Klassen an kleinen RNAs durch das Anhängen einer Methylgruppe spezifisch stabilisieren.

1.3 RNAi-vermitteltes Gensilencing

RNAi-vermitteltes Gensilencing übersetzt die Sequenzinformation einer langen doppelsträngigen RNA in kleine ca. 21 – 23 nt lange Signalmoleküle, wie zum Beispiel short interfering RNAs (siRNAs) oder microRNAs (miRNAs). Beide Klassen an regulatorischen RNAs werden von Effektor-Komplexen gebunden und bewirken die Repression der Translation einer mRNA oder deren Abbau, sowie die Ausbildung von Heterochromatin (Tomari und Zamore, 2005). Auch wenn die Biosynthese beider RNA-Klassen unterschiedlich ist, stimulieren sie dieselben Reaktionen. Beide Klassen können die Degradation einer mRNA und deren Repression der Translation verursachen, indem die si-/miRNA

über Homologie an die Sequenz einer mRNA bindet und dabei den „RNA-induced silencing complex“ (RISC) an den sie gebunden ist und seine Effektorproteine zur mRNA leitet und die Reaktion vermittelt (Tomari und Zamore, 2005; Naqvi *et al.*, 2009). Dies entspricht dem post-transkriptionalen Gensilencing (PTGS).

MicroRNAs werden z.B. Dicer-abhängig aus Hairpinstrukturen geschnitten, die von einer RNA-Polymerase II synthetisiert wurden. Solche Hairpinstrukturen können aber auch durch die Transkription inverser Repeats entstehen und ebenfalls als Triggermolekül für die Synthese von miRNA dienen (Tomari und Zamore, 2005; Naqvi *et al.*, 2009). Die Bindung von miRNAs an eine mRNA muss nicht zu 100 % homolog sein. Eine Bindung mit mismatches initialisiert eine andere Reaktion in der Zelle als eine 100 %ige. Bindet eine miRNA vollständig komplementär an eine mRNA, so wird diese zur Degradation markiert (Llave *et al.*, 2002; Xie *et al.*, 2003; Zeng und Cullen, 2003; Yekta *et al.*, 2004). Bindet die miRNA dagegen mit mismatches, wird nur die Translation der mRNA verhindert (Olsen und Ambros, 1999; Chen, 2004; Doench und Sharp, 2004).

siRNAs können auch eine Degradation einer homologen mRNA in der Zelle auslösen, sie können jedoch zusätzlich die Bildung von Heterochromatin bewirken (Hall *et al.*, 2002; Mochizuki *et al.*, 2002; Volpe *et al.*, 2002; Verdell *et al.*, 2004). siRNAs werden aus langen doppelsträngigen RNAs von einem Dicer geschnitten, allerdings weisen diese dsRNA-Moleküle keinen Hairpin auf. Solche Doppelstränge werden z.B. durch eine bidirektionale Transkription eines Gens oder durch die Aktivität einer RdRP synthetisiert. Um den Abbau einer mRNA zu bewirken, werden die siRNAs in den RISC geladen und zu einer homologen mRNA gebracht. Wird dagegen die Ausbildung von Heterochromatin stimuliert, wird die siRNA in den „RNA-induced transkriptional silencing complex“ (RITS) geladen und zu homologen Stellen am Chromatin geleitet. Dabei rekrutieren die im RITS gebundenen Effektorproteine sogenannte „reader“ und „writer“ zum Chromatin. Dies sind modifizierende Enzyme wie z. B. Histon-Deacetylasen oder Histon-Methylasen. Diese setzen ihre Modifikation jeweils an bestimmte Aminosäuren um eine Formierung von Heterochromatin zu bewirken. Dabei spielt z.B. die Trimethylierung des neunten Lysins am Histon 3 (H3K9-me³) eine wichtige Rolle (Elgin und Grewal, 2003). Die durch den RITS vermittelte Ausbildung von Heterochromatin entspricht dem transkriptionellen Gensilencing (TGS). Am besten untersucht ist dieser Mechanismus in *Schizosaccharomyces pombe*. In *S. pombe* sind alle Komponenten der RNAi-Maschinerie nur einmal als single copy Gene vertreten und lassen sich somit gut untersuchen (Verdell *et al.*, 2009). Die siRNAs werden in *S. pombe* von Dcr1 geschnitten und in den RITS-Komplex geladen, welcher aus dem Argonauten-Protein Ago1, dem Chromodomänen-Protein Chp1 und Tas3, einem neuen Protein, das wichtig ist um den Komplex zum Chromatin zu leiten, besteht (Verdell *et al.*, 2004). Über diesen RITS wird in *S. pombe* die Heterochromatinbildung am Zentromer und in subtelomeren Bereichen vermittelt (Verdell *et al.*, 2009). Allerdings braucht der RITS-Komplex für die Bildung von neuem Heterochromatin bereits vorhandene H3K9-me Modifikationen um sich daran zu verankern und kann deshalb nur in unmittelbarer Nähe von bereits bestehendem Heterochromatin agieren (Bühler *et al.*, 2006). Zusätzlich kann die im RITS gebundene siRNA die Heterochromatinformierung nur einleiten, wenn sie komplementär an RNA binden kann. Dazu ist es also notwendig, dass das eigentlich stille Heterochromatin durch die RNA-Polymerase II zu naszierenden Transkripten abgelesen wird, an welche dann die siRNA binden kann (Motamedi *et al.*, 2004; Verdell und Moazed, 2005). Unter bestimmten Bedingungen kann jedoch auch Heterochromatin *de novo* ohne die Verbindung zu einer H3K9-me durch den RITS-Komplex in *S. pombe* ausgebildet werden, allerdings entspricht dies eher der Ausnahme (Bühler *et al.*, 2006).

1.3.1 Exogen induziertes Gensilencing

In den meisten Organismen können die Mechanismen des PTGS und des TGS durch das Einbringen artifiziiell synthetisierter dsRNA induziert werden (Fire *et al.*, 1998; Mello und Conte, 2004). Dabei werden von der Zelle kleine regulatorische RNAs gegen die eingebrachte dsRNA gebildet um diese still zu legen. Ist die eingebrachte dsRNA homolog zu einer endogenen Gensequenz, sind die gebildeten kleinen regulatorischen RNAs auch zu diesem endogenen Gen komplementär und könnten dieses ebenfalls stilllegen. Die gebildeten kleinen regulatorischen RNAs wirken folglich in *trans*, da sie von der eingebrachten dsRNA gebildet werden und diese stilllegen, aber zusätzlich auch das homologe endogen Gen silencen (Kennerdell und Carthew, 2000; Paddinson *et al.*, 2002; Tavernarakis *et al.*, 2000). Die dsRNA kann über verschiedene Wege in den Organismus eingebracht werden. Für Planarien wurde beschrieben, dass sie durch das Baden in einer mit dsRNA angereicherten Lösung, die dsRNA aufnehmen und somit RNAi-Mechanismen ausgelöst werden können (Orii *et al.*, 2003). Das Verfüttern von Bakterien, die die dsRNA artifiziiell synthetisieren und anreichern wurde von Timmons und ihren Kollegen zuerst in *C. elegans* etabliert (Timmons und Fire, 1998; Timmons *et al.*, 2001), bevor es mittlerweile auch für andere bakterivore Organismen, wie z.B. das *Paramecium*, angewendet wird. Der Mechanismus, der der Aufnahme der dsRNA zu Grunde liegt, ist bis dato noch unbekannt. Lediglich für *C. elegans* konnte inzwischen ein Transportprotein für doppelsträngige RNA identifiziert werden (Feinberg und Hunter, 2003).

Die Injektion eines speziellen Konstruktes, das die Synthese einer dsRNA initiiert, wurde für *Paramecium* zusätzlich als RNAi-Trigger beschrieben. Dabei wird das Konstrukt direkt in den Makronukleus injiziert (Ruiz *et al.*, 1998; Galvani und Sperling, 2001) (vgl. Kapitel 1.5).

1.4 *Paramecium* als Modellorganismus für RNAi

In der Biologie gibt es viele Modellorganismen an denen man komplexe Zusammenhänge im Labormaßstab untersuchen kann. Neben *A. thaliana*, *E. coli* und *C. elegans* ist auch *Paramecium* einer von Ihnen. Paramecien sind einzellige Eukaryoten und Vertreter der Alveolata. Sie gehören dem Stamm der Ciliophora an und stellen eine Gattung der Ciliaten dar. *Paramecium* ist ubiquitär in Süßgewässern verbreitet aber im Gegensatz zu seinen nahen Verwandten wie zum Beispiel *Plasmodium* kein pathogener Organismus. Wie der Name Ciliat schon andeutet, besitzt das *Paramecium* Cilien auf der Oberfläche, mit deren Hilfe es sich fortbewegt. Diese sind in Reihen „auf“ der Oberfläche angeordnet. Durch Tubulinstränge im Inneren führen die Cilien einen sogenannten Schlag aus, der sich wie eine Welle von Cilie zu Cilie über die ganze Zelle hinweg bewegt, wodurch die Zelle um die Längsachse rotiert und dabei vorwärts schwimmt.

Zur Abwehr von Feinden wie z.B. *Didinium* besitzt das *Paramecium* sogenannte Trichozyten. Dies sind Proteinfäden, die bei Gefahr Kalziumabhängig aus den knapp unter der Oberfläche sitzenden Alveolarsäckchen ausgeschleudert werden können. Diese Fäden wirken wie Pfeile und behindern zum Einen den Feind selbst, zum Anderen verleihen sie dem *Paramecium* durch das ruckartige Ausschleudern einen physikalischen Rückstoß, sodass die Zelle Abstand zum Gegner gewinnt und entkommen kann (Knoll *et al.*, 1991). Paramecien selbst ernähren sich bakterivor. Die Nahrung wird über die Cilien im Mundfeld eingestrudelt und in Nahrungsvakuolen eingeschlossen. Diese durchwandern dann in der sogenannten Cyclose die Zelle, wobei Enzyme in die Nahrungsvakuole abgegeben werden. Durch diese Enzyme und der Änderung des pH-Wertes wird die Nahrung verdaut und kann von der Zelle resorbiert werden. Anschließend wird der unverdauliche Rest in den Nahrungsvakuolen über die Zellphyge durch Verschmelzen der Vakuole mit der Zellmembran ausgeschieden. Neben den Nahrungsvakuolen besitzt *Paramecium* kontraktile Vakuolen, die dem

osmotischen Ausgleich dienen. Da Paramecien im Süßwasser leben, ist ihre Umgebung im Vergleich zum Zellinneren stark hypotonisch. Um nicht zu platzen, müssen Paramecien ständig Wasser aus ihrem Zellinneren pumpen. Dies geschieht kalziumabhängig mit Hilfe dieser kontraktile Vakuolen.

Wie alle Ciliaten weist auch *Paramecium* einen Kerndimorphismus auf. *Paramecium* besitzt einen polyploiden Makronukleus (MAC) und je nach Art mindestens einen diploiden Mikronukleus (MIC). Während der vegetative MAC permanent aktiv ist, ist der MIC nur während der Fortpflanzung der Zelle aktiv und besitzt somit generative Funktionen. Im Falle des Artkomplexes von *Paramecium aurelia*, liegen zwei generative MICs mit diploiden Genomen vor; der vegetative MAC erreicht einen Polyploidiegrad seines Genoms von ca. 800 x n.

Paramecium vermehrt sich generell asexuell durch Querteilung (Abbildung 1.6 A), wobei durch die Einschnürung des Cortexes zwei identische Tochterzellen entstehen. Zuvor wird das genetische Material beider Kernarten verdoppelt, wobei sich die MICs mitotisch, der MAC dagegen amitotisch teilen.

Um eine genetische Variabilität zu bewahren und neue Allele durch homologe Rekombination zu erlangen, können sich Paramecien auch paaren. Dazu legen sich bei der sogenannten Konjugation zwei Zellen des passenden Paarungstyps mit dem Mundfeld aneinander und bilden eine kleine Plasmabrücke aus. Zunächst durchlaufen die Mikronuklei beider Zellen zwei meiotische Teilungen, während die Makronuklei beider Zellen fragmentiert werden. Alle bis auf einen jetzt haploiden Mikronukleus degradieren. Der verbleibende haploide MIC teilt sich nun mitotisch, wobei ein entstandener MIC als stationärer Kern in der Zelle verbleibt, der andere MIC als Wanderkern mit der anderen Zelle ausgetauscht wird. Je Zelle verschmelzen nun der stationäre Kern und der Wanderkern der anderen Zelle zu einem Zygotenkern. Dieser Zygotenkern teilt sich nun zweimal mitotisch, während die Plasmabrücke zwischen den Zellen abgebaut wird und die Partner sich trennen. Aus diesen so entstandenen Kernen bildet sich der neue MAC und die neuen MICs, die dann durch Querteilung wieder auf Tochterzellen aufgeteilt werden (Abbildung 1.6 B).

Um Mutationen in wichtigen Genen ohne den genetischen Austausch mit einer anderen Zelle wieder zu beheben und die Integrität der Gene zu gewährleisten, haben Paramecien die Fähigkeit eine Art der Selbstfertilisation, die Autogamie, durchzuführen (Abbildung 1.6 C). Der Ablauf ist zunächst derselbe wie bei der Konjugation (Beale, 1954; Prescott, 1994). Die Mikronuklei einer Zelle teilen sich zweimal meiotisch, während der Makronukleus fragmentiert wird. Alle bis auf einen der so entstandenen Mikronuklei lösen sich auf. Der verbleibende Kern teilt sich darauf mitotisch. Die zwei so entstandenen haploiden Kerne verschmelzen zu einem diploiden Zygotenkern, aus welchem sich der neue Makronukleus und die neuen Mikronuklei bilden. Bei diesem Vorgang wird das Genom des alten MAC, der noch fragmentiert vorliegt, mit dem Genom des MICs mit Hilfe von sogenannten scannenden RNAs (scnRNAs) abgeglichen. Der neue MAC stellt somit eine fast exakte Kopie des Alten dar, allerdings mit den intakten Versionen der Gene und den eventuell veränderten epigenetischen Eigenschaften.

Zudem werden bei der Konjugation sowie der Autogamie für die MICs spezifische und nicht kodierende Bereiche, wie z.B. repetitive Elemente oder IES (internally eliminated sequences) aber auch Transposons, RNAi-abhängig aus den entstehenden MAC-Chromosomen ausgeschnitten (Mochizuki *et al.*, 2002; Garnier *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2007; Lepère *et al.*, 2009).

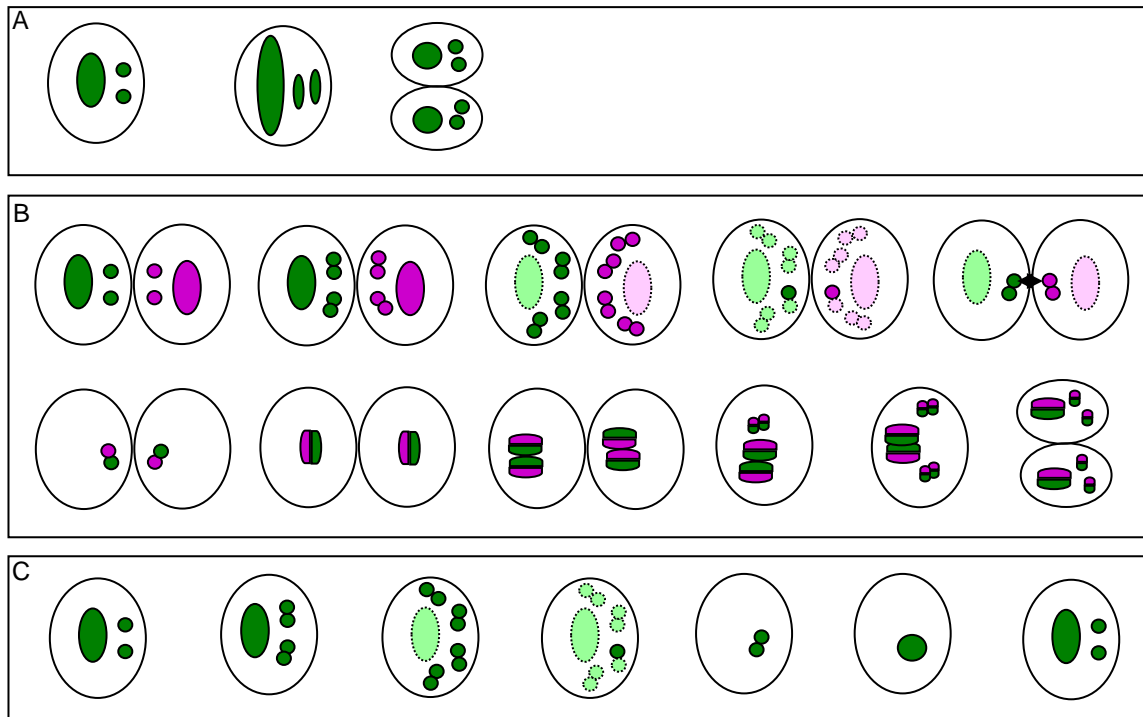


Abbildung 1.6: Vermehrungsvarianten des *Parameciums*. A stellt die asexuelle Querteilung dar. B stellt den genetischen Austausch mit einer anderen Zelle des passenden Paarungstypes, die Konjugation, dar. C stellt die Selbstfertilisation einer einzelnen Zelle, die Autogamie, dar.

Das Genom von *P. tetraurelia* wurde vollständig sequenziert (Aury *et al.*, 2006). Eine Besonderheit dieses Genoms sind die drei Genomduplikationen (whole genome duplication, WGD), die *P. tetraurelia* durchlaufen hat (Aury *et al.*, 2006). Dies führte dazu, dass ca. 70 % der Gene als Duplikate, als sogenannte paraloge Genkopien vorliegen. Nicht jedes Genduplikat wird exprimiert, einige sind zu Pseudogenen mutiert und somit nicht funktionell. Allerdings ermöglicht das Behalten weiterer Genkopien im Genom eventuell einen evolutionären Vorteil für die Zelle, wenn sich z.B. Umwelteinflüsse so ändern, dass die Expression eines solchen Gens einen Vorteil bringt.

Alle diese Besonderheiten, am meisten jedoch die Tatsache, dass somatische und generative Prozesse innerhalb einer Zelle, jedoch zeitlich und durch den Kerndimorphismus auch räumlich getrennt ablaufen, zusammen mit der einfachen Handhabung und Kultivierung dieser einzelligen Organismen, sowie die bereits etablierten Methoden zur Induzierung von RNAi-Mechanismen, machen *Paramecium* zum geeigneten Modellorganismus für RNAi-Studien. Schon früh wurden in *Paramecium* RNAi-Mechanismen beschrieben ohne die molekularen Grundkenntnisse zu kennen. Sonneborn und seine Kollegen haben die cytoplasmatische Vererbung der Oberflächenantigene beschrieben und damit den Grundstein der Epigenetik in Paramecien gelegt (Sonneborn und LeSuer, 1948).

1.5 Transgen-induziertes Silencing in *Paramecium*

Angélique Galvani und Linda Sperling haben Studien zum Transgen-induzierten Gensilencing in *Paramecium* durchgeführt. Sie haben in ihren Studien verschiedene lineare Konstrukte in den Makronucleus von *Paramecium* injiziert und so die Parameter des Konstruktes bestimmt, die zu einem effizienten Silencing des Zielgens führen (Galvani und Sperling, 2001). Sie konnten zeigen, dass ein lineares Konstrukt, das Homologie zu einem Zielgen aufweist, in einer hohen Kopienzahl injiziert werden muss, um einen Phänotyp auszulösen (Galvani und Sperling, 2001). Zudem konnten sie

zeigen, dass nur dann ein effizientes Stilllegen des Zielgens erfolgt, wenn dem kodierenden Bereich des Transgens die 3' UTR fehlt (Galvani und Sperling, 2001). Weiterhin konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass das injizierte Konstrukt in einen sense- und antisense-Strang übersetzt wird. Somit ist der initiale Auslöser der Stilllegung des Zielgens eine dsRNA und der dadurch vermittelte Mechanismus, ein RNAi-Mechanismus (Galvani und Sperling, 2001). Auch Olivier Garnier und Kollegen konnten durch das injizieren von verschiedenen modifizierten Transgenen zeigen, dass ein effizientes, RNAi vermitteltes Stilllegen eines Zielgens nur erfolgen kann, wenn die 3' UTR des Transgens fehlt (Garnier *et al.*, 2004). In dieser Studie wurden dafür zwei Konstrukte verwendet. Zum Einen eine 3' verkürzte Version des Zielgens, zum Anderen ein Transgen, das durch einen Frameshift ein vorzeitiges Stoppkodon aufweist. Beide Transgene triggerten ein effizientes Stilllegen des Zielgens (Garnier *et al.*, 2004). Injizierte Konstrukte, die dagegen am 5' Ende verkürzt waren, oder bei denen in der Mitte ein Teil der kodierenden Sequenz deletiert wurde, resultierten dagegen nur in einem moderaten Silencing-Phänotyp (Garnier *et al.*, 2004).

Aus verschiedenen Studien geht zudem hervor, dass Konstrukte, die in den MAC von *Paramecium* injiziert werden, autonom replizieren und sich wie endogene Chromosomen verhalten (Godiska *et al.*, 1987; Gilley *et al.*, 1988). Godiska und Kollegen konnten zudem zeigen, dass injizierte zirkuläre Konstrukte in der Zelle linearisiert vorliegen. Das Aufschneiden der zirkulären Konstrukte scheint dabei zufällig statt zu finden (Godiska *et al.*, 1987). Injizierte Transgene ähneln in ihrem Aufbau den zelleigenen Chromosomen und ihnen werden deshalb direkt nach der Injektion Telomersequenzen angehängt (Gilley *et al.*, 1988). Somit bleiben die Konstrukte im vegetativen Zustand der Zelle stabil und werden transkribiert. Endogen werden an die durch DNA-Eliminierung gebildeten linearen makronuklearen Chromosomen von *Paramecium* während der Autogamie Telomersequenzen angeheftet (Forney und Blackburn, 1988). Allerdings würden bei einer Autogamie sämtliche Arten an injizierten Konstrukten eliminiert werden, da sie nur im MAC, nicht jedoch in den MICs vorkommen und der neue MAC durch einen Abgleich mit den MICs gebildet wird.

In den letzten Jahren war der Transgen-induzierte RNAi-Mechanismus in *Paramecium* Schwerpunkt mehrerer Studien. So konnte von Marker beobachtet werden, dass sowohl Dicer1 (Marker S., 2009), als auch die RNA abhängige RNA-Polymerase RdRP3 (Marker S., 2009; Marker *et al.*, 2010) eine Rolle in der Akkumulation der siRNAs in diesem Mechanismus spielen. Ferner konnte dargestellt werden, dass diese siRNAs eine Modifikation an ihrem 3' Ende tragen (Marker *et al.*, 2010). Zudem konnte durch gezielte Analysen von Bouhouche und Kollegen dargestellt werden, dass die Homologe der Piwi-Proteine in *Paramecium* Ptiwi 8, Ptiwi 13 und Ptiwi 14 ebenfalls eine Rolle im Transgen-induzierten Gensilencing zukommt (Bouhouche *et al.*, 2011). In neueren Studien konnte die Involvierung einiger neu identifizierter Komponenten dargelegt werden. In einem „forward genetic screen“ wurde von Marker und Kollegen mit einer zufälligen Mutagenese durch UV-Licht und anschließender Analyse gezeigt, dass eine weitere RNA abhängige RNA-Polymerase, das Homolog 2 (RdRP2) aus *Paramecium* und eine Nukleotidyltransferase Cid134, die zu Cid2 umbenannt wurde, in den Transgen-induzierten RNAi-Mechanismus involviert sind (Marker *et al.*, 2014). Den genauen Mechanismus und die Reihenfolge in welcher die einzelnen identifizierten Komponenten wechselwirken, konnte jedoch noch nicht identifiziert werden.

1.6 Zielsetzung dieser Arbeit

Für einen Organismus ist die exakte Regulation der Gene überlebenswichtig. Es gibt viele Möglichkeiten für eine Zelle die Expression der Gene zu regulieren. Neben Transkriptionsfaktoren

oder Histonmodifikationen spielen dabei kleine regulatorische RNAs eine wichtige Rolle. So erlangen Mechanismen, die eine Regulation der Gene über kleine RNA-Spezies vermitteln, immer mehr Bedeutung in der Forschung. So auch RNA-Interferenz. In dieser Arbeit wurden die molekularen Mechanismen der RNAi-induzierten Genregulation in *Paramecium tetraurelia* untersucht. Hierfür wurde ein Transgen in den Makronukleus der Zellen eingebracht und der dadurch ausgelöste RNAi-Mechanismus genauer untersucht. Die Charakterisierung der synthetisierten siRNAs und deren spezifischen Stabilisierung war dabei ein wichtiger Punkt. Hierfür wurde untersucht, in welcher Weise die identifizierten Piwi-Proteine und die Methyltransferase Hen1 eine Rolle spielen:

Analysen zu Hen1: Es konnte bereits in früheren Studien gezeigt werden, dass die in den Mechanismus involvierten siRNAs eine Modifikation am 3' Ende tragen (Marker *et al.*, 2010). In dieser Arbeit sollte deshalb gezeigt werden, dass diese Modifizierung eine Methylgruppe ist, die von der Methyltransferase Hen1 angehängt wird. Dies wurde durch phänotypische Analysen an Zellen gezeigt, bei denen Hen1 über das Feeding von dsRNA gesilenced war und konnte durch Northernblot-Analysen bestätigt werden.

Analysen zu Ptiwi 8, 13 und 14: Die Involvierung dieser drei Homologe aus *Paramecium* in den Transgen-induzierten RNAi-Mechanismus wurde durch Bouhouche und Kollegen beschrieben (Bouhouche *et al.*, 2011). Zudem wurde für *Drosophila* beschrieben, dass dort Piwi-Proteine und das Hen1-Homolog, Pimet, direkt interagieren (Gunawardane *et al.*, 2007). Dies wurde auch in *Tetrahymena* beobachtet (Kurth und Mochizuki, 2009). In dieser Arbeit wurde deshalb untersucht, ob eine solche Interaktion von Hen1 mit einem der Piwis in *Paramecium* ebenfalls beobachtet werden kann. Dies wurde durch das Stilllegen der Ptiwi-Gene durch das Feeding von entsprechender dsRNA und anschließenden Northernblot-Analysen analysiert. Durch diese Analysen sollte zudem charakterisiert werden, in welcher zeitlichen und räumlichen Abfolge die Komponenten miteinander interagieren.

Des Weiteren sollte analysiert werden, ob der durch ein Transgen induzierter RNAi-Mechanismus in *Paramecium* eine Temperaturabhängigkeit aufweist, wie es in der Literatur für andere Organismen beschrieben wurde (Fortier und Belote, 2000; Kameda *et al.*, 2004; Szittyta *et al.*, 2003). Dies wurde mit Northernblot-Analysen der isolierten RNA aus Kulturen untersucht, die bei 18°C, 26°C und 32°C kultiviert wurden, und durch deren phänotypische Auswertung. Zur Bestätigung des Phänotyps wurden zudem Fluoreszenzaufnahmen angefertigt.

Zudem sollte im Rahmen dieser Arbeit mittels Tiefensequenzierung geklärt werden, ob sekundäre siRNAs eine Rolle im untersuchten Mechanismus spielen und von welchen Faktoren diese abhängig sind. Weiter wurden mit den durchgeführten Sequenzierungen die Sequenz-Charakteristika der siRNAs untersucht, um Rückschlüsse auf deren Biogenese ziehen zu können.

Ferner wurde in dieser Arbeit der Frage nachgegangen, ob der Transgen-induzierte RNAi-Mechanismus im Kern oder im Cytoplasma der Zelle abläuft. Dies sollte Hinweise darauf geben, ob es sich bei dem induzierten Gensilencing um ein transkriptionelles, also im Kern lokalisiertes Silencing, oder um eine post-transkriptionelles Silencing handelt, das eher im Cytoplasma abläuft. Hierfür wurde die Lokalisation des Hen1-Proteins durch Immunfluoreszenzfärbungen bestimmt und die Analysen durch Westernblots bestätigt.

2. Material und Methoden

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien, Reagenzien, Enzyme, Oligonukleotide, Glaswaren, Membranen, Verbrauchsmaterialien und Geräte wurden alle von folgenden Firmen bezogen: Machery-Nagel GmbH&Co. KG (52355 Dühren, DE), Invitex (13125 Berlin, DE), Qiagen (40724 Hilden, DE), GE Healthcare (79111 Freiburg, DE), New England Biolabs GmbH (65926 Frankfurt a.M., DE), PEQLAB Biotechnologie GmbH (91052 Erlangen, DE), Carl ROTH GmbH + Co. KG (76185 Karlsruhe, DE), Sigma-Aldrich Biochemie GmbH (21147 Hamburg, DE), Bio-Rad Laboratories GmbH (80939 München, DE), Merck Millipore KgaA (Darmstadt, DE), SCHOTT AG (55122 Mainz, DE), Greiner Bio-One GmbH (72636 Frickenhausen, DE), Eppendorf AG (22339 Hamburg, DE), Axon Labor Technik (67659 Kaiserslautern, DE), Life Technologies GmbH (64295 Darmstadt, DE) [ehemals Invitrogen mit Applied Biosystems/Ambion fusioniert], Promega GmbH (68199 Mannheim, DE), Heraeus Sepatech (37520 Osterode, DE), Biometra GmbH (37079 Göttingen, DE), VWR international GmbH (64295 Darmstadt, DE), Biologio bv (6500 AB Nijmegen, NE), Carl Zeiss AG (73447 Oberkochen, DE), AppliChem GmbH (64291 Darmstadt, DE), Molecular Probes Europe BV (2333 AA Leiden, NE), Jackson ImmunoResearch Europe (CB8 7SY Suffolk, UK).

2.1 Verwendete Stämme

Klebsiella minuta V4RI M63B1

E. coli HT115 DE3

E. coli SURE

E. coli Top10

E. coli DH5 α

E. coli Rosetta2

Paramecium tetraurelia Stamm 51

Paramecium tetraurelia Stamm d4-2

2.2 Verwendete Nährmedien

2.2.1 LB-Medium / LB-Agar

10 g Pepton

5 g Hefeextrakt

10 g NaCl₂

ad 1 L H₂O bidest.

Für LB-Agar: 1,5 g Agar pro 100 ml Medium einwiegen und in der Mikrowelle aufkochen.

2.2.2 WGP (wheat grass powder)

WGP-Puffer:

11,6 g Tris

15 g Na₂HPO₄

4 g NaH₂PO₄

ad 1 L H₂O bidest.

pH-Wert mit HCl auf pH = 7,0 einstellen

WGP-Stocklösung:

166 g WGP auf 2,5 L

Autoklavieren für 20 min bei 103°C

Über 8 Lagen Gaze filtern

Durch die Durchlaufzentrifuge von Pulverrückständen säubern

Autoklavieren 20 min 121°C

WGP-Medium:

250 ml WGP-Puffer

250 ml WGP-Stocklösungad 5 L H₂O bidest.**2.2.3 Verwendete Stocklösungen**

Den Nährmedien wurde vor der Verwendung teilweise Antibiotika zur Selektion oder andere Zusätze, wie z.B. das Phytohormon β -Sitosterol, das bei *Paramecien* für eine verbesserte Teilungsrate sorgt, zugegeben. Zudem wurden interkalierende Stoffe, wie z.B. 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) eingesetzt, um DNA sichtbar zu machen. Diese Chemikalien und die Konzentrationen der verwendeten Stocklösungen sowie deren Lösungsmittel und eingesetzte Endkonzentrationen sind in Tabelle 2.1 aufgeführt.

Tabelle 2.1: Verwendete Stocklösungen. Dargestellt sind die Chemikalien mit ihren Lösungsmitteln samt eingesetzter Endkonzentration.

Stoff	Konzentration (Stocklösung)	Lösungsmittel	Endkonzentration
IPTG	50 mg/ml	H ₂ O	125 µg/ml
Ampicillin	100 mg/ml	H ₂ O	100 µg/ml
Tetracyclin	12,5 mg/ml	EtOH (100 %)	12,5 µg/ml
Chloramphenicol	35 mg/ml	EtOH (100 %)	35 µg/ml
Kanamycin	50 mg/ml	H ₂ O	50 µg/ml
β -Sitosterol	8 mg/ml	EtOH (100 %)	0,8 µg/ml
DAPI	1 µg/ml	H ₂ O	0,1 µg/ml
Proteinase K	10 mg/ml	H ₂ O	1 mg/ml
RNAse A	10 mg/ml	H ₂ O	10 µg/ml

2.3 Verwendete Plasmide

In Tabelle 2.2 sind die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide, die vermittelte Resistenz und der Verwendungszweck aufgeführt.

Tabelle 2.2: Verwendete Plasmide. Dargestellt sind die Plasmide und deren Verwendungszweck. Zudem ist die durch sie vermittelte Resistenz aufgeführt.

Plasmid	Resistenzgene	Verwendung
L4400	Ampicillin	dsKonstrukte für Feeding
pUC57	Ampicillin	Amplifizierung Antigene
pRSETA	Ampicillin	Expressionsplasmid für Proteine in <i>E. coli</i> , trägt His(6x)-Tag
pPXV Derivate	Ampicillin	Injektionsplasmid für <i>Paramecium</i> , trägt 3x Flagtag
pTI Derivate	Ampicillin	Injektionsplasmid für <i>Paramecium</i> , trägt GFP und verkürztes <i>ND169</i>

2.4 Verwendete Antikörper

Antikörper wurden verwendet um Proteine im Westernblot nachzuweisen oder die Lokalisation von Proteinen in Immunfluoreszenzfärbungen zu detektieren. In Tabelle 2.3 sind die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper, deren Hersteller und deren Verwendung aufgeführt.

Tabelle 2.3: Verwendete Antikörper. Dargestellt sind die primären sowie sekundären Antikörper, deren Hersteller sowie deren Verwendungszweck (WB: Westernblot, IF: Immunfluoreszenz).

Antikörper	Firma	Verwendung
Primäre Antikörper		
Anti-Flag M2 monoklonal Anti-Maus	Sigma-Aldrich	WB, IF
Anti-Hen1 polyklonal Anti-Hase	Seqlab eigene Aufreinigung	WB
Anti- α Tubulin monoklonal Anti-Maus	Sigma-Aldrich	WB
Anti-Histon4 Anti-Hase	Bekommen von: C. David Allis, Rockefeller University, USA	WB
Sekundäre Antikörper		
Alexa Fluor® 594 F(ab') ₂ IgG (H+L) Ziege anti-Maus	Molecular Probes	IF
Ziege anti-Hase IgG (H+L) HRP-Konjugat	Promega	WB
Ziege anti-Maus IgG (H+L) HRP-Konjugat	Jackson ImmunoResearch	WB

2.5 Verwendete Oligonukleotide

Oligonukleotide wurden in dieser Arbeit meist zur Generierung von PCR-Produkten eingesetzt, oder als Kontroll-Molekül bzw. Sonde in Northernblots zu dienen. Die verwendeten Oligonukleotide sind mit ihrer entsprechenden Sequenz in Tabelle 2.4 aufgeführt.

Tabelle 2.4: Verwendete Oligonukleotide. Dargestellt sind die verwendeten Oligonukleotide mit ihrer Sequenz in 5'-3' Richtung.

Name	Sequenz (5' → 3')
Sonden für Northernblots	
PCR-Produkte als Sonde	
Vectorsonde_nd_f	CGACTGTTTAAACCACGTGG
Vectorsonde_nd_r	AAACGCCAGCAACGCG
GFP_uni_f	AGGAGAAGAAGCTTTTCACTGG
GFP_uni_r	GAGTATTTTGTGATAATGGTCTGCTA
Nd169_701_f	GATGATGTTACTCTGCGATAGGG
Nd169_1733r	TCAAAATCTCTAAAATGCTTTTTTCCTT
Oligonukleotide als Sonde	
Kontroll-Sonde	AAATCTCAACCAGCCACTGCT
Glutamin t-RNA	TGGAGGACCTACTGGATTGGAACCAAGTCTTGAGGGTTA
Cluster22*	TAGAGTGTAAGCCGAAGTACTGACCCAAAAGATAAAATACTAGAT ACTTGACCACCTTTTGTCAATGAAGAGAAGCTTTAGCCAAATTAATACCTT
5' Race Oligo (untergemischt bei β -Eliminierung)	TTTAGAGTTGGTCGGTGACGA
Feeding-Konstrukte	
T7-Minimal	TAATACGACTCACTATAGG
Real-time PCR	
GAPDH_f	GAGAGCCGGAAGAGCTGCTA
GAPDH_r	TGGTTGGAAGCTGAAGGCCATA
Act1.1_f	TTGGTCTTGAAGTCGCAGGTAT
Act1.1_r	AATTCTTTGCTCAATCTTTCTGGG
Rdr2qPCR1807_f	ATCATAAAATCTATAGGCAACTTCACA
Rdr2qPCR1952_r	CCACTAGATCATCCTTTATTAGAATGTT
Hen1qPCR677_f	ACCTTACGAATGGTTATGCC
Hen1qPCR798_r	ATCATACGGCAAGCAGTG
Dcr1qPCR3923_f	ATAAATGTTTCCAATCCCAATAATT
Dcr1qPCR4026_r	GAATACTTCAATACTCGACAGCAA
FlagTag-Klonierung	
FlagTag5'	TAAGATGAATGGAATATAATG
FlagTag3'	TTATTTAAGTGTTGTTCAATTA
HenFlag_for	CGGAGCTCATGGAAATTAAGCTTATGAA
HenCFlag_rev	GCGCTAGCATAATTTAATTTCAATAATAAA
HenNFlag_rev	GCGGTACCTCAATAATTTAATTTCAATAAT

* bestehend aus 2 hintereinander liegenden Oligos

2.6 Verwendete Kits

Zur standardisierten Aufreinigung bzw. Isolierung von Nucleinsäuren wurden in dieser Arbeit Kits verwendet, die mit ihren Herstellern und deren Verwendungszweck in Tabelle 2.5 dargestellt sind.

Tabelle 2.5: Verwendete Kits. Aufgeführt sind standardisierte Kits, deren Hersteller und deren Verwendungszweck innerhalb dieser Arbeit.

Kits	Hersteller	Verwendung
Nucleobond® Xtra Midi EF	Machery-Nagel GmbH&Co. KG 52355 Dühren, DE	Midiprep der Injektionsplasmide
Invisorb® Spin DNA Extraction Kit	Invitek 13125 Berlin, DE	Geextraktionen
MinElute® Gel Ectraction Kit	Qiagen 40724 Hilden, DE	Geextraktionen
MinElute® PCR Purification Kit	Qiagen 40724 Hilden, DE	PCR-Aufreinigung
RNeasy® MinElute® Cleanup Kit	Qiagen 40724 Hilden, DE	RNA-Aufreinigung
Illustra™ Microspin™ G-50 columns	GE Healthcare 79111 Freiburg, DE	Aufreinigung der Sonden für Northernblots
NEBNext® Multiplex Small RNA Library Prep Set for Illumina	New England Biolabs GmbH 65926 Frankfurt a.M., DE	Konstruktion von siRNA Libraries
QIAQuick PCR Purification Kit	Qiagen 40724 Hilden, DE	PCR-Aufreinigung

2.7 Verwendete Größenstandards

In dieser Arbeit wurden verschiedene Größenstandards, sogenannte Marker, zum Abgleich spezifischer Proben verwendet. Hierfür wurden sowohl Protein-Marker, als auch RNA- und DNA-Marker verwendet. Die genutzten Marker und deren Größen-Fragmente sind der Tabelle 2.6 zu entnehmen.

Tabelle 2.6: Verwendete Größenstandards. Aufgeführt sind die verwendeten Größenstandards, deren Hersteller und deren Fragmenten-Verteilung.

Name	Hersteller	Fragmente
RNA-Marker		
MicroRNA Marker	NEB (New England Biolabs GmbH) 65926 Frankfurt a.M., DE	17, 21, 25 [nt]
Protein-Marker		
ColorPlus™ Prestained Protein Ladder	NEB (New England Biolabs) 65926 Frankfurt a.M., DE	10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 80, 100, 150, 230 [kDa]
peqGOLD Protein-Marker IV	PEQLAB Biotechnologie GmbH 91052 Erlangen, DE	10, 15, 25, 35, 40, 55, 70, 100, 130, 170 [kDa]
DNA-Marker		
100 bp DNA-Leiter,	PEQLAB Biotechnologie GmbH 91052 Erlangen, DE	80, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1031 [bp]
100 bp DNA-Leiter, äquimolar	Carl ROTH GmbH + Co. KG 76185 Karlsruhe, DE	100, 150, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 [bp]
1 kb DNA-Leiter Orange plus	PEQLAB Biotechnologie GmbH 91052 Erlangen, DE	250, 500, 750, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 5000, 6000, 8000, 10.000 [bp]
1 kb DNA-Leiter	Carl ROTH GmbH + Co. KG 76185 Karlsruhe, DE	500, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 4000, 5000, 6000, 8000, 10.000 [bp]

2.8 Methoden spezifisch für *Paramecium*

2.8.1 Immobilisierung

Diese Methode wurde genutzt um das Oberflächenantigen zu bestimmen, welches zu einem Zeitpunkt auf der Zelle exprimiert wird. Dabei wurden 100 µl einer *Paramecium*-Zellkultur mit möglichst vielen Zellen in einen Dreiloch-Objektträger gegeben und mit 1 µl des entsprechenden Antiserums inkubiert. Tragen die Zellen die passenden Antigene auf der Oberfläche, werden diese durch die Antikörper miteinander verklumpt. Die Zelle ist somit Bewegungsunfähig und sinkt zu Boden.

2.8.2 Trichozysten-Ausstoß

In dieser Arbeit wurde der Trichozystenausstoß als Reporter auf ein effizientes Stilllegen des *nd169*-Gens genutzt. Hierfür wurden 10 µl einer Zellkultur mit möglichst vielen Zellen auf einen Objektträger getropft und mit 10 µl gesättigter Pikrinsäure gemischt. Durch die Änderung des pH-Wertes in ihrer Umgebung stoßen die Zellen Trichozysten aus. Dies kann unter dem Lichtmikroskop beobachtet werden.

2.8.3 DAPI-Färbung

Für viele in dieser Arbeit durchgeführte Versuche war es wichtig, das vegetative Alter der Zelle zu kennen. Um den Zustand der Zellen und insbesondere der Kerne zu erfassen, wurden die

Nukleinsäuren mit DAPI angefärbt. Dies ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der sich interkalierend in die Nukleinsäuren einlagert und sich durch eine Wellenlänge von $\lambda = 358$ nm anregen lässt. Dadurch war es möglich, den vegetativen Zustand der Kerne unter dem Fluoreszenzmikroskop zu beobachten. Hierfür wurde ein Vaselinekreis auf einen Objektträger gezogen und 10 μ l einer Zellkultur mit möglichst vielen Zellen in diesen Kreis getropft. Anschließend wurden zur Fixierung der Zellen 2 μ l einer 4 %igen Paraformaldehyd-Lösung (PFA) und 2 μ l der DAPI-Stocklösung gegeben, mit einem Deckglas abgedeckt und nach 10 minütiger Inkubationszeit unter dem Fluoreszenzmikroskop untersucht.

4 % PFA

4 g PFA auf 100 ml 1xPBS einwiegen und lösen

10x PBS:

80 g NaCl

2 g KCl

14,4 g Na_2HPO_4

2,4 g KH_2PO_4

ad 1l H_2O bidest.

pH-Wert mit KOH (3M) auf 7,4 einstellen

2.8.4 dsRNA-Feeding

Um das Stilllegen eines Gens zu bewirken und somit dessen Funktion untersuchen zu können, wurde dieses über das sogenannte dsRNA-Feeding gesilenced. Da sich *Paramecium* bakterivor ernährt, kann im Labor durch die Wahl der Futterbakterien der RNAi-Weg des dsRNA-Feedings induziert werden. Füttert man die Zellen mit einem *E. coli* Stamm (*E. coli* HT115 DE3), der doppelsträngige RNA nicht abbauen kann, jedoch eine solche enthält, die homolog zu einem Zielgen ist, wird diese dsRNA von der Zelle aufgenommen, und induziert über einen RNAi-Mechanismus das Stilllegen des Zielgens (Galvani und Sperling, 2002). Dazu wurde ein spezifischer Bereich des Zielgens mittels PCR (2.11.2) amplifiziert und in den L4400-Vektor (Abb. 2.1) kloniert, der eine Ampicillinresistenz vermittelt und zwei durch IPTG anschaltbare Promotoren flankierend von der „multiple cloning site“ (MCS) aufweist. Alle in dieser Arbeit verwendeten Konstrukte waren bereits konstruiert. Die Konstrukte wurden anschließend in den Bakterienstamm *E. coli* HT115 DE3 transformiert (siehe 2.9.2.1), welcher gegen das Antibiotikum Tetrazyklin resistent ist. Somit konnte mit Tetrazyklin auf den Bakterienstamm selbst und mit Ampicillin auf das Plasmid selektiert werden. Zudem sind die *E. coli* HT115 DE3-Zellen RNAsell-defizient. Dies bedeutet, sie können doppelsträngige RNA-Moleküle nicht abbauen und reichern diese somit in ihrem Inneren an. Durch die Zugabe von IPTG konnte so die Synthese von dsRNA getriggert werden, die homolog zum Zielgen ist. Werden solche Bakterien an *Paramecium* verfüttert, nehmen diese die dsRNA über einen unbekanntenen Mechanismus auf. Durch die dsRNA wird ein RNAi-Mechanismus angeschaltet und da die dsRNA homolog zu einem endogenen Gen ist, wird dieses Gen über die RNAi-Maschinerie stillgelegt.

Um das Feeding durchführen zu können, wurde eine Kolonie der transformierten *E. coli* HT115 in 5 ml LB-Medium überführt, welches die beiden Antibiotika Ampicillin und Tetrazyklin zur Selektion enthält, und über Nacht schüttelnd bei 37°C inkubiert. Mit dieser Präkultur wurde am folgenden Tag 1/10 V des benötigten WGP-Ansatzes plus 5 ml LB, das mit Ampicillin versetzt ist (LB-A), angeimpft und ebenfalls schüttelnd bei 37°C inkubiert. Die optische Dichte wurde photometrisch verfolgt und bei einer Dichte von $\text{OD}_{595} = 0,4$ wurde der Kultur IPTG [125 $\mu\text{g}/\text{ml}$] zugegeben und weitere 2,5 h schüttelnd inkubiert. Anschließend wurden 5 ml der Kultur abgezweigt um die Synthese der dsRNA

überprüfen zu können. Diese 5 ml und die restliche Kultur wurden bei RT für 10 min bei 4000 rpm abzentrifugiert. Das Pellet der 5 ml-Fraktion wurde in 100 µl 10 mM Tris gelöst und bei -20°C eingefroren um damit eine dsRNA-Isolierung (2.9.4) durchführen zu können. Der Rest wurde in der entsprechenden Menge WGP gelöst (Bsp.: 10 ml *E.coli* in LB-A werden in 100 ml WGP gelöst). Dem WGP wurde Ampicillin, IPTG und β -Sitosterol zugegeben [vgl. Tabelle 2.1]. Das fertige Futtermedium wurde bei 4°C bis zur Verwendung, maximal für drei Tage aufbewahrt.

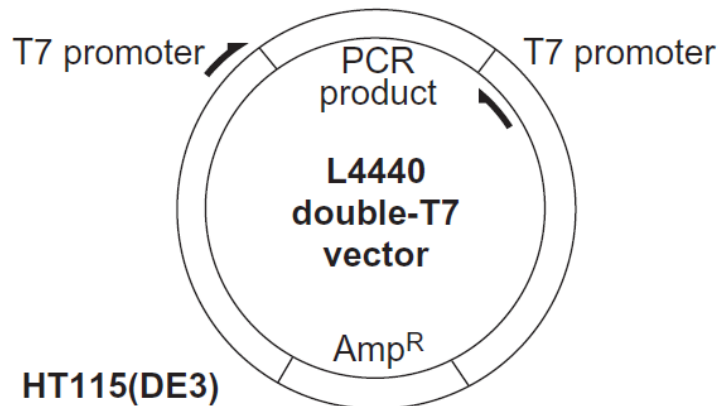


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung des L4400-Vektors (Kamath *et al.*, 2000). Amp^R bezeichnet das Ampicillinresistenzgen. Die IPTG abhängigen Promotoren, die das klonierte PCR-Produkt flankieren, sind durch schwarze Pfeile angedeutet.

Die für das dsRNA-Feeding verwendeten Genfragmente mit der entsprechenden Größe sowie deren Position im Gen sind in Tabelle 2.7 aufgelistet.

Tabelle 2.7: Für das dsRNA-Feeding verwendete Genfragmente. Aufgelistet sind die Genfragmente samt Größe und deren Position im Gen.

Gen/ Accession number (Paramecium DB)	Position im Gen [bp]	Größe [bp]
RdR2 GSPATT00036857001	1289-1559	270
RdR3 GSPATT00006401001	1789-2462	673
Icl7a GSPATG00021610001	1-580	580
ND169 GSPATT00008337001	1450-1860	410
Hen1 GSPATG00036636001	556-942	386
Piwi8 GSPATG00021288001	269-913	645
Piwi13 GSPATG00016237001	105-787	683
Piwi14 GSPATG00036761001	285- 1007	723
Cid2 (Cid134) GSPATG00033134001	327-820	493

2.8.5 Injektion eines Konstruktes in den Makronukleus von *Paramecium*

Paramecium tetraurelia besitzt einen vegetativen Makronukleus und zwei somatische Mikronuklei. Paramecien können durch das direkte Injizieren eines linearen Konstruktes in den vegetativen Kern transformiert werden. Dabei wird dieses Konstrukt wie ein Minichromosom behandelt und bekommt Telomerenden angehängt. Allerdings wird das Genom des Makronukleus mit den diploiden Genomen der Mikronuklei während der Autogamie abgeglichen und letztendlich neu daraus gebildet. Da keine Kopie des eingebrachten Konstruktes in den Mikronuklei vorliegt, bedeutet dies, dass das Konstrukt bei der Autogamie eliminiert wird.

2.8.5.1 Vorbereitung der Zellen

Da die Zellen das injizierte Konstrukt während der Autogamie eliminieren (2.8.5), wurde darauf geachtet, dass nur „junge“ Zellen injiziert wurden. Das klonale Alter einer Zelle wird an Hand der Anzahl der vegetativen Teilungen nach der letzten durchgeführten Autogamie bestimmt. Paramecien führen alle 20-25 Teilungen eine Autogamie durch. Für die Injektion wurden deshalb Zellen artifiziell gealtert, indem eine Zelle in 250 µl WGP-Medium für 24 h bei 32°C kultiviert wurde. Am folgenden Tag wurde erneut eine Zelle aus diesem Ansatz in 250 µl frisches WGP-Medium (2.2.2) gesetzt und weiter kultiviert. Dies wurde für vier Tage wiederholt. Am fünften Tag wurde dem Ansatz eine Zelle entnommen, in 500 µl WGP-Medium gesetzt und für drei Tage darin kultiviert ohne das Medium zu wechseln. Dies bewirkt, dass sich die Zellen ausreichend oft geteilt haben (ca. 20 Teilungen) und zudem leicht hungern. Beide Faktoren triggern die Autogamie, welche dann an Hand einer DAPI-Färbung (2.8.3) überprüft werden kann. Es wurden anschließend nur solche Zellen in die Injektion eingesetzt, die die Autogamie kürzlich, vor 2-3 Teilungen, beendet haben.

2.8.5.2 Vorbereitung des Konstruktes

In dieser Arbeit wurden Konstrukte injiziert, die aus einem Derivat des pTI-Plasmids gewonnen wurden. Hierfür wurde das Plasmid mittels Elektroporation (2.9.2.1) in *E. coli* SURE-Zellen transformiert und mit LB-A-Platten auf das Plasmid selektiert. Eine Kolonie der Transformanten wurde gepickt und in 200 ml LB-A-Medium überführt. Anschließend wurde eine Midi-Plasmidpräp über eine Säule mit dem Nucleobond® Xtra Midi EF Kit (2.6) nach Herstellerangaben durchgeführt. Danach wurden 50 µg des isolierten Plasmids mit einem Restriktionsenzym, das nur eine Schnittstelle in der Sequenz des Plasmids aufweist, nach Herstellerangaben ÜN verdaut und so linearisiert. Der Verdau wurde mit einem 1 % Agarosegel überprüft. Im Anschluss wurde der Ansatz für 15 min bei RT und 13 000 rpm zentrifugiert um kleinere Partikel der Säule (Beads) am Boden des Reaktionsgefäßes zu sammeln. Der Überstand wurde vorsichtig von oben abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Es wurde 1/10 V Natriumacetat (3M, pH = 9) und 1 V Roti-Phenol zugegeben, invertiert und nach kurzem inkubieren für 2 min bei RT und 13 000 rpm zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 3 V Ethanol (100 %) versetzt und über Nacht bei -20°C gefällt. Am folgenden Tag wurde der Ansatz für 15 min bei 4°C und 14 000 rpm abzentrifugiert, mit 1 ml Ethanol (70 %) gewaschen und nach erneutem Zentrifugieren und Trocknen in 380 µl H₂O aufgenommen. Es wurden 20 µl Natriumacetat (3M, pH = 9) zugegeben und über einen Millipore-Filter (0,22 µm Porengröße) nach Herstellerangaben aufgereinigt. Es wurde erneut mit 1 ml Ethanol (100 %) für 1 h bei -20°C gefällt. Anschließend wurde der Ansatz erneut für 15 min bei 4°C 14 000 rpm abzentrifugiert, mit 1 ml Ethanol (70 %) gewaschen und nach dem Zentrifugieren und Trocknen als DNA-Pellet bei -20°C eingefroren. Das Pellet wurde erst kurz vor der Injektion in 4 µl Endotoxin freiem Wasser gelöst.

2.8.5.3 Injektion und Handhabung

Für die Injektion wurde eine junge Zelle für 2 min in Dryls-Puffer gewaschen und in einem kleinen Volumen Flüssigkeit auf einen Objektträger getropft, mit Paraffin überschichtet und die Flüssigkeit abgesaugt. Anschließend wurde das vorbereitete Konstrukt (2.8.5.2) mit einer Injektionsnadel manuell mit Hilfe einer Apparatur unter dem Mikroskop in den Makronukleus injiziert. Die Zelle wurde dann in 200 µl, mit Volvic-Wasser verdünntem, WGP-Medium gesetzt und über Nacht bei RT kultiviert, sodass sich die Zelle erholen konnte. Die Zellen wurden am folgenden Tag auf das Tragen des Konstruktes an Hand des Selektionsmarkers, dem *gfp*-Gen und die dadurch vermittelte grüne Fluoreszenz, hin überprüft und positiv injizierte Zellen in verdünntem WGP-Medium bei 4°C gelagert.

Dadurch wird die Teilungsrate und somit auch das Risiko einer erneuten Autogamie, das den Verlust des Konstruktes bewirkt, gesenkt. Zur Untersuchung des Konstruktes bzw. des daraus resultierenden Phänotyps wurde eine injizierte Zelle von 4°C in WGP-Medium zu 32°C gesetzt, kultiviert und zu einer Massenkultur herangezogen, die dann entsprechenden Versuchen unterzogen werden konnte.

Dryls-Puffer

0,5 g Natriumcitrat

0,12 g NaH₂PO₄

0,14 g Na₂HPO₄

0,16 g Calciumchlorid

ad 1 L H₂O bidest. und autoklavieren

dem abgekühlten Puffer 2 g BSA zugeben

2.9 Methoden spezifisch für *E. coli*

2.9.1 Herstellung elektrokompenter Zellen

Bakterienstämme, wie z.B. *E. coli*, die nicht natürlich kompetent sind, können durch das Anlegen einer Spannung trotzdem mit fremder DNA transformiert werden. Da Salze jedoch Strom leiten, müssen die Zellen zuvor besonders behandelt werden und somit elektrokompent gemacht werden. Hierzu wurde der gewünschte Bakterienstamm auf einer LB-Platte, die das entsprechende Antibiotikum zur Selektion enthält, ausgestrichen. Eine Kolonie wurde gepickt und in 5 ml LB-Medium, mit entsprechendem Antibiotikum, überführt und über Nacht bei 37°C schüttelnd inkubiert. Diese Präkultur wurde am folgenden Tag in 500 ml LB-Medium, welches ebenfalls das entsprechende Antibiotikum enthält, überführt und weiter schüttelnd bei 37°C inkubiert, bis die optische Dichte OD₅₉₅ = 0,5 – 0,7 beträgt. Die Kultur wurde 10 min auf Eis gestellt und anschließend auf 50 ml Greinerröhrchen aufgeteilt. Die Kultur wurde für 5 min bei 4°C und 4 000 x g abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde vorsichtig in 10 %igem Glycerin gelöst. Dabei wurden die Pellets der sechs Greinerröhrchen auf vier vereinigt, die Röhrchen wieder mit 10 %igem Glycerin aufgefüllt und erneut bei gleichen Bedingungen zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Pellets erneut in 10 %igem Glycerin resuspendiert, dabei wurden die Pellets wieder von vier auf zwei vereinigt. Die Prozedur wurde wiederholt und die Pellets in einem Röhrchen vereinigt. Anschließend wurde das Pellet nach dem Resuspendieren in 10 %igem Glycerin noch weitere sechs mal mit 10 %igem Glycerin gewaschen, zentrifugiert und resuspendiert. Zum Schluss wurden die Zellen in 1,75 ml 10%igem Glycerin resuspendiert, zu 100 µl aliquotiert und so bei -80°C in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

10 % Glycerin

10 ml Glycerin

90 ml H₂O bidest.

autoklavieren

2.9.2 Transformation von Bakterien

2.9.2.1 Elektroporation

Bei der Transformation von Bakterien mittels Elektroporation, wird die Hülle der Zellen durch das Anlegen einer Spannung kurzzeitig permeabel für kleinere Moleküle, wie z.B. DNA. So können auch Bakterien, die nicht natürlich kompetent sind, transformiert werden. Hierzu wurde ein Aliquot der entsprechenden kompetenten Zellen auf Eis aufgetaut, 1 µl der zu transformierenden DNA zugeben und durch vorsichtiges umrühren mit einer Spitze mit den Zellen gemischt. Der Ansatz wurde in eine eiskalte Küvette überführt und in den Schlitten des Elektropulsers gestellt. Bei Küvetten mit einem

Abstand von 1 mm wurde eine Spannung von 1,8 kV für ungefähr 3 -4 ms angelegt. Danach wurde sofort 400 µl kaltes LB-Medium zu den Zellen gegeben und der Ansatz wurde in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Damit die Zellen ein gewünschtes, auf einem transformierten Plasmid kodiertes Resistenzgen gegen ein Antibiotikum zur Selektion zu exprimieren, wurden die Zellen dann für 1,5 h bei 37°C schüttelnd inkubiert. Danach wurden die Zellen auf entsprechenden Selektions-Platten in verschiedenen Verdünnungen ausplattiert.

2.9.2.2 Hitzeschock

Bei schwierigen Klonierungen oder Konstrukten, wurde auf kommerziell erworbene chemisch kompetente Zellen (z.B. *E. coli Top10*) zurückgegriffen um eine höhere Transformationseffizienz zu erzielen. Da diese Zellen jedoch mit Salzen behandelt wurden, konnten sie nicht durch Elektroporation transformiert werden, sondern wurden einem Hitzeschock unterzogen um die DNA einzubringen. Hierfür wurden 25 µl der kompetenten Zellen auf Eis aufgetaut, mit 2 µl DNA bzw. des Ligationsansatzes vermischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Danach wurde der Ansatz für 30 s bei 42°C inkubiert und anschließend sofort in Eiswasser geschockt und für 2 min auf Eis inkubiert. Den Zellen wurde 250 µl LB-Medium zugegeben. Anschließend wurde der Ansatz zur Expressierung eines Selektionsmarkers bei 37°C schüttelnd für 1 h inkubiert und danach in verschiedenen Verdünnungen auf Selektions-Platten ausplattiert.

2.9.3 Isolierung von Plasmiden

Um ein Plasmid in ausreichenden Mengen zu erhalten, wurden *E. coli*-Zellen transformiert. Eine Kolonie transformierter Zellen wurde in 2 ml LB-Medium überführt, das den entsprechenden Selektionsmarker enthält. Um möglichst viele Zellen und somit noch mehr Plasmid zu erhalten wurde der Ansatz über Nacht schüttelnd bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden für 1 min bei RT und 10 000 rpm pelletiert. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen. Anschließend wurden das Pellet in 340 µl Sol I durch vortexen resuspendiert. Dabei werden die Zellen aufgeschlossen. Zudem wurde der Sol I Lösung vor dem Verwenden RNase A [10 µg/ml] zugegeben, um die in der Zelle enthaltene RNA abzubauen. Anschließend wurden 340 µl Sol II zugeben, gemischt und solange bei RT inkubiert, bis die Lösung klar wurde. Nach der Zugabe von 340 µl Sol III wurde erneut invertiert. Durch den Sprung des pH-Wertes von 8 auf 5,5 bleiben die Plasmide in Lösung, die Zelltrümmer, das Genom und Proteine fallen dagegen aus. Nach dem Pelletieren der Zelltrümmer durch eine Zentrifugation für 20 min bei RT und 13 000 rpm wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 1 ml eiskaltem Isopropanol versetzt um die Plasmide zu fällen. Dazu wurde der Ansatz für mind. 20 min bei -20°C inkubiert. Nach diesem Zeitraum wurden die gefällten Plasmide für 10 min bei RT und 13 000 rpm pelletiert, mit 1 ml Ethanol (70 %) gewaschen und erneut für 5 min zentrifugiert. Das getrocknete Pellet wurde in 100 µl Tris (10mM, pH = 8) aufgenommen.

Sol I:

1,21 g Tris
0,744 g EDTA
ad 200 ml H₂O bidest.
den pH-Wert auf 8 mit HCl einstellen

Sol II:

1 g NaOH
10 ml 20 % SDS-Lösung
ad 200 ml H₂O bidest.

Sol III:

58,9 g $C_2H_3KO_2$ 200 ml H_2O bidest.

pH-Wert auf 5,5 mit Eisessig (100 % Essigsäure) einstellen

2.9.4 dsRNA-Isolierung (Gesamt-Nukleinsäuren-Isolierung)

Um zu verifizieren, dass das unter 2.8.4 hergestellte Feeding-Medium tatsächlich aus Bakterien besteht, die die dsRNA akkumulieren wurde eine gesamt-Nukleinsäuren-Isolierung durchgeführt. Hierfür wurden, die in Tris (10mM, pH = 8) gelösten Zellen der in 2.8.4 abgezweigten 5 ml-Fraktion für 10 min bei 70°C in einem Heizblock/Wasserbad erhitzt und dadurch aufgeschlossen. Anschließend wurde dem Ansatz 100 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol [25:24:1] zugegeben und dieser durch invertieren gemischt. Nach einer Zentrifugation von 1 min bei 13 000rpm wurde die obere wässrige Phase, die die Nukleinsäuren enthält, in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Die Nukleinsäuren wurden durch die Zugabe von einem Volumen Isopropanol und einem zehntel Volumen Natriumacetat (3 M, pH 9) gefällt. Hierfür wurde der Ansatz für mindestens 20 min bei -20°C inkubiert und anschließend für 20 min und 13 000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 1 ml Ethanol (80 %ig) gewaschen. Dieser Waschschrift wurde einmal wiederholt. Danach wurde das getrocknete Pellet in 30 µl Tris (10 mM, pH 8) aufgenommen. Von diesem Ansatz wurden 7 µl gegen einen geeigneten Größenstandard auf ein Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt (2.11.1).

2.10 RNA-chemische Methoden

RNA-Moleküle sind sehr instabil und leicht abbaubar. Deshalb wurde bei der Handhabung von RNA stets darauf geachtet alle verwendeten Materialien und Lösungen frei von RNAsen zu halten und sauber zu arbeiten. Es wurden spezielle Filterspitzen für die zuvor gereinigten Pipetten verwendet. Zudem wurde darauf geachtet, dass Proben bei -80°C in Aliquots gelagert wurden um unnötiges Auftauen und erneutes Einfrieren der Proben zu vermeiden.

2.10.1 RNA-Isolierung mit Trizol®

Zur RNA-Isolierung wurden *Paramecium*-Kulturen zu Massenkulturen großgezogen und unter den zu untersuchenden Bedingungen kultiviert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation in der Öltest-Zentrifuge bei 1 500 rpm und RT für 2 min pelletiert. Anschließend wurden die Zellen für 1,5 h in Volvic-Wasser gesetzt um sie die restlichen Futterbakterien verdauen zu lassen, da diese ebenfalls RNA enthalten und dies zu falschen Ergebnissen führen kann. Nach dieser Hungerphase wurden die Zellen erneut pelletiert und direkt in 1 ml vorgekühltes Trizol-Reagenz getropft und durch vortexen zu einer homogenen Suspension gemischt. Die hier aufgeführten verwendeten Mengen beziehen sich auf 100 000 Zellen. Nach einer Inkubation von 5 min bei RT wurde der Suspension 200 µl Chloroform zugegeben und 15 s lang kräftig geschüttelt. Nach einer erneuten Inkubation von 2-3 min bei RT wurde für 15 min bei 4 °C und 12 000 x g zentrifugiert. Die nun zu sehende obere wässrige Phase enthält die Nukleinsäuren, während die Interphase aus Proteinen und Zelltrümmern besteht. Die wässrige Phase wurde vorsichtig, ohne die Interphase zu berühren, in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 750 µl kaltem Isopropanol vermischt und für mindestens 30 min bei -20°C inkubiert, wodurch die RNA-Moleküle ausfallen. Nach einer Zentrifugation von 15 min bei 4°C und 12 000 x g wurde der Überstand verworfen, das RNA-Pellet mit 1 ml Ethanol (75 %) gewaschen und erneut für 10 min bei 4°C und 7500 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde kurz getrocknet und dann in 50 µl mit DEPC behandeltem H_2O bidest. gelöst. Die Konzentration wurde anschließend mittels Nanodrop bestimmt.

2.10.2 Denaturierendes Agarosegel

Um die Integrität der RNA-Proben zu überprüfen, wurden in dieser Arbeit denaturierende Agarosegele (1 %ig) angefertigt. Hierzu wurde 1 g Agarose auf 100 ml 1xMOPS-Puffer eingewogen und durch aufkochen in der Mikrowelle gelöst. Die Lösung wurde abgekühlt bis sie Handwarm war und anschließend mit 7,5 ml Formaldehyd (37 %) und 4,5 µl Ethidiumbromid [10 mg/ml] vermischt und in den vorbereiteten Schlitten gegossen. Nachdem die Agarose auspolymerisiert und abgekühlt war, konnten die Proben geladen werden. Dafür wurden 1-15 µg an RNA mit zwei Volumen Loading-Dye versetzt, gemischt und für 5 min bei 65°C im Wasserbad erhitzt. Danach wurden die Proben schnell auf Eis gestellt und dann in die Taschen des Gels geladen. An die mit 1xMOPS-Puffer befüllte Gelkammer, in der der Schlitten mit dem Gel lag, wurde eine Spannung von 80 – 100 V für ca. 1 h angelegt. Da das Ethidiumbromid ein interkalierender und fluoreszierender Stoff ist, der sich an die Nukleinsäuren anlagert, konnten die RNA-Banden im Gel unter UV-Licht sichtbar gemacht und somit überprüft werden.

Loading-Dye

500 µl Formamid

160 µl Formaldehyd

100 µl 10xMOPS

175 µl Glycerin

50 µl Bromphenolblau (in H₂O DEPC gelöst)

10x MOPS

0,2 M MOPS

50 mM C₂H₃NaO₂

10 mM EDTA

ad 1 L H₂O DEPC

pH mit NaOH auf 7,0 einstellen (bei 4°C lagern)

2.10.3 Aufkonzentrieren der RNA

Für die meisten in dieser Arbeit verwendeten weiterführenden Methoden war es nötig, die RNA auf zu konzentrieren. So konnte eine größere Menge von 15 - 50 µg an RNA in einem kleinen Volumen aufgenommen werden um die Handhabung zu erleichtern oder erst zu ermöglichen. Für die Aufkonzentrierung wurden 15 - 50 µg RNA mit einem Zehntel Volumen Natriumacetat (3 M, pH 5) und drei Volumen Ethanol (100 %) versetzt und über Nacht bei -20°C gefällt. Der Ansatz wurde am folgenden Tag bei 4°C für 20 min und 13 000 rpm zentrifugiert. Das RNA-Pellet wurde mit einem Volumen Ethanol (90 %) gewaschen und das Pellet nach erneutem Zentrifugieren kurz an der Luft getrocknet. Das Pellet wurde in 5 µl H₂O bidest. gelöst, das mit DEPC versetzt war und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

2.10.4 Nachweis einer 3' Modifikation (β-Eliminierung)

RNA-Moleküle tragen oft eine Modifikation an ihrem 3' Ende. Um dies zu überprüfen wurden 15-20 µg der zu behandelnden RNA mit 1 ng eines Kontroll-Oligos versetzt und über Nacht aufkonzentriert (2.10.3). Die Chemikalie Periodat kann die Ringstruktur einer Ribose aufspalten, indem es zwei benachbarte Hydroxylgruppen oxidiert und die Ribose somit zu einem Dialdehyd aufspaltet. Diese offene Ringstruktur ist sehr instabil und kann leicht in einem zweiten Schritt abgespalten werden. Tragen die RNA-Moleküle eine Modifikation, wie zum Beispiel eine Methylierung an Stelle einer der notwendigen Hydroxylgruppe, ist die Reaktion blockiert. Tragen sie dagegen keine Modifizierung, so wie der Kontroll-Oligo, und stattdessen beide Hydroxylgruppen,

wird die Ringstruktur des letzten Nukleotids zu einem Dialdehyd oxidiert und anschließend durch eine β -Eliminierung abgespalten. Dies führt zu einem Größenunterschied und kann deshalb in einem Northernblot (2.10.5) nachvollzogen werden. Da das in die Reaktion eingesetzte Periodat lichtempfindlich ist, wurden die folgenden Schritte im Dunkeln durchgeführt. Das RNA-Pellet der Aufkonzentrierung wurde nicht in Wasser, sondern in 17,5 μ l Borax-Puffer I aufgenommen, mit 2,5 μ l Periodat-Lösung versetzt und durch auf- und ab-pipettieren gemischt. Der Ansatz wurde für 10 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch die Zugabe von 2 μ l Glycerin abgestoppt. Es wurde erneut 10 min im Dunkeln inkubiert. Um die Probe umpuffern zu können, wurde die Probe in einer Speedvak solange eingedampft, bis nur noch die RNA gelöst in den 2 μ l Glycerin vorlagen. Diese wurde dann in 50 μ l Borax-Puffer II gelöst und für 90 min bei 45°C inkubiert. Um die nun fertig behandelte RNA auf einen Northernblot auftragen zu können, musste sie erneut wie in 2.10.3 beschrieben, aufkonzentriert werden.

Borax-Puffer I (pH = 8,6)

4,375 mM Borax
50 mM Borsäure

Borax-Puffer II

33,75 mM Borax
50 mM Borsäure
pH-Wert mit NaOH auf 9,5 einstellen

Periodat-Lsg.

200 mM Natrium-Periodat

2.10.5 Northernblot der kleinen siRNA-Spezies

Um eine gute Auftrennung der kleinen RNA-Spezies gewährleisten zu können, wurden denaturierende Polyacrylamid-Gele mit einer Länge von 40 cm und einer Dicke von 0,4 mm verwendet. Für das Gießen dieser Gele wurden die Glasplatten der Gelkammer zunächst von Rückständen, Staub und RNAsen gesäubert. Hierzu wurden die Platten, der Kamm und die Spacer zuerst mit bidestilliertem und DEPC behandeltem Wasser abgerieben. Anschließend wurden sie zunächst mit 0,1 M Natronlauge und dann mit einer 0,1 %igen SDS-Lösung abgerieben. Alles wurde anschließend gut mit frischem bidestilliertem Wasser abgespült und mit Isopropanol trocken poliert. Nach dem Zusammenbauen der Apparatur wurde der Gelansatz vorbereitet. In dieser Arbeit wurden 15 %ige Gele verwendet. Für ein Gel wurden 16,8 g Harnstoff eingewogen, mit 5 ml DEPC behandeltem Wasser, mit 4 ml 10xTBE-Puffer versetzt und mit 15 ml Acrylamid-Bisacrylamid (19:1, 40 %) gemischt. Damit sich der Harnstoff in diesem Gemisch löst, wurde der Ansatz in einem Ultraschallbad inkubiert. Danach wurde der Ansatz auf 40 ml mit DEPC behandeltem Wasser aufgefüllt. Bevor 64 μ l TEMED und 35 μ l einer 15 %igen APS-Lösung zur Polymerisierung des Gels zugegeben wurden, wurde der Gelansatz auf Eis abgekühlt. Der komplette Gelansatz wurde in eine Spritze aufgezogen und über einen Mikroporenfilter mit einer Porengröße von 0,45 μ m in die Kammer gespritzt. Dabei wurde darauf geachtet, keine Luftblasen zu erzeugen. Nachdem das Gel nach etwa 2 h auspolymerisiert war, konnte der Vorlauf gestartet werden. Hierfür wurde die Kammer mit vorgewärmtem 1xTBE-Puffer gefüllt, die Taschen vom Harnstoff freigespült und für ca. 30-45 min eine elektrische Leistung von 65 W angelegt, sodass das Gel auf 50°C erwärmt wurde. In der Zwischenzeit konnten die Proben vorbereitet werden. Hierzu wurde die aufkonzentrierte RNA (20 μ g in 5 μ l) mit dem doppelten Volumen an Ladepuffer versetzt und bei 94°C für 3 min denaturiert. Der

verwendete Größenstandard wurde mit 10 µl H₂O DEPC versetzt und ebenfalls denaturiert. Die Proben wurden anschließend direkt auf Eis gestellt und dann auf das Gel geladen. Die Taschen wurden vor dem Beladen mit den Proben erneut gut ausgespült, da der Harnstoff in die Taschen diffundiert und zu Laufartefakten im Gel führen kann. Die Taschen, in denen keine Probe geladen wurde, wurden mit dem gleichen Volumen Ladepuffer versetzt um ein gleichmäßiges Wandern der RNA-Moleküle im Gel zu ermöglichen. Es wurde erneut eine elektrische Leistung von 65 W solange angelegt bis die Bromphenolblau-Bande des Ladepuffers das untere Ende der Kammer erreicht hatte.

15 % Ammoniumperoxidsulfat (APS)

0,25 g APS in 1,5 ml H₂O DEPC einwiegen

Ladepuffer

950 µl Formamid

50 µl Bromphenolblau (in H₂O DEPC)

20 µl EDTA (0,5M, pH 8)

10xTBE

107,8 g Tris

55,3 g Borsäure

7,44 g EDTA

ad 1 L H₂O DEPC

Während des Gellaufes wurden bereits das zum Blotten benötigte Whatmanpapier und eine Nylon-Membran auf die Größe des Gels zurechtgeschnitten und bereit gelegt. Die Vakuumblot-Kammer wurde aufgebaut und zunächst drei Lagen in 20xSSC getränktem Whatmanpapier aufeinander gelegt und von Luftblasen befreit. Anschließend wurde die Membran zunächst in 2xSSC und danach in 20xSSC getränkt und ebenfalls auf den Stapel gelegt. Nun wurde das Gel aus der Apparatur entnommen und zurecht geschnitten. Dieses wurde anschließend mit Hilfe einer Folie auf die Membran gelegt und ebenfalls von Luftblasen befreit. Zum Abschluss wurden noch einmal drei Lagen in 20xSSC getränktem Whatmanpapier aufgelegt. Der ganze Stapel wurde erneut mit 20xSSC übergossen und mit einer Gummifolie abgedeckt, in die Apparatur eingespannt und für 2 h durch das Anlegen eines Vakuums geblottet. Nach etwa 1 h wurde der ganze Stapel erneut mit 20xSSC getränkt.

Anschließend wurde der Blot abgebaut und die Membran zum crosslinken mit UV-Licht (Dosis: 70 kJ/cm²) bestrahlt. Die Membran wurde bei 60°C getrocknet und in Whatmanpapier bis zur Hybridisierung bei RT aufbewahrt.

20xSSC:

175,3 g NaCl

88,2 g C₆H₅Na₃O₇·2H₂O

ad 1 L H₂O DEPC

2.10.6 Northernblot von mRNA-Spezies

Um größere RNA-Moleküle gut auf eine Nylon-Membran blotten zu können, wurden 15 µg RNA aufkonzentriert (2.10.3) und durch ein denaturierendes Agarosegel (2.10.2) bei einer Spannung von 80 V für 1 h aufgetrennt. Während des Gellaufes, wurden Whatmanpapier und die Membran zugeschnitten. Nach Beendigung des Laufes wurde das Gel zurechtgeschnitten, sodass das Gel, die Membran und die Lagen Whatmanpapier dieselbe Größe aufwiesen. Das Gel wurde zweimal für 10

min in H₂O DEPC geschwenkt um überschüssiges Formaldehyd und Ethidiumbromid zu entfernen. Um einen guten Transfer der RNA auf die Membran zu ermöglichen, wurde das Gel anschließend für 10 min in 10xSSC geschwenkt. Anschließend wurden auf einem Stapel Papierhandtücher zunächst drei Lagen in 10xSSC getränktem Whatmanpapier aufgeschichtet. Die Nylon-Membran wurde zunächst in 1xSSC und dann in 10xSSC geschwenkt und auf den Stapel aufgelegt. Das Gel und weitere drei Lagen in 10xSSC getränktem Whatmanpapier wurden oben aufgeschichtet. Zuletzt wurde eine Brücke aus Whatmanpapier so aufgelegt, dass beide Enden des Papiers in einem Reservoir an 10xSSC enden. Da bei diesem Verfahren der Transfer der RNA auf die Membran allein durch den Sog der Flüssigkeit vermittelt wird, muss darauf geachtet werden, dass die Flüssigkeit über die Brücke nur durch das Gel laufen kann. Hierfür wurde ein Rahmen um den Blotstapel mit Parafilm gezogen und die einzelnen Bahnen mit Tesafilm zusammengeklebt. Zuletzt wurde der Blotstapel mit einer Glasplatte abgedeckt, mit einem Gewicht beschwert und über Nacht geblottet (vgl. Southernblot 2.11.4). Am folgenden Tag wurde der Blot abgebaut, unter UV-Licht überprüft ob noch RNA-Moleküle im Gel verblieben sind und die RNA bei einer Dosis von 70 kJ/cm² und UV-Licht kovalent an die Membran gebunden. Die Membran wurde getrocknet und in Whatmanpapier bei RT bis zur Verwendung gelagert.

2.10.7 Hybridisieren von Northernblots mit radioaktiv markierten Oligosonden

Zur Erkennung und Identifizierung spezifischer RNA-Spezies wurden die in dieser Arbeit hergestellten Blots mit Sonden hybridisiert, die zuvor radioaktiv markiert wurden. Aus einem PCR-Produkt generierte Sonden (2.10.7.2) wurden über Nacht bei 42°C hybridisiert; Sonden aus Oligonukleotiden (2.10.7.1), wurden über Nacht bei 33°C hybridisiert. Die Hybridisierung mit der Ladekontrolle (Gln t-RNA) erfolgte über Nacht bei 60°C. Auch der in dieser Arbeit hergestellte Southernblot (2.11.4) wurde mit einer GFP-Sonde über Nacht bei 60°C in Churchpuffer hybridisiert. Ebenfalls bei 60°C wurden die Northernblots für mRNA-Spezies über Nacht hybridisiert. Die Prä- und Hybridisierungsschritte fanden in Churchpuffer statt. Das Waschen der Blots geschah bei derselben Temperatur wie das Hybridisieren. Das Signal wurde mittels Auflegen eines Screens aufgefangen und ausgelesen.

Churchpuffer

70 g SDS
0,37 g EDTA
250 ml Phosphatpuffer (1 M, pH 7,2)
10 g BSA Fraktion V
ad 1 L H₂O bidest.

Phosphatpuffer (1M)

70,3 g Na₂HPO₄
4 ml H₃PO₄ (85 %)
ad 1l H₂O bidest.
pH-Wert auf 7,2 einstellen

2.10.7.1. 5' Markierung mittels ATP [γ -³²P]

Für diese Markierungsreaktion wurden in dieser Arbeit Oligosonden verwendet. Dabei wurde den Oligos an ihrem 5' Ende ein radioaktiv markiertes [γ -³²P]-Phosphat durch die T4-Polynukleotidkinase (T4-PNK) angehängt. Hierzu wurden 5 µl [10 pmol] des Oligos für 3 min bei 95°C denaturiert und anschließend auf Eis abgekühlt. Dem Ansatz wurden 2 µl T4-PNK-Puffer und 1,5 µl des radioaktiven Phosphats, ATP [γ -³²P] zugegeben und gemischt. Dies entspricht einer Aktivität von 15 µCi (3 000

Ci/mmol). Nach der Zugabe von 1 µl Enzym (10 U) wurde der Ansatz auf 20 µl mit Wasser aufgefüllt und für 30 min bei 37°C inkubiert. Danach wurde der Ansatz auf 50 µl mit STE-Puffer aufgefüllt und über Sephadex G-50-Säulen (illustra ProbeQuant™ G-50 Micro, GE/Amersham) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt. Das Eluat der Säulen wurde mit einem Strahlenmessgerät gemessen. Sie wurde zu 15 ml vorgewärmtem Churchpuffer gegeben und ein Blot damit über Nacht hybridisiert.

2.10.7.2 Markierung mittels dCTP [α - 32 P]

Um doppelsträngige DNA-Sonden zu generieren, wurden in dieser Arbeit PCR-Produkte verwendet, die durch die Klenow-Polymerase (exo-)amplifiziert und dabei mittels dCTP [α - 32 P] markiert werden. Dabei wurden random Primer und radioaktiv markiertes dCTP [α - 32 P] benutzt. Für die Reaktion wurden 100 ng des aus einem Agarosegel aufgereinigten PCR-Produktes in 33 µl Wasser aufgenommen. Das PCR-Produkt wurde für 5 min bei 95°C denaturiert und danach direkt auf Eis gestellt. Danach wurden 5 µl Puffer mit Random-Octameren [400 ng/µl] und 6 µl eines dNTP-Mixes (dATP, dGTP, dTTP, je 0,5 mM) zugegeben. Anschließend wurden 5 µl des radioaktiven α - 32 P dCTP und 1 µl Enzym (5 U) zugegeben und gemischt. Dies entspricht einer Aktivität von 50 µCi. Der Ansatz wurde für 1 - 1,5 h bei 37°C inkubiert und anschließend wurde die Reaktion durch die Zugabe von 5 µl EDTA (200 mM, pH 8) abgestoppt. Im Anschluss wurde der Ansatz nach Angaben des Herstellers über eine Sephadex G-50-Säule aufgereinigt. Das Eluat der Säulen wurde mit einem Strahlenmessgerät gemessen. Die fertige Sonde sollte eine Strahlung von mindestens 10 000 KIPS aufweisen. Um zu verhindern, dass sich die komplementären markierten Stränge zu einem Doppelstrang zusammenlagern, wurde erneut für 5 min bei 95°C denaturiert. Die nun radioaktiv markierte Sonde wurde dann zu 15 ml vorgewärmtem Churchpuffer gegeben und ein Blot damit über Nacht hybridisiert.

2.10.7.3 Waschen der markierten Northernblots

Nach dem Hybridisieren der Blots wurde der Church-Puffer, der die radioaktiv markierte Sonde enthält, entfernt und zur weiteren Verwendung bei -20°C eingefroren. Die Blots wurden bei der jeweiligen Hybridisierungstemperatur mit steigender Stringenz gewaschen. Zuerst 5 min, dann weitere 30 min mit Waschpuffer 1; anschließend 5 min gefolgt von weiteren 30 min mit Waschpuffer 2. Die Blots wurden in Folie eingeschweißt und mit einem Screen zur Auffangung des Signals bedeckt. Das aufgefangene Signal konnte dann am Typhoon Trio-Imager (GEHealthcare) detektiert und mit Hilfe des Programms ImageQuant TL in ein Bild übersetzt werden.

Waschpuffer 1

2 x SSC

0,1 % (w/v) SDS

Waschpuffer 2

0,2 x SSC

0,1 % (w/v) SDS

2.10.7.4 Strippen von Northernblots

Zum Ablösen von hybridisierten Sonden wurden die Blots in einer SDS-Lösung [0,1 % (w/v)] aufgekocht und langsam in dieser Lösung abgekühlt. Die Blots konnten so wiederverwendet werden.

2.11 DNA-chemische Methoden

2.11.1 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Größenauftrennung von DNA-Fragmenten wurden in dieser Arbeit 1 %ige Agarosegele verwendet. Hierzu wurde 1 g Agarose auf 100 ml 1xTAE-Puffer eingewogen und durch aufkochen in

der Mikrowelle gelöst. Nach kurzem Abkühlen wurde der Ansatz in den vorbereiteten Schlitten gegossen. Nach dem Auspolymerisieren und Abkühlen wurde es mit 1xTAE-Puffer überschichtet und mit den Proben beladen. Diese wurden zuvor mit Loading-Dye versetzt, sodass sie in die Taschen absinken. Anschließend wurde eine Spannung von 80 – 100 V für ca. 1 h angelegt und die Fragmente elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel mit Ethidiumbromid angefärbt um die DNA-Banden im Gel unter UV-Licht sichtbar machen zu können und zu dokumentieren.

50xTAE

243 g Tris

3,72 g EDTA

57,1 ml Eisessig

ad 1 L H₂O bidest.

pH-Wert auf 7,8 mit HCl einstellen

2.11.2 Polymerasen-Kettenreaktion (PCR)

DNA-Fragmente wurden in dieser Arbeit mittels der PCR-Methode (Mullis *et al*, 1986) amplifiziert um sie zu vervielfältigen. Dabei wurde zum einen die Taq-Polymerase (Axon Labortechnik) und zum anderen die Phusion[®] High-Fidelity Polymerase (New England Biolabs) unter Standardbedingungen nach Angaben des Herstellers verwendet. Die Phusion[®]-Polymerase weist eine Proofreading-Funktion auf und macht somit statistisch weniger Fehler. Diese wurde verwendet, wenn das PCR-Produkt für Klonierungen weiterverwendet wurde.

2.11.2.1 Quantitative PCR (real time)

Transkriptmengen einzelner Gene wurden in dieser Arbeit mittels quantitativer PCR analysiert. Hierzu wurde Gesamt-RNA mit Hilfe von polyT-Primern in eine cDNA umgeschrieben und dann mit Genspezifischen Primern analysiert. Zuvor wurde ein DNase Verdau durchgeführt um eventuell vorhandene DNA-Kontaminationen in der RNA-Probe zu beseitigen. Hierfür wurden 8 µg der isolierten RNA (2.10.1) mit 4 U DNase in einem 50 µl Ansatz für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz über eine Säule mit dem RNeasy[®] MinElute[®] Cleanup Kit von Qiagen nach Herstellerangaben aufgereinigt. Es wurden 500 ng der aufgereinigten RNA in die cDNA-Synthesereaktion eingesetzt. Diese wurden mit 1 µl polyT-Primern [100 pmol/µl] und 1 µl dNTPs [Gemisch aus je 10 mM dCTP, dATP, dGTP und dTTP] versetzt und bei 70°C für 5 min denaturiert. Anschließend wurde der Ansatz für weitere 5 min in Eiswasser gekühlt. Es wurden dann 1 µl M-MLV reverse Transkriptase, 1 µl RNase-Inhibitor und die entsprechende Menge Puffer nach Herstellerangaben zugegeben, gemischt und auf 25 µl mit DEPC behandeltem Wasser aufgefüllt. Die Reaktion wurde in einem Thermocycler durchgeführt. Hierfür wurde der Ansatz zunächst für 1 h bei 42°C, danach für 15 min bei 70°C inkubiert und letztlich auf 4°C abgekühlt. Es wurde zudem eine noRT-Kontrolle durchgeführt, der kein Enzym zugegeben wurde um zu testen ob noch DNA-Kontaminationen enthalten waren. Um die Transkriptmenge einzelner Gene analysieren zu können, wurde 1 µl der zu cDNA umgeschriebenen RNA mit genspezifischen Primern versetzt und 5x EvaGreen-Mix, der auch eine Polymerase beinhaltet, nach Herstellerangaben zugegeben und der Ansatz auf 10 µl aufgefüllt. Anschließend wurde die PCR-Reaktion unter Standardbedingungen mit Hilfe des CFX Connect realtime Systems (Biorad) durchgeführt und dokumentiert. Dabei wurde die fluoreszierende Wirkung des EvaGreen-Mix ausgenutzt. Der Farbstoff fluoresziert nur, wenn er an doppelsträngige DNA bindet. Somit kann an Hand der Zunahme des Fluoreszenzsignals die Entstehung der Amplifikate der doppelsträngigen cDNA-Moleküle während der exponentiellen Phase detektiert werden. Die Quantifizierung des gemessenen Fluoreszenzsignals und damit der

Transkriptmenge wurde nach Pfaffl (2001) durchgeführt. Hierbei wurden die Signale mit denen der Housekeeping Gene *actin1-1* und *GAPDH* verglichen und zu Ihnen normalisiert. Dafür war es notwendig die Amplifikationseffizienz (E) zu bestimmen. Diese betrug bei allen getesteten Primerpaaren durchschnittlich 1,9 und wurde der Quantifizierung der Produkte zu Grunde gelegt. Die Transkriptmenge konnte schließlich mit der Formel:

$$\text{Ratio} = E^{-\Delta CP (\text{Kontrolle-Probe})}$$

berechnet werden (Pfaffl, 2001), wobei CP für den „crossing point“ steht. Dieser CP-Wert gibt die Zykluszahl an, an der sich das Fluoreszenzsignal vom Hintergrund abhebt und die exponentielle Amplifikationsphase beginnt.

2.11.3 Isolierung intakter Chromosomen aus *Paramecium*

Für die Isolierung intakter Chromosomen aus *Paramecium*-Zellen wurde stets darauf geachtet, dass keine oder nur geringe Scherkräfte auf die DNA wirken. Für die Isolierung wurde eine Zellkultur auf 100 000 Zellen großgezogen. Diese wurde in der Öltest-Zentrifuge bei 1 500 rpm und RT für 2 min pelletiert und anschließend für 1,5 h in Volvic-Wasser gesetzt, sodass die *Paramecien* die noch in ihren Futtervakuolen enthaltenen Bakterien verdauen und ausscheiden. Nach erneutem Zentrifugieren in der Öltest-Zentrifuge wurde der Überstand bis auf 500 µl abgesaugt. Der Zellsuspension wurden 2 ml Lysepuffer, die auf 55°C vorgewärmt waren, und 250 µl einer Proteinase K-Lösung [10 mg/ml] zugegeben und vermischt. Der Ansatz wurde ÜN bei 55°C inkubiert um die Zellen aufzuschließen und Proteine wie z.B. DNAsen abzubauen. Am folgenden Tag wurde 725 µl Roti-Phenol (pH 8) zugegeben und für 1 h bei RT auf einem Blotroller inkubiert. Der Ansatz wurde in ein 15 ml Greinerröhrchen überführt und für 2 min bei RT und 1 000 rpm in einem Schwingrotor vorsichtig zentrifugiert. Nach einer kurzen Ruhephase bei RT, in der sich die Phasen noch besser trennen konnten, wurde die untere Phase, welche die Nukleinsäuren enthält, vorsichtig in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Probe wurde erneut für 2 min bei RT und 13 000 rpm zentrifugiert um letzte Trübstoffe und Schwebeteilchen zu pelletieren. Der Überstand, der die Nukleinsäuren enthält wurde nun über Dialyseschläuche aufgereinigt. Die in dieser Arbeit verwendeten Schläuche wiesen einen Cutoff von 12 kDa auf und wurden vor der Verwendung für 15 min in heißem H₂O bidest. inkubiert und an einem Ende zugeknötet. Nun wurden die Proben eingefüllt, die Schläuche geschlossen und in 2 L 1xTE-Puffer inkubiert, welchen zuvor 25 % Ethanol zugemischt wurde. Nach einer Inkubation von 2 h wurde der Puffer getauscht und der Ansatz erneut für 2 h in 2 L 1xTE-Puffer, versetzt mit 25 % Ethanol, inkubiert. Zuletzt wurde der Ansatz ÜN in erneut 2 L 1xTE-Puffer ohne Ethanol inkubiert. Am folgenden Tag wurde die Probe aus den Schläuchen in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und mittels Nanodrop die Konzentration bestimmt. Die Proben wurden bis zur Verwendung bei 4°C gelagert.

Da die Probe aus gesamt Nukleinsäuren besteht, wurde zunächst noch ein RNase-Verdau durchgeführt. Hierzu wurden 1,5 ml der Probe mit 3 µl RNase A [10 mg/ml] versetzt und für 20 min bei RT inkubiert. Der Ansatz wurde danach mit Phenol aufgereinigt. Hierfür wurden 1,5 ml Roti-Phenol (pH 8) und 150 µl Natriumacetat (3 M, pH 9) zugegeben und für 5 min bei RT und 4 000 rpm in einem Schwingrotor zentrifugiert. Die obere Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und 1,5 ml Chloroform zugegeben. Der Ansatz wurde invertiert und erneut für 5 min bei RT und 4 000rpm im Schwingrotor zentrifugiert. Die obere Phase wurde erneut in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit die DNA daraus durch die Zugabe von 1,5 ml Isopropanol ÜN bei -20°C gefällt. Am folgenden Tag wurde die DNA durch die Zentrifugation für 15 min bei 5 000 rpm und RT pelletiert.

Das Pellet wurde mit 1 ml Ethanol (80 %ig) gewaschen und nach erneutem Zentrifugieren für 10 min bei gleichen Bedingungen wurde die DNA kurz an der Luft getrocknet. Das trockene Pellet wurde in 30 μ l Tris (10 mM, pH 8) aufgenommen und die Konzentration erneut mittels Nanodrop bestimmt. Die Proben wurden bis zur Verwendung bei 4°C gelagert.

Lysepuffer

10 ml EDTA (0,5 M, pH 9)

333 μ l N-Lauroylsarcosin Natriumsalzlösung (30 %)

1 g SDS

ad 100 ml H₂O bidest.

2.11.4 Southernblot

Um DNA auf eine Membran übertragen zu können, wurden 2 μ g der isolierten intakten Chromosomen (2.11.3) auf ein Agarosegel (2.11.1) geladen und elektrophoretisch aufgetrennt. Das Gel wurde anschließend mit Ethidiumbromid gefärbt und dokumentiert. Die Banden des Markers wurden mit einem Skalpell auf dem Gel markiert. Das Gel wurde danach für 15 min in 0,25 M HCl und anschließend für 20 min in Denaturierungslösung geschwenkt. Danach wurde das Gel zweimal für je 15 min in Neutralisierungslösung inkubiert. In der Zwischenzeit konnte der Blot aufgebaut werden. Hierfür wurden das Whatmanpapier und eine Nylon-Membran auf die Größe des Gels zugeschnitten. Anschließend wurden auf einem Stapel Papierhandtücher zunächst 3 Lagen in 20xSSC getränktem Whatmanpapier aufgeschichtet. Die Nylon-Membran wurde zunächst in 2xSSC und dann in 20xSSC geschwenkt und auf den Stapel aufgelegt. Das Gel und weitere 3 Lagen in 20xSSC getränktem Whatmanpapier wurden oben aufgeschichtet. Zuletzt wurde eine Brücke aus Whatmanpapier so aufgelegt, dass beide Enden des Papiers in einem Reservoir an 20xSSC enden. Der Blotaufbau ist schematisch in Abbildung 2.2 dargestellt. Da bei diesem Verfahren der Transfer der DNA auf die Membran nur durch das Fließen der Flüssigkeit und Druck durchgeführt wird, musste darauf geachtet werden, dass die Flüssigkeit über die Brücke nur durch das Gel laufen kann. Hierfür wurde ein Rahmen um den Blotstapel mit Parafilm gezogen und die einzelnen Bahnen mit Tesafilm zusammengeklebt. Zuletzt wurde der Blotstapel mit einer Glasplatte abgedeckt, mit einem Gewicht beschwert und für 16-24 h geblottet (vgl. Northernblot von mRNA-Spezies 2.10.6). Am folgenden Tag wurde der Blot abgebaut, unter UV-Licht überprüft ob noch RNA-Moleküle im Gel verblieben sind und die RNA bei einer Dosis von 70 kJ/cm² und UV-Licht kovalent an die Membran gebunden. Die Membran wurde getrocknet und in Whatmanpapier bei RT bis zur Verwendung gelagert.

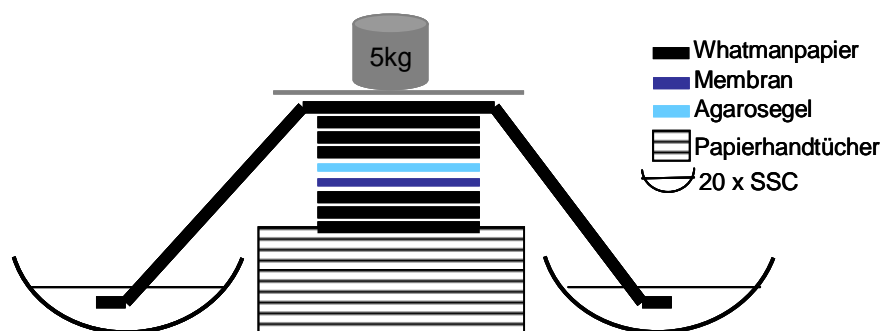


Abbildung 2.2 : Schematische Darstellung des Aufbaus eines Southernblots. Auf einem Papierhandtuchstapel (Grau liniert) sind 3 Lagen Whatmanpapier (Schwarz), die Membran (Dunkelblau), das Gel (Hellblau) und erneut 3 Lagen Whatmanpapier aufgeschichtet. Eine Brücke aus Whatmanpapier verbindet das Flüssigkeitsreservoir aus 20xSSC mit dem Blot, welcher durch eine Glasplatte abgedeckt und durch ein Gewicht beschwert ist.

Denaturierungslösung

87,66 g NaCl

20 g NaOHad 1 L mit H₂O bidest.Neutralisierungslösung

60,57 g Tris

87,66 g NaCl

2 ml EDTA (0,5M, pH 8)ad 1 L mit H₂O bidest.

pH-Wert auf 7,2 mit HCl einstellen

2.12 Protein-chemische Methoden

2.12.1 Gesamt-Proteinisolierung aus *Paramecium*

Eine Kultur von 200 000 Zellen wurde zunächst über Gaze abfiltriert und anschließend in der Öltest-Zentrifuge für 2 min bei RT und 1 500 rpm abzentrifugiert. Um die Bakterien aus ihren Futtervakuolen verdauen zu können, wurden die Zellen für 1,5 h in Volvic-Wasser gesetzt. Nach erneutem Zentrifugieren wurden die Zellen mit 25 ml 1xPBS gewaschen. Der Überstand wurde nach dem pelletieren der Zellen mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe bis auf 5 ml abgesaugt. Von diesen 5 ml Zellsuspension wurde ein 100 µl Aliquot abgenommen und bei -80°C schockgefroren. Die restliche Zellsuspension wurde in ein 50er Greinerröhrchen überführt und ebenfalls bei -80°C eingefroren.

Die 100 µl galten als Referenzprobe um die Proteinkonzentration in der 5 ml-Fraktion berechnen zu können und wurde hierfür am Nanodrop bei einer Wellenlänge von $\lambda = 280$ nm gemessen. Die gemessene Proteinkonzentration in [mg/ml] konnte somit auf die 5 ml hochgerechnet werden.

Zu der 5 ml-Zellsuspension wurden noch im gefrorenen Zustand 280 µl *cOmplete*[®] (Roche), einem Protease-Inhibitor-Gemisch nach Herstellerangaben, 8 ml Methanol und 2 ml Chloroform zugegeben und solange gevortext bis eine homogene Mischung vorhanden war. Nach der Zugabe von 6 ml Wasser wurde für 10 min bei 4°C und 8 500 rpm zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde vorsichtig abgenommen ohne die Interphase, in der sich die Proteine ablagern, zu beschädigen. Anschließend wurden erneut 6 ml Methanol zugegeben und wieder für 10 min bei 8 500 rpm und 4°C zentrifugiert. Die Proteine befinden sich dann im gebildeten Pellet. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen. Das Proteinpellet luftgetrocknet und anschließend in einer Menge an 1xLämmli-puffer, versetzt mit 5 % β -Mercaptoethanol, aufgenommen, sodass 40 µg Protein in eine Spur eines SDS-Gels geladen werden konnten. Die Menge an 1xLämmli wurde an Hand der Referenzprobe berechnet. Die so erhaltene Proteinlösung wurde 3 min in einem Wasserbad gekocht und anschließend bei -20°C bis zur Verwendung gelagert.

Wahlweise wurden die Zellen nach einer Hungerphase von 45 min in Volvic abzentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Zellpellet in kochendem 1xLämmli-puffer gelöst. Der Ansatz wurde in ein Ependorff-Reaktionsgefäß überführt und für 3 min weiter gekocht. Nach dem Abkühlen auf Eis wurden die Proben bis zur Verwendung bei -20°C gelagert. Nachdem hierbei keine Konzentrationsbestimmung erfolgte, wurden Zelläquivalente Mengen auf das anschließende SDS-Gel geladen. Dies bedeutet, dass gleich viele Zellen verschiedener Kulturen in jeweils derselben Menge 1xLämmli-puffer aufgeköcht wurden und anschließend gleiche Volumina dieses Lysats auf das SDS-Gel geladen wurden. Wurden zum Beispiel 200 000 Zellen in 200 µl aufgeköcht und je 5 µl auf das SDS-Gel geladen, so entspricht das der Zelläquivalenten Proteinmenge von 5 000 Zellen.

4xLämmli-puffer

8 g SDS

0,01 g Bromphenolblau

25 ml Tris-Cl (960mM, pH 6,8)

40 ml Glycerinad 80 ml mit H₂O bidest.mit 20 % (v/v) β -Mercaptoethanol versetzen**2.12.2 Isolierung intakter Nuclei aus *Paramecium***

Um intakte Kerne aus *Paramecium*-Zellen zu isolieren, wurden 200 000 Zellen über 8 Lagen Gaze gefiltert und in der Öltest-Zentrifuge für 2 min bei RT und 1 500 rpm abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 100 ml Trislösung (10 mM, pH 7) resuspendiert und ca. 30 min darin hungern gelassen. Dies dient, wie auch die Inkubation in Volvic-Wasser dazu, dass die noch mit Bakterien gefüllten Futtervakuolen verdaut und geleert werden. Nach erneutem Zentrifugieren wurde der Überstand auf 2 ml mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt, die Zellen darin resuspendiert und erneut zentrifugiert. Nach der vollständigen Abnahme des Überstands und der Resuspendierung des Zellpellets in 5 ml Lysepuffer wurde der Ansatz in den Potter überführt und darin 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde 30-50 mal gestampft, sodass die Zellen mechanisch aufgeschlossen wurden. Dann wurden 40 ml Waschpuffer zugegeben und der Ansatz in ein 50er Greinerröhrchen überführt und bei 2500 rpm bei 4°C für 10 min in einem Schwingrotor zentrifugiert. Der Waschschrift mit anschließender Zentrifugation wurde wiederholt. Zur Kontrolle der Isolation wurde von dem erhaltenen Kernpellet eine DAPI-Färbung angefertigt (2.8.3). Wenn die Kerne frei von Zelltrümmern vorlagen, wurde erneut für 10 min bei 4°C mit 6000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut vollständig abgenommen und die Kerne in heißem 1xLämmli-puffer, mit 5 % β -Mercaptoethanol versetzt, gelöst und 3 min in einem Wasserbad aufgeköcht. Die isolierten Kerne wurden bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

Trislösung

10mM Tris

pH-Wert auf 7,4 mit HCl einstellen

Lysepuffer

0,25M Saccharose

10mM MgCl₂

10mM Tris

0,2 % (v/v) Nonidet P-40

pH auf 6,8 mit HCL einstellen

1 %(w/v) NaN₃ bei BedarfWaschpuffer

0,25M Saccharose

10mM MgCl₂10mM Tris

pH auf 7,4 mit HCL einstellen

2.12.3 Nodium-Dodecylsulfat-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung von Proteinen nach dem Molekulargewicht wurden sogenannte Nodium-Dodecylsulfat-Gele gegossen. Um auch kleine Proteine auftrennen zu können, wurden zuerst 16 %ige Trenngele zwischen zuvor abgedichtete Platten gegossen und nach dem Auspolymerisieren mit einem

4 % Sammelgel überschichtet. Die verwendeten chemischen Stoffe sowie deren Menge sind in Tabelle 2.8 aufgelistet. Für diese Art von Gelen wurde eine Acrylamid-Bisacrylamidlösung (30 %) verwendet, die ein Verhältnis von Acrylamid zu Bisacrylamid von 29:1 aufweist. Die Gele wurden nach dem Auspolymerisieren in feuchte Tücher gewickelt und kühl bei 4°C bis zur Verwendung aufbewahrt. Für den Lauf wurden die Gele mit 1xLämmli-Laufpuffer überschichtet, die Proben geladen und leere Taschen mit 1xLämmli-puffer aufgefüllt. Die Kammer wurde an die Stromquelle angeschlossen und dabei wurden 50 mV für etwa 2 h angelegt.

Tabelle 2.8: Gelansätze der Natrium-Dodecylsulfat-Elektrophorese. Aufgelistet sind die verwendeten chemischen Stoffe und deren Menge zum Gießen eines SDS-Gels.

Chemischer Stoff	Trenngel (16 %)	Sammelgel
Acrylamid (30 %, 29:1)	9 ml	830 µl
Trenngelpuffer	3,5 ml	-
Sammelgelpuffer	-	500 µl
SDS (10 %)	167 µl	50 µl
Wasser	4,2 ml	3,6 ml
TEMED	10 µl	5 µl
Ammoniumperoxidsulfat (APS) (10 %)	100 µl	10 µl

Trenngelpuffer

36,3g Tris
ad 200 ml H₂O bidest.
pH-Wert mit HCl auf 8,8 einstellen

Sammelgelpuffer

12 g Tris
ad 200 ml H₂O bidest.
pH-Wert mit HCl auf 6,8 einstellen

Lämmli-Laufpuffer

15 g Tris
5 g SDS
72 g Glycin
ad 5 L H₂O bidest.
pH-Wert sollte 8,27 aufweisen

Zur Detektion von Proteinbanden wurden die Gele entweder mit einer Coomassie-Lösung ÜN gefärbt und danach zunächst mit Entfärbelösung I und anschließend mit Entfärbelösung II entfärbt oder mit einer Blue-Silver-Lösung sichtbar gemacht. Hierfür wurde das SDS-Gel nach beenden des Laufes zunächst 2 h in einer Fixierlösung fixiert. Danach wurde zweimal für 15 min mit H₂O bidest. gewaschen und schließlich ÜN mit der Blue-Silver-Lösung gefärbt. Zur Kontrasterhöhung wurde wieder mit H₂O bidest. entfärbt.

Coomassie-Lösung

2 g Coomassie Brillant Blau R250
0,5 g Coomassie Brillant Blau G250
475 ml EtOH (technisch)
425 ml H₂O bidest.
100 ml Eisessig

Entfärbelösung I

450 ml EtOH (technisch)
450 ml H₂O bidest.
100 ml Essigsäure (100 %, technisch)

Entfärbelösung II

930 ml H₂O bidest
70 ml Essigsäure (100 %, technisch)

Fixierlösung

400 ml EtOH (technisch)
100 ml Essigsäure (technisch)
ad 1 L H₂O bidest.

Blue-Silver-Lösung

50 ml H₂O bidest.
50 ml Phosphorsäure
50 g Ammoniumsulfat
0,6 g Coomassie Brillant Blau G250
100 ml Methanol
ad 500 ml H₂O bidest.

2.12.4 Westernblot

Zur Bindung von Proteinen an eine Membran und anschließender Immunmarkierung wurden in dieser Arbeit Westernblots angefertigt. Hierbei wurden die in einem SDS-Page (2.12.3) aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulosemembran durch Anlegen einer Spannung übertragen. Der Blot wurde folgendermaßen aufgebaut: auf einer Graphitplatte mit Anschluss an eine Spannungs- bzw. Stromquelle wurden zunächst 2-3 Lagen zurechtgeschnittenem, in 1xBlotpuffer getränktem Whatmanpapier gelegt. Darauf wurde die Nylonmembran gelegt. Dann wurde das SDS-Trenngel ebenfalls zurechtgeschnitten und auf die Membran gelegt. Wichtig für den späteren Transfer der Proteine aus dem Gel auf die Membran war es, hier die Luftblasen zu entfernen. Dies geschah durch ausrollen mit einer Pasteurpipette. Abschließend wurden nochmals 2-3 Lagen mit 1xBlotpuffer durchtränktem Whatmanpapier aufgelegt. Der gesamte Aufbau wurde vor dem schließen mit einer zweiten Graphitplatte nochmals mit 1xBlotpuffer übergossen. An die Graphitplatten wurde eine Stromstärke von 150 mA für 2,5 h angelegt.

Um den Transfer der Proteine auf die Membran zu überprüfen, wurde die Membran mit Ponceau-S-Lösung angefärbt, auf Whatmanpapier getrocknet und bis zur Verwendung bei RT gelagert.

10xBlotpuffer

30,3 g Tris
144 g Glycin
5 g SDS
ad 1 L H₂O bidest.

1xBlotpuffer

100 ml 10xBlotpuffer
0,5 ml 20 % SDS-Lsg.
200ml Methanol
ad 1 L H₂O bidest.

Ponceau -S- Lösung

0,2 g Ponceau S

200 ml Essigsäure (5 %ig)

Der fertige Westernblot wurde mit spezifischen Antikörpern dekoriert und somit spezifische Proteinbanden detektiert und analysiert. Hierfür wurde der Blot für mindestens 30 min mit einer 5 %igen Milchpulver-Lösung beblockt. Dies führt dazu, dass die noch freien Stellen der Membran blockiert sind. Da Antikörper ja auch Proteine sind, würden diese sonst unspezifisch an die Membran binden und somit zu falschen Ergebnissen führen. Nach dem Blocken wurde der Blot mit dem primären Antikörper in einer spezifischen Verdünnung in 1xPBS bzw. 1xTBS über Nacht bei 4°C rollend mit dem Blot inkubiert. Am folgenden Tag wurde der Blot viermal für je 10 min mit 1xPBS bzw. 1xTBS gewaschen. Der sekundäre Antikörper wurde so gewählt, dass er spezifisch für das Tier ist, aus dem der primäre Antikörper gewonnen wurde. Der sekundäre Anti-Maus-Antikörper wurde 1:3 000 verdünnt, der sekundäre Anti-Hase-Antikörper wurde 1:5 000 verdünnt eingesetzt und jeweils für 1 h bei RT rollend mit dem Blot inkubiert. Zudem tragen diese sekundären Antikörper eine Meerrettich-Peroxidase, welche zusammen mit den zur Detektion benötigten Ecl-Lösungen eine Lichtreaktion auslöst. Nach erneutem viermaligem Waschen des Blots für je 10 min mit 1xPBS bzw. 1xTBS, konnte der Blot entwickelt werden. Hierfür wurde der dekorierte Blot in eine Klarsichtfolie gelegt, zuerst mit 1 ml Ecl I überschichtet und anschließend mit 1 ml Ecl II bedeckt. Die Lösungen wurden gut verteilt und danach ausgestrichen. Die nun stattfindende Reaktion der Peroxidase konnte mit dem Kamerasystem "Proteinsimple" der Firma Biozym dokumentiert werden.

Milchpulver-Lösung

5 g Milchpulver

100 ml 1xTBS bzw. 1xPBS

10xPBS

80 g NaCl

2 g KCl

14,4 g Na₂HPO₄

2,4 g KH₂PO₄

ad 1 L H₂O bidest.

pH mit KOH (3M) auf 7,4 einstellen

10xTBS:

90 g NaCl

100 ml Tris-Cl (1M, pH 7,4)

ad 1 L H₂O bidest.

Ecl I

4 ml H₂O bidest.

500 µl Tris (1M, pH 8,5)

22 µl p-Coumarinsäure –Stocklösung

50 µl Luminol-Stocklösung

ad 5 ml H₂O bidest.

Ecl II

4 ml H₂O bidest.
 500 µl Tris (1M, pH 8,5)
3 µl H₂O₂ (30 %)
 ad 5 ml H₂O bidest.

p-Coumarinsäure –Stocklösung

0,15 g p-Coumarinsäure
10 ml DMSO
 In Aliquots bei -20°C lagern

Luminol-Stocklösung

0,44g Luminol
10 ml DMSO
 In Aliquots bei -20°C lagern

Westernblots konnten mehrmals verwendet und dekoriert werden. War das Strippen des Blots erforderlich, wurde der Blot für 15 min in 0,2 M Natronlauge geschwenkt und anschließend für 10 min mit 1xPBS bzw. 1xTBS gewaschen. Diese Prozedur wurde wiederholt. Anschließend wurde erneut zweimal für je 10 min mit 1xPBS bzw. 1xTBS gewaschen. Dann konnte der Blot erneut geblockt und dekoriert werden.

2.12.5 Dotblot

Um die Spezifität eines Antikörpers zu testen, wurden in dieser Arbeit Dotblots durchgeführt. Dabei wurden verschiedene Mengen des Immunogens oder auch gesamt-Protein in kleinen Volumen auf eine Nitrocellulosemembran als Dot aufgetragen, an der Luft getrocknet und anschließend wie ein Westernblot (2.13.3) mit Antikörpern dekoriert und entwickelt.

2.12.6 Überexpression der Antigene in *E. coli*

Zunächst wurde ein hydrophiler Bereich der Aminosäuresequenz des *hen1*-Gens ausgewählt, der als Epitop dienen soll. So ist gewährleistet, dass der Bereich am wahrscheinlichsten aus dem Protein ragt und somit für den späteren Antikörper zugänglich ist. Hierfür wurde ein Teilbereich der katalytischen Domäne gewählt. Dieser umspannt die Aminosäuren 33 bis einschließlich 180 der Hen1-Proteinsequenz (GSPATG00036636001, ParameciumDB (<http://paramecium.cgm.cnrs-gif.fr>)).

Der Bereich wurde mit dem Proteom von *Paramecium* abgeglichen um Kreuzreaktionen zu vermeiden. Es konnten jedoch keine möglichen Kreuzreaktionen detektiert werden. Diese AS-Sequenz wurde mit einer *Xho*I- an der einen und einer *Hind*III-Schnittstelle an der anderen Seite versehen. Zusätzlich wurde ein Stoppkodon vor die *Hind*III-Schnittstelle gesetzt und in den Kodoncode von *E. coli* umgeschrieben. Die Firma GenScript wurde beauftragt dieses Antigen zu synthetisieren. Die bestellten Antigene wurden im Plasmid pUC57 geliefert, das eine Ampicillin-Resistenz (A) trägt. Das Plasmid wurde in *E. coli SURE* per Elektroporation transformiert (2.9.2.1) um es zu vermehren. Da *E. coli SURE* eine genomische Resistenz gegen Kanamycin und Tetracyclin (T) aufweist, wurde der Transformationsansatz auf LB-TA Platten selektiert. Ampicillin für das Plasmid pUC57 und Tetracyclin für den Stamm *E. coli SURE* und bei 37°C inkubiert. Es wurde mit einer Kolonie eine ÜN-Kultur von 20 ml angeimpft und eine Plasmidisolierung (2.9.3) davon durchgeführt um so ausreichende Mengen an Plasmid zur Weiterverwendung zu gewinnen. Von dem Plasmid wurden ausreichende Mengen mit den Enzymen *Hind*III und *Xho*I verdaut und über ein 1 % Agarosegel (2.11.1) aufgereinigt. Der Expressionsvector pRSETA wurde ebenfalls mit *Xho*I und *Hind*III verdaut um die passenden „sticky

ends“ für das Insert (Antigen) zu generieren. Das so linearisierte Plasmid wurde aus einem 1 % Agarosegel ausgeschnitten und mit einem Kit (Invisorb) aufgereinigt. Der linearisierte Vektor und das entsprechende Insert wurden ligiert und in den Bakterienstamm *E. coli top10*[®] per Hitzeschock transformiert (2.9.2.2) und auf LB-A-Platten (Vektor) selektiert. Es wurden jeweils 10 Kolonien gepickt und eine Plasmidisolierung (2.9.3) von je 2 ml ÜN-Kultur durchgeführt. Je zwei Klone wurden sequenziert und auf ihre Richtigkeit hin überprüft. Das fertige Konstrukt wurde per Elektroporation (2.9.2.1) in den Expressionsstamm *E. coli Rosetta2* transformiert und auf einer LB-A-Platte (Plasmid) selektiert. Von einem Verdünnungsausstrich wurde je 1 Kolonie in 10 ml LB-A gepickt und über Nacht schüttelnd bei 37°C inkubiert. Diese ÜN-Kultur wurde in 200 ml LB-A Medium überführt. Die Kultur wurde schüttelnd bei 37°C bis zur Induzierung inkubiert. Bei einer $OD_{595} = 0,6-0,75$ wurde mit 0,1 mM IPTG induziert und die Kultur nach kurzem abkühlen auf Eis, bei 31°C weiter schüttelnd inkubiert bis die OD_{595} mind. 1,8 erreichte (wahlweise auch über Nacht weiter geschüttelt). Die Kultur wurde bei 4°C für 5 min bei 6 000 rpm abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 50 ml H₂O bidest. resuspendiert und es wurde Lysozym in einer Konzentration von 20µg/ml zugegeben. Die Zellsuspension wurde über Nacht bei -20°C eingefroren. Nach dem langsamen Auftauen der Zellsuspension am nächsten Tag wurde 0,5 % (v/v) Triton X-100 zugegeben und anschließend auf Eis sonifiziert.

Einstellungen:

Cycle 50, Power +-70

3x30sec, 30sec Pause

Anschließend wurde erneut bei 4°C für 10 min bei 10 000rpm zentrifugiert. Das Pellet bestand nun aus Inclusion-bodies, die das gewünschte Protein beinhalten. War das Pellet weißlich, wurde direkt weiter gemacht, war das Pellet noch bräunlich, wurde erneut sonifiziert und abzentrifugiert. Das weißliche Pellet wurde in 4 ml Lysepuffer resuspendiert und in ein 15ml Falcon überführt.

Der Ansatz wurde mit der entsprechenden Menge 4xLämmli-puffer versetzt und für 3 min in einem Wasserbad aufgeköcht und anschließend bis zur Verwendung bei -20°C gelagert. Um die so überexprimierten Antigene einem Hasen zur Immunisierung zu injizieren, wurden die entsprechenden Banden aus einem SDS-Gel ausgeschnitten bzw. über Ni/NTA-Beads aufgereinigt und an die Firma SeqLab geschickt. Danach wurden die zurückerhaltenen Blutungen und die finale Blutung, mit dem entsprechenden Antikörpertiter auf Dotblots (2.13.5) getestet. Die in Lämmli-puffer aufgeköchten Antigene wurden auf eine Nitrocellulosemembran geblottt (2.12.4) und für die Affinitätsaufreinigung (2.12.7) der erhaltenen Antiseren verwendet.

Lysepuffer

100 mM NaH₂PO₄

10 mM Tris-Cl

8 M Urea

pH mit NaOH auf 8,0 einstellen

2.12.6.1 Aufreinigung der überexprimierten Proteine über Ni/NTA-Beads zur Immunisierung eines Hasen

Das Lysat aus 2.12.6 wurde für 20 min bei RT und 8 500 rpm abzentrifugiert um Zelltrümmer zu beseitigen. In der Zwischenzeit wurden die Ni/NTA-Beads (Qiagen) äquilibriert. Dazu wurde eine 1 ml Eppendorfpipettenspitze abgeschnitten und 1 ml der aufgeschwemmten Beads in ein 15 ml Greinerröhrchen überführt. Es wurde 1 ml Lysepuffer zugegeben und die Beads erneut aufgeschwemmt. Anschließend wurden die Beads vorsichtig bei RT für 1 min bei 950 rpm

abzentrifugiert. Der Überstand der Beads wurde vorsichtig abgenommen und verworfen. Das abzentrifugierte Lysat wurde ebenfalls vorsichtig abgenommen, wobei darauf geachtet wurde, dass keine Zelltrümmer mitgenommen wurden, und zu den Beads gegeben. Der Ansatz wurde für 1 h bei RT gerollt, wobei der im Plasmid enthaltene His-Tag an die Beads bindet. Das Beads-Lysat-Gemisch wurde bei 4°C über eine Säule aufgereinigt. Der Durchfluss wurde aufgefangen. Anschließend wurde zweimal mit 4 ml Waschpuffer gewaschen. Das Waschwasser wurde ebenfalls aufgefangen. Danach wurde ebenfalls viermal mit 0,5 ml Elutionspuffer1 eluiert. Anschließend wurde viermal mit 0,5 ml Elutionspuffer2 eluiert. 10 µl der gezogenen Proben wurden mit Lämmli-puffer versetzt, für 3 min in einem Wasserbad aufgeköcht und bis zur Verwendung bei 4°C aufbewahrt. Die erhaltene Antigenmenge im Lysat wurde quantifiziert und eine Probe davon an die Firma SeqLab zur Immunisierung eines Hasen übermittelt. Dem Hasen wurde dort das Antigen nach einem dreimonatigen Immunisierungs-Schema insgesamt viermal injiziert. Um testen zu können, ob der Hase Antikörper gegen das injizierte Hen1-Antigen bildet, wurde vor der ersten Injektion ein „Präimmenserum“ (PIS) entnommen. Zudem wurden zu verschiedenen Zeitpunkten nach der zweiten und dritten Injektion weitere Blutproben entnommen und als 1te und 2te Blutung ausgewiesen. Die finale Blutung entspricht letztlich dem erhaltenen Antiserum.

Waschpuffer

100 mM NaH₂PO₄

10 mM Tris-Cl

8 M Urea

pH mit HCl auf 6,3 einstellen

Elutionspuffer1

100 mM NaH₂PO₄

10 mM Tris-Cl

8 M Urea

pH mit HCl auf 5,9 einstellen

Elutionspuffer2

100 mM NaH₂PO₄

10 mM Tris-Cl

8 M Urea

pH mit HCl auf 4,5 einstellen

2.12.7 Affinitätsaufreinigung der Antiseren

Zur Auftrennung des isolierten Antigens wurde ein 10 %iges SDS-Gel gegossen und ein Kamm mit großen Taschen gewählt. Die Probe wurde, wie unter Kapitel 2.12.4 beschrieben, aufgetrennt und für 2,5 h auf eine Nitrocellulosemembran elektrogeblottet. Die Banden wurden mit Ponceau-S-Lösung sichtbar gemacht. Die entsprechende Bande des überexprimierten Immunogens wurde mit Hilfe eines Skalpell ausgeschnitten, sodass ca. 1 cm lange Membranstücke entstanden, auf denen das gewünschte Protein kovalent gebunden ist. Diese Stücke wurden bis zur Verwendung in 1xPBS bei 4°C gelagert.

Zunächst wurde ein Schnipsel mit der Proteinseite nach oben in ein 0,5 ml Eppi gelegt, mit 200 µl Glycinpuffer überschichtet und für 10 min bei 4°C rollend inkubiert. Dies bewirkt, dass ungebundenes oder loses Protein gelöst und abgewaschen wird. Anschließend wurde die Flüssigkeit vollständig abgenommen und der Schnipsel zweimal für 10 min bei 4°C rollend mit 1xTBS gewaschen. Nach jedem Waschschriff wurde die Flüssigkeit vorsichtig aber vollständig abgenommen. Der Schnipsel

wurde anschließend für 1 h bei 4°C rollend mit 100 µl BSA-Lösung inkubiert. Dann wurden 100 µl des rohen Antiserums (finale Blutung) dazugegeben ohne die Flüssigkeit abzunehmen, und über Nacht weiter rollend bei 4°C inkubiert. Am folgenden Tag wurde die Flüssigkeit mit einer Pipette abgezogen und der Schnipsel viermal für 10 min bei 4°C rollend mit 1xTBS gewaschen. Nach jedem Waschschrift wurde erneut die Flüssigkeit vorsichtig aber vollständig abgenommen. Mit einer sterilen Nadel wurde ein Loch so in den Boden des 0,5 ml Eppis gestochen, dass die Flüssigkeit durch Zentrifugation abfließen konnte. Das 0,5 ml Eppi mit Schnipsel wurde in ein 1,5 ml Eppi gesteckt und bei 13 000 rpm und RT so lange zentrifugiert, bis die restliche Flüssigkeit abgelaufen war. Der Blotschnipsel wurde so in dem 0,5 ml Eppi plziert, dass bei waagrechter Lage dieses, der Membranschnipsel mit 30 µl Glycinpuffer überschichtet werden konnte. In dieser Lage wurde der Ansatz für 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde das 0,5 ml Eppi in ein neues 1,5 ml Eppi überführt, in welches zuvor 5 µl einer Tris-Lösung (1M, pH 8) vorgelegt wurden. Der Ansatz wurde erneut bei 13 000 rpm und RT so lange zentrifugiert, bis das Eluat in die Tris-Lösung gelaufen war. Die Prozedur wurde mit 15 µl Glycinpuffer wiederholt und ins gleiche 1,5 ml Eppi abzentrifugiert. Der Versuchsaufbau beruht darauf, dass aus dem Antiserum nur diejenigen Antikörper auf den Blotschnipsel binden, welche ein Epitop gegen das gewünschte Protein tragen. Der so aufgereinigte Antikörper wurde bis zur Verwendung bei 4°C gelagert.

Glycinpuffer

0,1 M Glycin

pH-Wert auf 2,5 mit HCl einstellen

BSA-Lösung

10 % (w/v) BSA in 1xTBS

Tris-Lösung

1 M Tris

pH-Wert auf 8 mit HCl einstellen

2.12.8 Immunfluoreszenzfärbung

Zur Lokalisation eines Proteins in einer zuvor fixierten Zelle, wurden in dieser Arbeit Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt. Dabei wurde mit Hilfe von spezifischen primären Antikörpern das gewünschte Protein dekoriert. Anschließend wurde ein sekundärer Antikörper verwendet, der eine fluorochrome Gruppe besitzt und spezifisch den ersten Antikörper bindet. Die fluorochrome Gruppe konnte dann unter dem Fluoreszenzmikroskop mit der entsprechenden Wellenlänge angeregt und so sichtbar gemacht werden.

2.12.8.1 Fixierung von Zellen mit Paraformaldehyd

Die zu fixierenden Zellen (ca. 150 000 Zellen) wurden mit Hilfe der Öltest-Zentrifuge für 2 min bei RT und 1 500 rpm abzentrifugiert und das Pellet in Volvic-Wasser überführt um eine Hungerphase von 1,5 h einzuleiten. Nach dem Hungern und erneutem Zentrifugieren wurden die Zellen in 1,5 ml eiskalte Fixierlösung getropft. Diese enthielt Triton X-100 um die Zellmembran permeabel zu machen. Dies ist vor allem wichtig, wenn intrazelluläre Strukturen/Proteine markiert werden sollen. Anschließend wurden die Zellen 30 min bei RT inkubiert (fixiert) und dabei ab und zu invertiert. Um restliches PFA zu binden, wurde die Reaktion durch zweimaliges Waschen mit einer Glycin-Lösung abgestoppt. Nach jedem Waschschrift wurde erneut für 2 min bei 1 000 rpm zentrifugiert. Um das gebundene überschüssige PFA aus den Zellen zu bekommen, wurden die Zellen 4-6 Mal mit 1xPBS gewaschen. Um die fixierten Zellen lagerungsfähig zu machen, wurden sie zum Schluss noch mit

Blocking-Lösung gewaschen. Das finale Zellpellet wurde in 500 µl Blocking-Lösung resuspendiert und konnte so bis zur Verwendung bei 4°C gelagert werden.

Blocking-Lösung

5 % (w/v) BSA in 1xPBS

Glycin-Lösung (0,05M)

3,75 g Glycin

ad 1 L H₂O bidest.

Fixierlösung

8 % (w/v) Paraformaldehyd

1 % (w/v) Triton-X-100

In 1xPBS

2.12.8.2 Immunmarkierung mit spezifischen Antikörpern

Hierzu wurden 100 µl der zuvor fixierten Zellen (2.12.8.1) in einen 3-Loch-Objektträger überführt. Wenn die Zellen zu Boden gesunken waren, konnte so viel Überstand wie möglich abgenommen werden. Es wurden 500 µl der Blocking-Lösung zugegeben und gewartet bis die Zellen erneut zu Boden gesunken waren. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen. Nun wurden 500 µl des primären Antikörpers in Blocking-Lösung (1:750 Anti-Flag) zugegeben und im Dunkeln über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen nach Abnahme des Überstandes und durch die Zugabe von 500 µl 1xPBS gewaschen. Nach dem Absinken der Zellen wurde auch hier so viel Überstand wie möglich abgenommen. Der Waschschritt mit 1xPBS wurde weitere fünf Mal durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen erneut für 10 min mit Blocking-Lösung inkubiert. Auch hier wurden die Zellen absinken gelassen und anschließend wurde so viel Überstand wie möglich abgenommen. Nun folgte die Inkubation mit 500 µl des sekundären Antikörpers in Blocking-Lösung (1:2 000 Anti-Rabbit, fluorochrome Gruppe Alexa[®]594) für 1,5 h bei RT. Alle folgenden Schritte wurden im Dunkeln (sofern möglich) durchgeführt. Es wurde erneut sechs Mal mit 1xPBS gewaschen. Nach der Abnahme des Überstandes wurden die markierten Zellen in ein Eppi überführt und mit 10 µl Vectashield gemischt. Dies verhinderte die Ausbleichung des Fluoreszenzsignals. Die Zellen konnten so bei 4°C gelagert werden.

Um die nun markierten Zellen unter dem Mikroskop anschauen zu können, wurden 10 µl der markierten Zellen auf einen Objektträger getropft, mit 1 µl DAPI-Lösung [1µg/ml] versetzt und abgedeckelt. Hierfür wurde das Deckglas zuerst mit durchsichtigem Nagellack an den Ecken auf dem Objektträger fixiert und nach kurzem antrocknen der Lacktropfen wurden auch die Kanten des Deckglases mit Nagellack abgedichtet. Nach dem Trocknen des Lacks konnten die Objektträger unter dem Fluoreszenzmikroskop untersucht werden.

2.13 Tiefensequenzierung kleiner RNA-Spezies und deren bioinformatische Analyse

2.13.1 Konstruktion von allgemeinen siRNA-Libraries

Für die Tiefensequenzierung von siRNA-Libraries wurden 50 µg an isolierter Gesamt-RNA (2.10.1) über ein 17,5 %iges Harnstoffgel aufgetrennt (2.10.5) und mit SYBR[®]Gold [1:10 000 in 1xTBE] gefärbt um die RNA unter blauem Licht sichtbar zu machen. Anschließend wurde der untersuchungsrelevante Bereich aus dem Gel ausgeschnitten. Da in dieser Arbeit siRNAs untersucht wurden, die im Schnitt eine Größe von 22-23 nt aufwiesen, wurde der Bereich zum Ausschneiden von

17 nt bis 25 nt gewählt. So konnte zudem sichergestellt werden, dass die während der Autogamie auftretenden, sehr abundanten scanRNAs, die in *Paramecium* eine Größe von ca. 26 nt aufweisen, nicht mitkloniert werden, da diese in der späteren Sequenzierung viele Reads „abfangen“ würden. Das ausgeschnittene Gelstück, welches die RNA enthält, wurde in kleine Stückchen zerteilt und in ein Reaktionsgefäß überführt. Den Gelstücken wurde anschließend 3 Volumen [v/w] Natriumchlorid (0,3 M) zugegeben und für 24 h rollend bei 4°C inkubiert. Dies bewirkt, dass die RNA durch das Salz gebunden und stabilisiert wird und durch die Flüssigkeit aus dem Gel geschwemmt wird. Der Überstand wurde in ein „low-bind“ Reaktionsgefäß überführt, dessen Innenseite so beschichtet ist, dass keine Nukleinsäuren daran heften bleiben. Dem Ansatz wurde Glycogen [70 ng/μl] und 3 V Ethanol (100 %) zugegeben, gemischt und über Nacht bei -20°C gefällt. Nach dem pelletieren der RNA am nächsten Tag durch Zentrifugation bei 13 000 rpm bei 4°C für 30 min und anschließendem Waschen des Pellets bei 13 000 rpm und 4°C für 20 min wurde der Überstand vollständig abgenommen und das Pellet in 5 μl RNase-freiem Wasser gelöst. Nun konnte die eigentliche Library konstruiert werden. Hierfür wurde der „NEBNext® Multiplex Small RNA Library Prep Set for Illumina“-Kit der Firma NEB nach Herstellerangaben mit folgenden Abweichungen verwendet: Die Adapter wurden 1:2 verdünnt in die Ligationen eingesetzt. Die Ligation des 3' Adapters wurde bei 16°C über Nacht mit der im Kit enthaltenen T4 RNA-Ligase2 (truncated) inkubiert und die Amplifikation in der PCR wurde mit 15 Zyklen durchgeführt.

Eine schematische Übersicht der durchgeführten Schritte ist in Abbildung 2.3 dargestellt. Die erhaltene Library wurde mit Hilfe des QiaQuick PCR Purification Kits aufgereinigt und das erhaltene Eluat über AMPure XP Beads nach Herstellerangaben (Beckman/Coulter) aufgereinigt und mit einem „High Sensitivity DNA-Chip“ bzw. „DNA-1000-Chip“ auf dem Bioanalyser überprüft. Die Libraries wurden mittels Messung am Q-Bit quantifiziert und anschließend wurden äquimolare Mengen der Proben durch Illumina-Sequenzierung auf dem Hiseq mit einem single-end Lauf sequenziert.

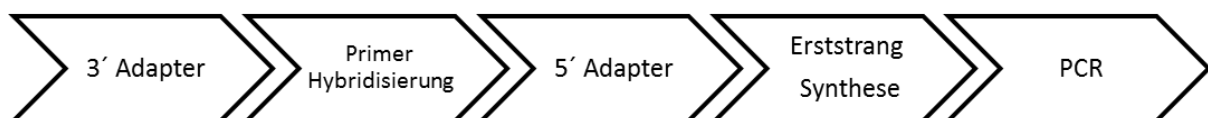


Abbildung 2.3: Schematische Darstellung der bei der Konstruktion der Libraries durchgeführten Schritte des verwendeten Kits von NEB. Zuerst wurde der 3' Adapter an die siRNA-Moleküle ligiert. Um Primerdimere zu vermeiden, wurde anschließend der zum 3' Adapter homologe Primer hybridisiert. Anschließend wurde der 5' Adapter ligiert, der Erststrang synthetisiert und zum Schluss die ligierten Moleküle per PCR amplifiziert.

2.13.2 Konstruktion von spezifischen siRNA-Libraries

In dieser Arbeit wurden auch Libraries konstruiert und untersucht, die spezifisch für methylierte siRNAs sind. Dabei wurde sich zunutze gemacht, dass die Reaktion der β -Eliminierung durch eine Behandlung der RNA mit Periodat ein zweistufiger Prozess ist. Der erste Schritt stellt die β -Oxidation des letzten Nukleotids der RNA dar. Das Periodat benötigt zwei in *cis* benachbarte Hydroxylgruppen um die Ringstruktur oxidieren zu können. Im Falle von methylierten RNAs ist eine der Hydroxylgruppen durch eine Methylgruppe ersetzt und die Reaktion der β -Oxidation somit blockiert. Die oxidierten unmethylierten RNAs tragen somit keine ligierbare 3'-OH-Gruppe mehr. Wohingegen die oxidierten methylierten RNAs ligierbar bleiben. Für die Konstruktion der Libraries, die spezifisch für methylierte siRNAs sind, wurden 60 μg an isolierter Gesamt-RNA (2.10.1) mit 1 ng des Kontroll-Oligos versetzt und über Nacht aufkonzentriert (2.10.3). Anschließend wurde die gefällte RNA mit

Periodat behandelt (2.10.4), die RNA jedoch nach dem Abstoppen der β -Oxidations-Reaktion durch Glycerin erneut gefällt. Dies bewirkt, dass alle nicht methylierten RNAs oxidiert und nicht mehr ligierbar sind, die methylierten RNAs dagegen ligierbar bleiben. Die gefällte RNA wurde am nächsten Tag in 5 μ l RNase-freiem Wasser aufgenommen, über ein 17,5 %iges Harnstoffgel (2.10.5) aufgetrennt und der untersuchungsrelevante Bereich von 17-25 nt ausgeschnitten und wie in Kapitel 2.13.1 beschrieben, aufgereinigt. Die eigentliche Library wurde ebenfalls mit dem „NEBNext® Multiplex Small RNA Library Prep Set for Illumina“-Kit der Firma NEB nach Herstellerangaben mit folgenden Abweichungen verwendet: Die Adapter wurden 1:2 verdünnt in die jeweilige Ligation eingesetzt. Die Ligation des 3' Adapters wurde bei 16°C über Nacht mit der im Kit enthaltenen T4 RNA-Ligase2 (truncated) inkubiert und die Amplifikation in der PCR wurde mit 15 Zyklen durchgeführt. Die erhaltene Libraries wurde mit Hilfe des QiaQuick PCR Purification Kits aufgereinigt und das erhaltene Eluat über AMPure XP Beads nach Herstellerangaben aufgereinigt und mit einem „High Sensitivity DNA-Chip“ auf dem Bioanalyser überprüft. Die Libraries wurden mittels Messung am Q-Bit quantifiziert und anschließend wurden äquimolare Mengen der Proben durch Illumina-Sequenzierung auf dem HiSeq mit einem single-end Lauf sequenziert. Um die Reaktion der β -Oxidierung überprüfen zu können, wurden 10 μ g der RNA der abgestoppten Reaktion abgezweigt und 5 μ g davon über Nacht aufkonzentriert (2.10.3). Mit den restlichen abgezweigten 5 μ g der RNA wurde die β -Eliminierung durchgeführt (vgl. 2.10.4). Nach Beenden der Reaktion wurden auch diese 5 μ g RNA über Nacht aufkonzentriert (2.10.3). Die 5 μ g der β -oxidierten RNA und die 5 μ g der β -eliminierten RNA wurden gegeneinander auf ein Harnstoffgel aufgetragen, aufgetrennt und durch das Anlegen einer Spannung auf eine Nylonmembran geblotet (2.10.5). Diese Art der Libraries wurde für RNA-Spezies aus transgenen Zelllinien, die das pTI- Konstrukt tragen angefertigt. Zudem wurden einzelne Gene stillgelegt, um deren Einfluss auf die RNA-Spezies zu ermitteln. Hiefür wurden die Gene ICL als Negativkontrolle, Hen1 und die beiden Piwi-Proteine 8 und 14 in einer Doppelverfütterung durch Feeding stillgelegt (2.8.4).

2.13.3 Bioinformatische Auswertung

Die bioinformatischen Analysen und Auswertungen, der durch die Sequenzierung mit Illumina erhaltenen Reads, wurden von Dr. Marcel Schultz, Gruppenleiter am Max-Planck-Institut für Informatik in Saarbrücken und seinen Mitarbeitern durchgeführt.

2.13.3.1 Alignments und Aufbereitung der siRNAs

Die erhaltenen Reads der siRNAs wurden mit dem Programm “Bowtie2” (Langmead und Salzberg, 2012) aligned. Als erstes wurden die sequenzierten Reads gegen eine Auswahl an genomischen Sequenzen aligned, die eventuell Kontaminationen darstellen könnten, wie z.B. den Genomen der Futterbakterien *E.coli* und *Klebsiella*. Diese Referenzsequenzen enthalten zusätzlich auch die Sequenzen ribosomaler RNA aus *Paramecium*. Eine Liste der Sequenzen ist dem Anhang in Kapitel 8.8 zu entnehmen. All diejenigen Reads, die nicht auf die Kontaminations-Sequenzen gemappt haben, wurden in einer zweiten Runde mit dem Genom von *Paramecium tetraurelia* aligned. Dabei wurden nur die Reads beibehalten, die ohne Mismatch alignen. Diese verbleibenden Reads entsprechen der Summe T.

Mit dem Programm “custom scripts” wurden Überlappungen der Reads mit spezifischen Zielregionen analysiert. Zur Visualisierung und Normalisierung wurde das Programm “language R” verwendet.

2.13.3.2 Normalisierung der Reads

Da die Sequenzierungen der einzelnen Libraries unterschiedliche Anzahlen an Reads ergaben, mussten diese Normalisiert werden um sie untereinander vergleichen zu können. Es gibt jedoch

keine bekannten speziellen Normalisierungs-Methoden, die spezifisch für RNA-Seq-Daten kleiner RNAs sind. Allerdings wurden mehrere Methoden für die Normalisierung von mRNA-Seq-Daten beschrieben. Es gibt zwei gängige Methoden um mRNA-Seq-Daten zu normalisieren. Die erste Methode ist die Normalisierung an Hand der Gesamtreadzahl (total count scaling, TCS). Die zweite Methode bezieht sich auf die mittlere logarithmische Änderung oder ähnlichen Quantifizierungen der gemapten Reads auf spezielle Gene in verschiedenen mRNA-Seq-Daten (Dillies *et al.*, 2013). Um eine solche Änderung messen zu können, muss jedoch eine Gen-Annotation vorhanden sein und es muss zudem gewährleistet sein, dass die Expressionsraten der meisten Gene in den unterschiedlichen Libraries vergleichbar sind. Nachdem nur wenig über den Ort, die Größe und die Variabilität des Expressionsmusters von endogenen kleinen RNA produzierenden Loci in *P. tetraurelia* bekannt ist, ist die zweite Methode hier nicht anwendbar. Deshalb wurde eine Variante des TCS, wie sie von Sultan und Kollegen an mRNA-Seq-Daten angewendet wurde (Sultan *et al.*, 2008), benutzt. Dabei werden die Proben an Hand eines Faktors, der den Unterschied in der Anzahl der mappenden Reads zwischen den einzelnen Libraries abschätzt, normalisiert. Jedoch kann diese Art der Normalisierung nur auf Daten stark exprimierter Genen angewendet werden, da der benutzte Faktor nicht berücksichtigt, dass es Unterschiede in der Expression der RNAs bei verschiedenen Bedingungen geben kann (Dillies *et al.*, 2013). Eine solche Variabilität in der Expression ist jedoch in den in dieser Arbeit zu analysierenden Libraries gegeben. Hier wurde durch das Stilllegen einiger Komponenten durch das dsRNA-Feeding, die dafür notwendigen Enzyme zusätzlich verstärkt exprimiert und zudem große Mengen an Feeding-assoziierten siRNAs in der Zelle synthetisiert, welche ebenfalls mitsequenziert wurden. Die Anzahl K der siRNA-Reads, die auf die jeweilige stillgelegte Komponente mappen, wurde deshalb aus dem Pool der zu analysierenden Reads eliminiert.

Wenn T die die Summe der Reads ist, die auf das Genom mappen (vgl. 2.13.3.1) und K die Summe der zu eliminierenden Feeding-assoziierten Reads ist, so ergibt sich als Normalisierung R' für die Reads R , die in einer Region von Interesse alignen, folgende Formel:

$$R' = R \times \frac{M}{T - K}$$

Wobei M das Maximum über alle Werte $(T_1 - K_1), \dots, (T_n - K_n)$ über alle n Proben ist.

Durch diese Normalisierung konnte eine Vergleichbarkeit der Libraries untereinander gewährleistet werden.

Eine Darstellung der Zusammensetzung der einzelnen Libraries ist dem Anhang in Kapitel 8.7 zu entnehmen.

3. Ergebnisse

In dieser Arbeit wurde das Einbringen von Transgenen in den Makronukleus, die so konstruiert sind, dass sie einen endogenen RNAi-Mechanismus induzieren, genauer untersucht. Ziel war es, diesen RNAi-Mechanismus mit seinen Komponenten und siRNAs zu untersuchen und detailliert zu charakterisieren. Die Induktion eines RNAi-Mechanismus durch ein injiziertes Transgen bei *Paramecium* wurde erstmals von Ruiz und Kollegen beschrieben (Ruiz *et al.*, 1998).

Godiska und Mitarbeiter haben zudem herausgefunden, dass an lineare Transgene in *Paramecium* Telomere angeheftet werden und die transgenen Sequenzen somit wie „Minichromosomen“ repliziert und vegetativ von Zelle zu Zelle weitergegeben werden (Godiska *et al.*, 1987; Forney und Blackburn, 1987; Gilley *et al.*, 1988).

Im Jahr 2001 wurde bekannt, dass endogene Gene durch das Einbringen eines homologen Transgens, welchem jedoch die 3' UTR fehlt, effizient stillgelegt werden (Galvani und Sperling, 2001). Das in dieser Arbeit verwendete Transgen pTI- ist in einem Teil seiner Sequenz homolog zum endogenen *nd169*-Gen, und wurde schon von Marker und Kollegen verwendet und beschrieben (Marker *et al.*, 2010). Zudem wurde ein weiteres Derivat dieses Transgens, genannt pTI-/-, konstruiert und in dieser Arbeit untersucht. Die verwendeten Transgene sind in Abbildung 3.1 dargestellt.

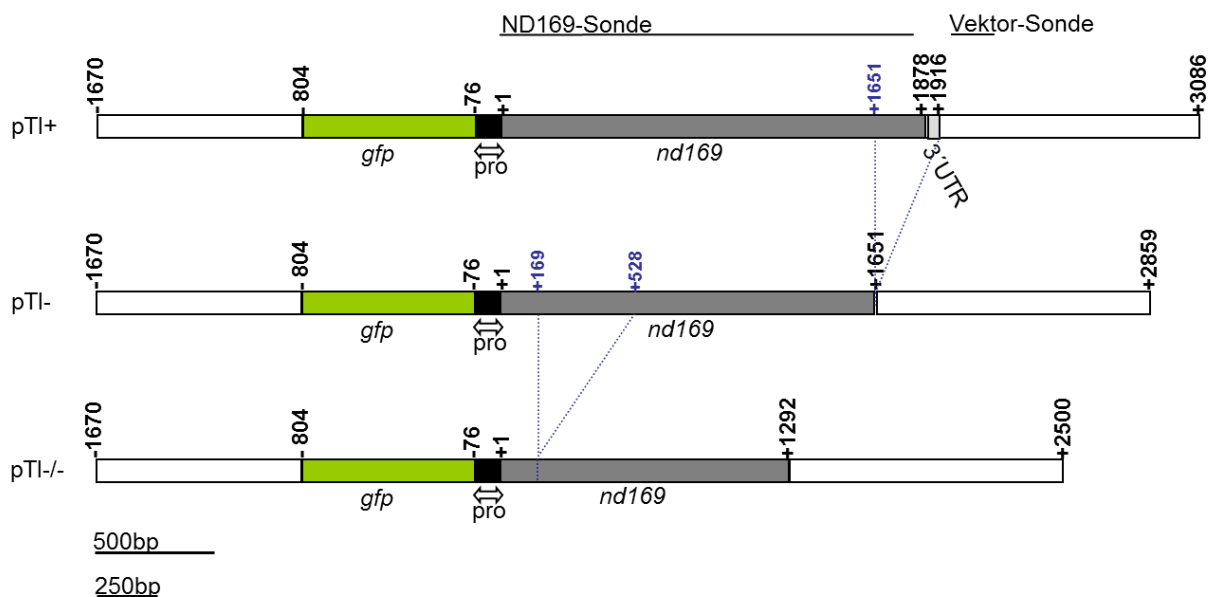


Abbildung 3.1: Verwendete Transgen-Konstrukte. pTI+ beschreibt das linearisierte Ausgangs-Konstrukt, von dem zunächst die 3' kodierende Region inklusive UTR des *nd169*-Gens deletiert wurde (pTI-) (Marker *et al.*, 2010). Ausgehend von diesem pTI- Konstrukt wurde im 5' kodierenden Bereich eine Region von 359 bp deletiert (pTI-/-). Der bidirektionale Promotor (schwarz, Doppelpfeil) wird von zwei Genen flankiert: dem *gfp* (grün) und dem *nd169*-Gen (grau). Die Bereiche des Vektors sind weiß dargestellt.

Auf den verwendeten Transgenen liegt, wie in Abbildung 3.1 zu sehen ist, ein bidirektionaler Promotor, der zu beiden Seiten von Genen flankiert wird. Auf der einen Seite liegt das „green fluorescent protein“, kurz *gfp*, das als Selektionsmarker dient. Auf der anderen Seite des Promotors liegt eine Version des *nd169*-Gens. Im pTI+ Konstrukt ist dieses Gen vollständig, in den pTI- und pTI-/- Konstrukten liegt eine am verkürzte Version des *nd169*-Gens vor. In dieser verkürzten Version des *nd169*-Gens fehlt ein Teil der 3' kodierenden Region inklusive des Terminationssignals und UTR,

sodass das Transkript dieses Gens ein nicht translatierbares Produkt für die Zelle ergibt und sie deshalb dieses Transkript via RNAi stilllegt (Marker *et al.*, 2010). Auf Grund der homologen Sequenz des transgenen *nd169*-Gens zum endogenen *nd169*-Gen, könnten die über RNAi synthetisierten siRNAs auch auf das endogene Gen binden und dieses würde somit ebenfalls stillgelegt. Das *nd169*-Gen kodiert für ein Protein, welches dafür verantwortlich ist, dass die Zelle sogenannte Trichozysten ausstoßen kann (Froissard *et al.*, 2004). Dabei handelt es sich um dünne Proteinfäden, die Kalziumabhängig von der Zelle ausgestoßen werden um z.B. einem Fressfeind entkommen zu können (Knoll *et al.*, 1991). Die mit diesem Transgen injizierten Zellen können somit anhand von zwei Markern erkannt und charakterisiert werden. Zum Einen erscheinen die Zellen auf Grund der Expression des GFPs grün unter dem Fluoreszenzmikroskop, zum Anderen führt das Stilllegen des endogenen *nd169*-Gens dazu, dass Zellen, die das pTI- oder das pTI-/- Transgen tragen, keine Trichozysten mehr ausstoßen können und somit einen Trich- Phänotyp aufweisen.

3.1 Allgemeine Charakteristika des Transgen-induzierten RNAi-Mechanismus

Um ein effizientes Stilllegen des *nd169*-Gens zu gewährleisten, sind verschiedene Parameter, wie z.B. die Kopienzahl des Transgens, sowie die Menge an synthetisierten siRNAs zu berücksichtigen. Zudem spielen Kulturbedingungen wie z.B. die Temperatur eine große Rolle.

3.1.1 Einfluss der Kopienzahl des Transgens

Zunächst wurden die Auswirkungen unterschiedlicher Kopienzahlen des Transgens in den injizierten Zelllinien auf das Stilllegen des *nd169*-Gens hin untersucht. Die Injektion des pTI- Konstruktes erfolgte manuell durch Mikroinjektion des linearisierten Transgens in den Makronukleus (2.8.5.3). Bei dieser Methode ist die injizierende Menge des Transgens nicht experimentell kontrollierbar. Aus diesem Grund wurden mehrere Zellen injiziert und auf ihren Phänotyp hin untersucht. Es wurden zwei Zelllinien ausgewählt, die sich in der Menge des injizierten Konstruktes unterscheiden. Eine Zelllinie, die eine hohe Anzahl an Konstruktkopien trägt, wurde pTI-1 genannt, eine weitere Zelllinie, die dagegen eine geringe Anzahl an Kopien des Konstruktes trägt, wurde pTI-2 genannt. Um die Kopienzahl des injizierten Konstruktes gegeneinander abgleichen zu können, wurden beide Zelllinien zu einer Massenkultur vermehrt. Anschließend wurde hochmolekulare genomische DNA, d.h. intakte makronukleare Chromosomen, (2.11.3) isoliert und mittels Agarosegel-Elektrophorese (2.11.1) aufgetrennt. In einem Southernblot (2.11.4) der mit einer Sonde gegen das *gfp*-Gen hybridisiert wurde, konnten die pTI-Konstrukte, die als kleine Chromosomen vorliegen, detektiert werden. Zudem konnte so ermittelt werden, ob das linearisierte Transgen als Monomer oder Dimer vorliegt. Der Southernblot ist in Abbildung 3.2 dargestellt.

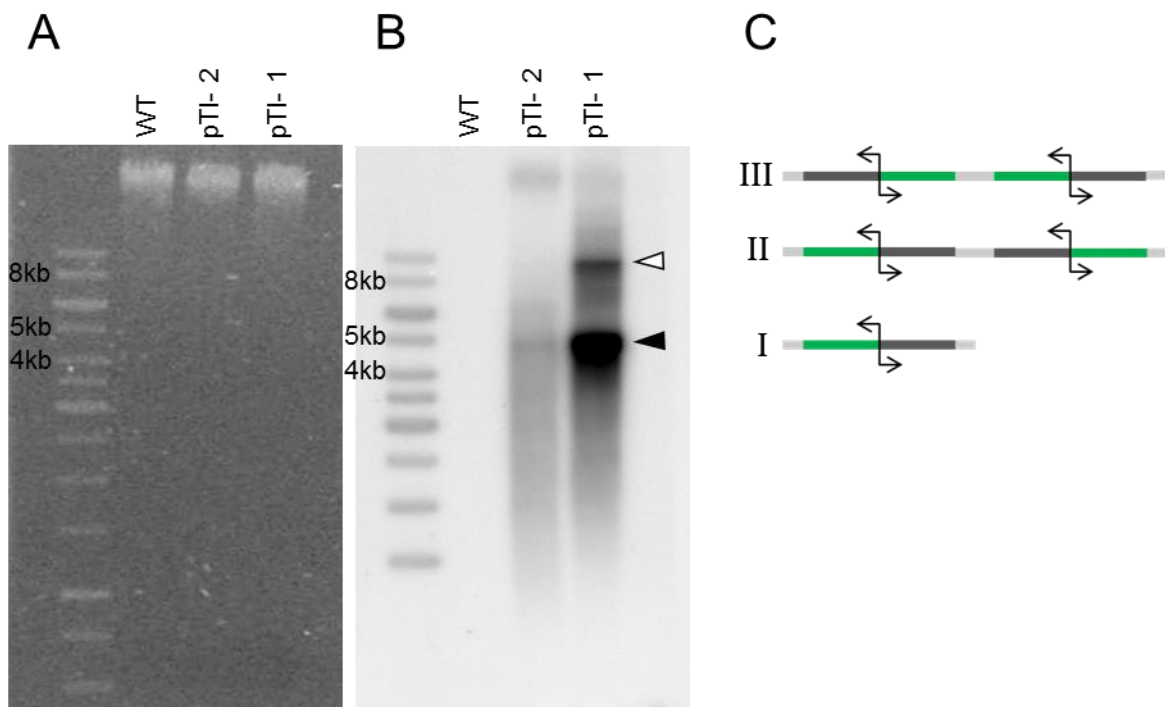


Abbildung 3.2: Southernblot isolierter intakter Chromosomen verschiedener transgener *Paramecium*-Zelllinien. In A ist das Agarosegel der aufgetrennten Chromosomen als Ladekontrolle dargestellt. In B ist der mit einer radioaktiv markierten GFP-Sonde hybridisierte zugehörige Southernblot dargestellt. Aufgetragen sind jeweils intakte Chromosomen einer nicht injizierten Zelllinie (WT), einer Zelllinie mit einer geringen Kopienzahl an injiziertem pTI-Konstrukt (pTI-2) und einer Zelllinie mit einer hohen Kopienzahl des pTI-Konstruktes (pTI-1). Der schwarze Pfeil markiert das als Monomer vorliegende Konstrukt, der weiße Pfeil das entsprechende Dimer. C zeigt die schematische Darstellung der Konstrukte als Monomer (I) und Dimere (II, III). Der bidirektionelle Promotor (Eckpfeil) wird von dem *gfp*-Gen (Grün) auf der einen Seite von dem am 3' Ende verkürzten *nd169*-Gen (Dunkelgrau) flankiert. Die Bereiche des Vektors sind in Hellgrau dargestellt.

Aus Abbildung 3.2 B wird ersichtlich, dass lediglich in den manipulierten Zelllinien pTI-1 und pTI-2 das pTI-Konstrukt im Vergleich zum WT nachgewiesen werden konnte. Hierfür wurde eine Sonde gegen das GFP verwendet um nur das injizierte Transgen zu detektieren, nicht jedoch endogene Sequenzen. Des Weiteren ist in Abbildung 3.2 zu erkennen, dass obwohl gleiche Mengen an isolierten Chromosomen aufgetragen wurden (vgl. Abb. 3.2 A), die Zelllinie pTI-1 eine deutlich stärkere Bande für das pTI-Konstrukt aufweist als die Zelllinie pTI-2.

Das pTI-Konstrukt ist ein Plasmid, das vor dem Injizieren in eine Zelle linearisiert wird (2.8.5.2). Durch diese Maßnahme kann gewährleistet werden, dass das Transgen von der Zelle als Minichromosom behandelt wird. Das pTI-Konstrukt weist in seiner linearisierten Form als Monomer eine Größe von 4,756 kb auf (vgl. Abb. 3.2 C I). Im Falle eines monomer vorliegenden Transgens wird vermutet, dass dessen Transkript des *nd169*-Gens von einer RNA-abhängigen RNA-Polymerase als Template verwendet und eine doppelsträngige RNA generiert wird, welche anschließend von einem Dicer-Enzym zu siRNAs geschnitten werden könnte. Ein monomeres Transgen würde somit eine ausreichende Synthese von siRNAs auslösen um das endogene *nd169*-Gen am effizientesten still zu legen. Liegt das pTI- in der Zelle so als Dimer vor, dass sich die Bereiche des Transgens, die die *gfp*-Gene enthalten, aneinander lagern, ändert sich an dieser Ausgangssituation nichts (vgl. Abb. 3.2 III). Liegt das Dimer dagegen so vor, dass sich die Bereiche des Transgens, die die *nd169*-Genbereiche enthalten gegenläufig orientiert sind (vgl. Abb. 3.2 C II), könnte es passieren, dass eine doppelsträngige RNA der *nd169*-Sequenz direkt generiert wird, da sich die Transkripte überlappen

würden. Diese dsRNA könnte zwar ebenfalls die Synthese von siRNAs induzieren, jedoch könnte sie auch eventuell einen anderen, den dsRNA-induzierten, RNAi-Mechanismus induzieren.

Aus Abbildung 3.2 B geht hervor, dass in beiden pTI- Zelllinien das pTI- Konstrukt überwiegend als Monomer vorliegt. In der Zelllinie pTI-1 liegt ein geringer Teil des injizierten Konstruktes als Dimer vor, bei der Zelllinie pTI-2 konnte dagegen kein Dimer nachgewiesen werden. Aus Abbildung 3.3 wird jedoch ersichtlich, dass beide pTI-Zelllinien das endogene *nd169*-Gen ausreichend stilllegen, um einen Silencing-Phänotyp zu bewirken.

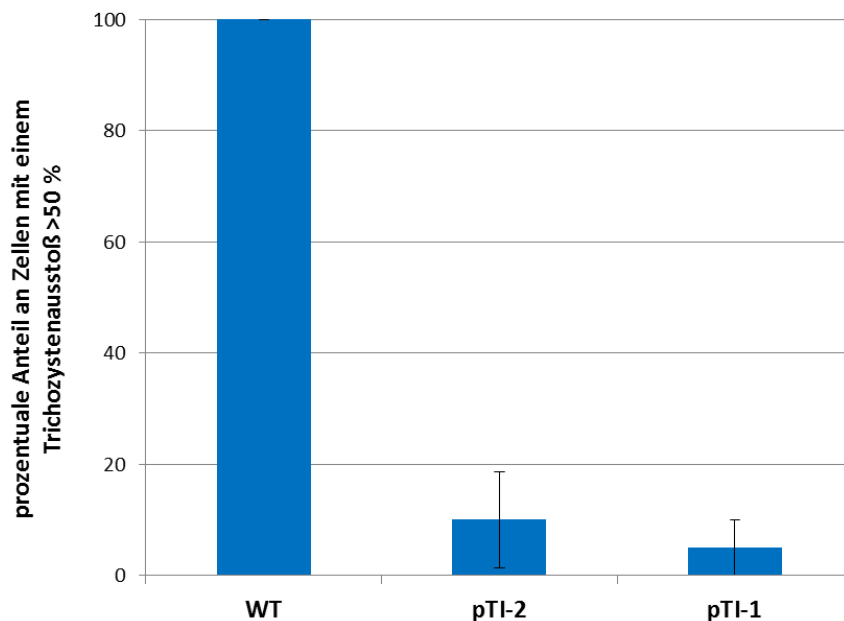


Abbildung 3.3: Trichozystenausstoß in transgenen Zelllinien. Aufgetragen ist der Anteil an Zellen der pTI-Zelllinien pTI-2 (wenig Kopien des Konstruktes), pTI-1 (viele Kopien des Konstruktes) und einer nicht injizierten Zelllinie (WT), die noch fähig sind mehr als 50 % ihrer Trichozysten auszustößen. Die Zellen wurden bei 32°C kultiviert. Das Experiment wurde dreimal wiederholt (n = 3). Es wurden jeweils 100 Zellen ausgezählt.

Wie in Abbildung 3.3 dargestellt ist, wurden Zellen als Trich- eingestuft, die weniger als 50 % ihrer Trichozysten ausstoßen können. Es konnte ein 90 %iger Trich- Phänotyp für die Linie pTI-2 und ein 96 %iger Trich- Phänotyp für die Zelllinie pTI-1 beobachtet werden. Es ist weiter zu sehen, dass in beiden Zelllinien trotz des Silencings des *nd169*-Gens ungefähr 10 % der ausgezählten Zellen noch fähig waren, Trichozysten auszustößen. Es ist also anzunehmen, dass beide Mengen an injiziertem Konstrukt eine ausreichende Synthese an siRNAs triggern um das endogene *nd169*-Gen stillzulegen und somit einen Trich- Phänotyp hervor zu rufen. Beide Zelllinien konnten zur Untersuchung weiterer Charakteristika des Transgen-induzierten RNAi-Mechanismus verwendet werden.

3.1.2 Einfluss der Menge an akkumulierten siRNAs

Darauffolgend wurde die Menge an akkumulierten siRNAs und deren Charakteristika in beiden transgenen Zelllinien verglichen. Transgen-induzierte siRNAs wurden für *Paramecium* teilweise bereits durch Marker und Garnier und Kollegen beschrieben (Marker *et al.*, 2010; Garnier *et al.*, 2004). So konnte gezeigt werden, dass die Transgen-induzierten siRNAs 5' monophosphoryliert vorliegen und eine Modifikation an ihrem 3' Ende aufweisen. Diese Modifikation spielt eine wichtige Rolle bei der Stabilität der siRNAs (Yu *et al.*, 2005; Ji und Chen, 2012). Zunächst wurde jedoch untersucht, ob die unterschiedliche Menge an injiziertem pTI- Konstrukt in den verwendeten pTI-

Zelllinien einen Einfluss auf die siRNA-Menge hat. Hierfür wurden beide Zelllinien zunächst in einer Massenkultur bei 32°C angezogen, anschließend Gesamt-RNA aus diesen Zellen isoliert (2.10.1) und auf eine Membran gebロットet (2.10.5). Um zu testen, ob die siRNAs der hier verwendeten Zelllinien ebenfalls eine Modifikation am 3' Ende tragen und ob die injizierte pTI-Menge einen Einfluss auf diese Stabilisierung hat, wurde die RNA zusätzlich mit Periodat behandelt (2.10.4) und ebenfalls auf die Membran übertragen. Der entsprechende Northernblot wurde mit radioaktiv markierten Sonden hybridisiert und ist in Abbildung 3.4 dargestellt.

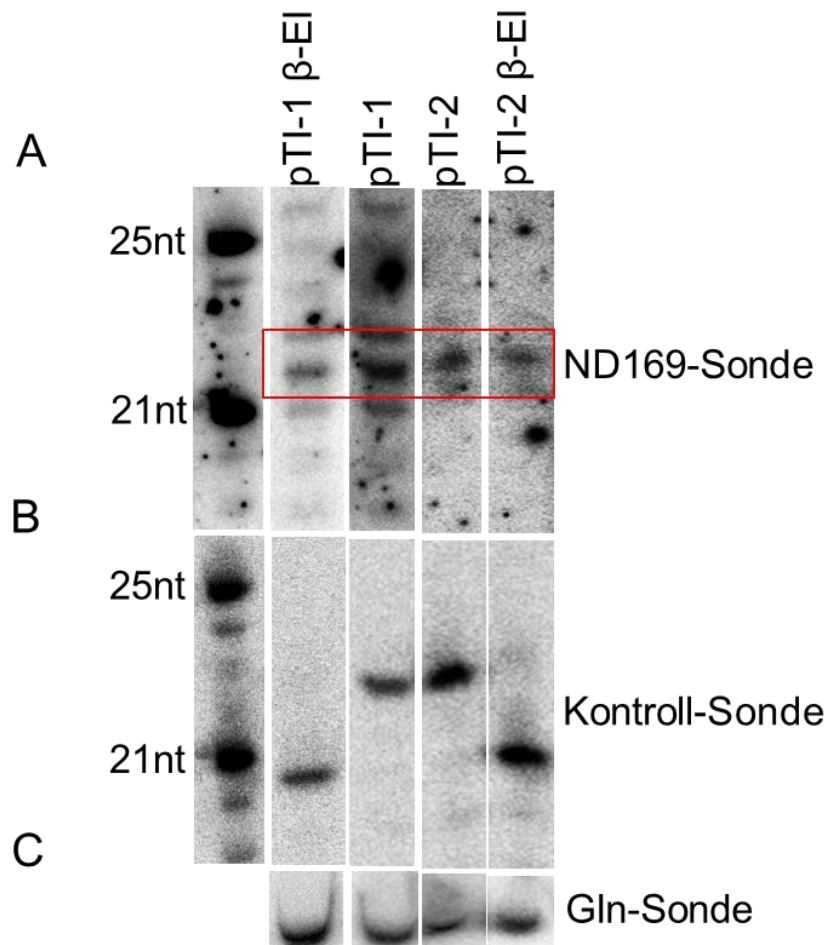


Abbildung 3.4: Northernblot der siRNA-Menge transgener Zelllinien. Aufgetragen sind jeweils 15 µg der isolierten Gesamt-RNA (pTI-1, pTI-2) sowie der β -eliminierten RNA (pTI-1 β -EI, pTI-2 β -EI) der jeweiligen Zelllinie. Den aufgetragenen RNAs wurde ein hydroxylierter Kontroll-Oligo zugegeben, der den Erfolg der β -Eliminierungsreaktion anzeigt. A) zeigt die Hybridisierung mit einer *nd169*-spezifischen PCR-Sonde. Die Bande der *nd169*-spezifischen siRNAs ist mit einem roten Rechteck markiert. B) zeigt die Hybridisierung mit einer Kontroll-Sonde, die den Kontroll-Oligo markiert. C) zeigt die Hybridisierung des Blots mit einer Glutamin-Sonde (Gln-Sonde) als Ladekontrolle. Die Exposition des Phosphoimager-Screens betrug vier Wochen für die ND169-Sonde, einen Tag für die Kontroll-Sonde und drei Tage für die Gln-Sonde.

Behandelt man RNA mit Periodat, führt dies erst zu einer β -Oxidation des letzten Nukleotids am 3' Ende und anschließend zu einer β -Eliminierung. Somit ist das behandelte RNA-Molekül um ein Nukleotid kürzer als das vergleichbare unbehandelte. Trägt das RNA-Molekül jedoch eine Modifikation am 3' Ende kann das Periodat die Oxidation und die daraus resultierende Eliminierung der letzten Base nicht veranlassen. In einem denaturierenden Harnstoffgel, wie es zur Auftrennung der siRNAs vor dem Blot verwendet wurde, zeigt sich in Folge dessen ein Laufunterschied zwischen

der behandelten und der unbehandelten RNA, sofern die Reaktion erfolgreich war. Aus Abbildung 3.4 B wird deutlich, dass der zugefügte Kontroll-Oligo mit einer Länge von 22 nt, der keine Modifikation trägt, in der mit Periodat behandelten RNA-Spur nur noch eine Länge von 21 nt aufweist. Somit wurde die letzte Base dieses Oligos durch die Behandlung mit Periodat abgespalten. Es ist davon auszugehen, dass die Reaktion Behandlung der RNA mit Periodat effizient war. Somit können auch die in Abbildung 3.4 A markierten siRNA-Banden eindeutig interpretiert werden. Die *nd169*-spezifischen siRNAs in Abb. 3.4 A zeigen kein unterschiedliches Laufverhalten im Gel bei der behandelten RNA im Vergleich zur Unbehandelten. Dies bedeutet, dass die *nd169*-spezifischen siRNAs in beiden Zelllinien eine Modifikation am 3' Ende aufweisen. Vergleicht man die detektierbare Menge an *nd169*-spezifischen siRNAs in den beiden unbehandelten RNAs (pTI-1 und pTI-2, Abb. 3.4 A) der transgenen Zelllinien, so fällt auf, dass die Zelllinie pTI-1 nur geringfügig mehr *nd169*-spezifische siRNAs synthetisiert als die Zelllinie pTI-2. Jedoch weist bereits die Ladekontrolle der pTI-1 Zelllinie darauf hin, dass in diesem Fall eine größere Menge an Gesamt-RNA geladen wurde (vgl. Abb. 3.4 B). Folglich hat die injizierte Menge an pTI- Konstrukt in den getesteten Zelllinien keinen Einfluss auf die Menge der synthetisierten siRNAs. Diese ist in beiden Fällen ausreichend um den Silencing-Phänotyp des endogenen *nd169*-Gens zu gewährleisten.

3.1.3 Einfluss der Temperatur auf den Transgen-induzierten RNAi-Mechanismus

Auch Umwelteinflüsse üben einen starken Effekt auf RNAi-Mechanismen und damit auf die Genregulation aus. Vor allem die Temperatur spielt eine große Rolle. Szittyta und Kollegen haben für *A. thaliana* beschrieben, dass der durch ein Transgen induzierte RNAi-Mechanismus dem RNAi-Mechanismus der natürlichen Virus-Abwehr sehr ähnelt und stark temperaturabhängig ist (Szittyta *et al.*, 2003). Dieser Regulationsmechanismus kann bei Temperaturen von 15°C und darunter nicht mehr ablaufen. Die Gruppe um Szittyta konnte zudem zeigen, dass dieser Effekt mit der Akkumulation der siRNAs zu tun hat, da die Menge dieser bei niederen Temperaturen stark abnimmt (Szittyta *et al.*, 2003). In weiteren Studien in *Drosophila* konnte ebenfalls gezeigt werden, dass auch hier ein Transgen-induzierter RNAi-Mechanismus abhängig von der Temperatur ist. In dieser Studie konnten Eric Fortier und John M. Belote keinen eindeutigen Silencing-Phänotyp bei 22°C, jedoch bei 29°C nachweisen (Fortier und Belote, 2000). Ferner wurden solche Versuche auch in Säugerzellen durchgeführt, wobei ebenfalls eine starke Temperaturabhängigkeit des induzierten RNAi-Mechanismus nachgewiesen werden konnte (Kameda *et al.*, 2004).

Ob eine vergleichbare Temperaturabhängigkeit des zu untersuchenden RNAi-Mechanismus in transgenen Zelllinien von *Paramecium* besteht, wurde im Folgenden untersucht. Hierzu wurden die transgenen Zelllinien pTI-1 und pTI-2 jeweils bei verschiedenen Temperaturen kultiviert und auf ihren Silencing-Phänotyp hin untersucht. Diese Analyse ist in Abbildung 3.5 dargestellt.

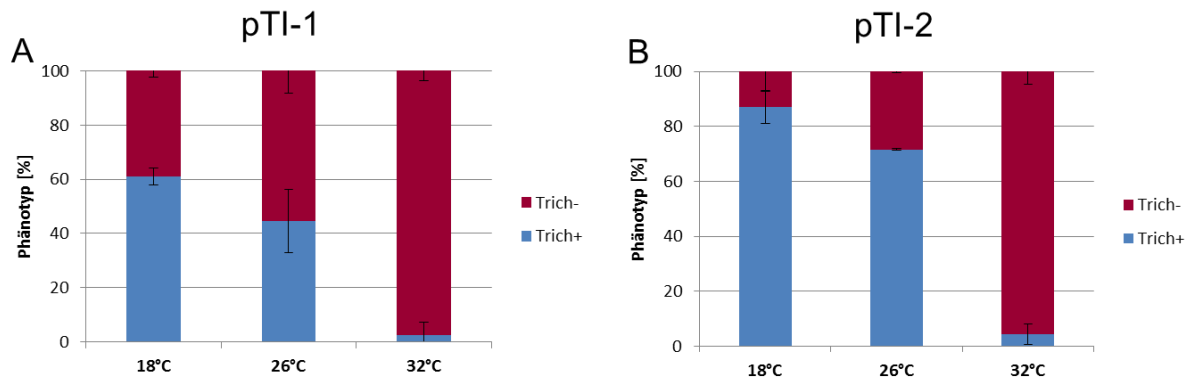


Abbildung 3.5: Phänotypische Analyse transgener Zelllinien bei verschiedenen Temperaturen. Aufgetragen ist der prozentuale Anteil an Zellen, die Trichozysten ausstoßen (Trich+) und Zellen, die keine Trichozysten ausstoßen können (Trich-). Die transgenen Zelllinien pTI-1 (A) und pTI-2 (B) wurden bei 18°C, 26°C und 32°C kultiviert. Das Experiment wurde dreimal wiederholt (n = 3). Es wurden jeweils 100 Zellen ausgezählt.

Aus Abbildung 3.5 wird klar ersichtlich, dass der Silencing-Phänotyp des endogenen *nd169*-Gens, der zu einem Trich- Phänotyp führt, in beiden transgenen Zelllinien nur bei 32°C seine volle Ausprägung erreicht. Bei 26°C weisen innerhalb der Zelllinie pTI-1 (Abb. 3.5 A) nur knapp 55 % der ausgezählten Zellen einen Silencing-Phänotyp auf; bei 18°C sind es sogar nur 38 %. Dieser Effekt ist bei der Zelllinie pTI-1 etwas stärker ausgeprägt als bei der Zelllinie pTI-2 (Abb. 3.5 B). Hier können bei 26°C lediglich 28 % der ausgezählten Zellen, bei 18°C sogar nur 12 % keine Trichozysten ausstoßen. Wie auch für andere Organismen beschrieben, kann somit folglich auch in *Paramecium tetraurelia* ein Effekt der Temperaturabhängigkeit auf den Transgen-induzierten RNAi-Mechanismus nachgewiesen werden. Für *Arabidopsis* konnte, wie bereits erwähnt, gezeigt werden, dass der Effekt auf eine reduzierte Menge an siRNAs bei niederen Temperaturen zurückzuführen ist. Ob dies auch hier der Fall ist, wurde als nächstes überprüft. Hierfür wurden die transgenen Zelllinien bei verschiedenen Temperaturen kultiviert und großgezogen. Aus diesen Kulturen wurde anschließend RNA isoliert (2.10.1), elektrophoretisch aufgetrennt und durch das Anlegen eines Vakuums auf eine Membran gebロットet (2.10.5). Der mit radioaktiv markierten Sonden hybridisierte zugehörige Northernblot ist in Abbildung 3.6 dargestellt.

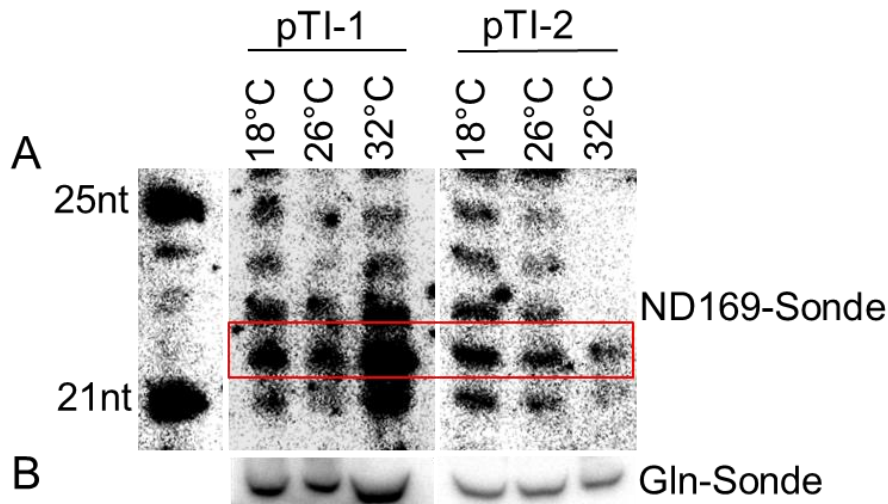


Abbildung 3.6: Northernblot der siRNA-Menge transgener Zelllinien bei verschiedenen Temperaturen. Die Zellen wurden bei 18°C, 26°C und 32°C kultiviert und Gesamt-RNA aus den Massenkulturen isoliert. Aufgetragen wurden bei der Zelllinie pTI-1 je 15 µg, bei der Zelllinie pTI-2 je 10 µg der isolierten Gesamt-RNA. A) zeigt die Hybridisierung mit einer *nd169*-spezifischen PCR-Sonde. Die Bande der *nd169*-spezifischen siRNAs ist mit einem roten Rechteck markiert. B) zeigt die Hybridisierung des Blots mit einer Glutamin-Sonde (Gln-Sonde) als Ladekontrolle. Die Exposition des Phosphoimager-Screens betrug vier Wochen für die ND169-Sonde und drei Tage für die Gln-Sonde.

Marker und Kollegen konnten beschreiben, dass die *nd169*-spezifischen siRNAs des Transgen-induzierten RNAi-Mechanismus eine Größe von ca. 22 nt auf dem Northernblot aufweisen (Marker *et al.*, 2010). Auf dem Northernblot in Abbildung 3.6 ist zu erkennen, dass bei der Zelllinie pTI-1 deutlich mehr dieser *nd169*-spezifische siRNAs bei 32°C zu detektieren sind, als bei den weiteren getesteten Temperaturen. Dies bestätigt die phänotypische Analyse aus Abbildung 3.5. Die Menge an spezifischen siRNAs bei 18°C und 26°C dagegen ändert sich nicht, obwohl auch hier ein Unterschied im Silencing-Phänotyp gezeigt werden konnte (vgl. Abb. 3.5 A). Allerdings ist hier zu erwähnen, dass bei der Spur der Linie pTI-1 bei 32°C etwas mehr Gesamt-RNA geladen wurde (vgl. Abb. 3.6 B). Zudem bleibt anzumerken, dass in allen Spuren der pTI-1 Zelllinie Degradationsprodukte längerer Transkripte detektiert wurden.

In den Spuren der Zelllinie pTI-2 ist bei den Temperaturen von 18°C und 26°C ebenfalls kein Unterschied in der Menge an *nd169*-spezifischen siRNAs zu erkennen, obwohl auch hier ein Effekt in der phänotypischen Analyse an Hand von Abbildung 3.5 gezeigt werden konnte. Allerdings ist hier auch keine deutliche Zunahme an siRNAs bei 32°C zu sehen. Hierbei muss jedoch hervorgehoben werden, dass bei der Spur der Zelllinie pTI-2 bei 32°C nahezu keine Degradationsprodukte detektiert wurden. Es kann nicht eindeutig bewiesen werden, dass die Menge an *nd169*-spezifischen siRNAs mit steigender Temperatur zunimmt. Es konnte dennoch gezeigt werden, dass die siRNA-Mengen innerhalb einer Zelllinie bei den Temperaturen von 26°C zu 18°C nicht abnehmen, obwohl auch zwischen diesen Temperaturen eine Abnahme im Trich- Phänotyp zu verzeichnen ist (vgl. Abb. 3.5). Man kann den Schluss ziehen, dass die Temperatur zwar Schwankungen in der relativen Menge an siRNAs hervorruft, diese jedoch keinen Einfluss auf die Temperaturabhängigkeit des Trich- Phänotyps hat.

Beide getesteten Zelllinien verhalten sich tendenziell in den vorherigen Untersuchungen gleich. Für die folgenden Versuche wurde jedoch nur die Zelllinie pTI-1 herangezogen, da bei dieser Linie der temperaturabhängige Trich- Phänotyp deutlicher zu sehen ist. Auf Grund der höheren injizierten

Konstruktmenge sind bei dieser Zelllinie auch die *nd169*-spezifischen siRNAs und Transkripte des Transgens leichter zu detektieren.

Um zu überprüfen, ob der stark unterschiedliche Silencing-Phänotyp des *nd169*-Gens bei den verschiedenen Temperaturen darauf beruht, dass es bei 32°C mehr Transkript des injizierten Transgens und damit auch mehr Template für die Generierung von siRNAs gibt, wurden Zellen der Linie pTI-1 erneut bei den verschiedenen Temperaturen kultiviert, zu einer Massenkultur herangezogen und Gesamt-RNA daraus isoliert (2.10.1). Die RNA wurde mittels eines denaturierenden Agarosegels elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend auf eine Membran übertragen (2.10.6). Der mit radioaktiv markierten Sonden hybridisierte zugehörige Northernblot ist in Abbildung 3.7 dargestellt.

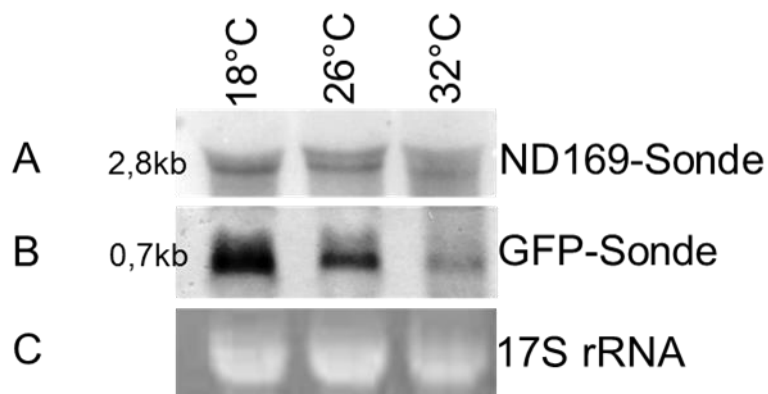


Abbildung 3.7: Northernblot der Transkriptmengen des Transgens. Aufgetragen sind jeweils 15 µg der isolierten Gesamt-RNA bei Kultivierung der Zellen bei 18°C, 26°C und 32°C. Hybridisiert wurde der Blot mit spezifischen radioaktiv markierten Sonden. A) zeigt die detektierte Transkriptmenge des vom pTI- Transgen generierten *nd169*. B) zeigt die detektierte Transkriptmenge des *gfp*. C) zeigt die im Agarosegel mit Ethidiumbromid angefärbte Bande der 17S rRNA als Ladekontrolle. Die Exposition des Phosphoimager-Screens betrug vier Wochen für die ND169-Sonde und drei Wochen für die GFP-Sonde.

Da auf dem Northernblot in Abbildung 3.7 Gesamt-RNA aufgetragen wurde, könnten bei der Hybridisierung dieses Northernblots mit der ND169-Sonde generell zwei Transkripte detektiert werden. Diese sind das Transkript des endogenen *nd169*-Gens und das Transkript des verkürzten *nd169*-Gens des Transgens, da die verwendete ND169-Sonde Homologie zu beiden Genen aufweist. Das transgene *nd169*-Gen besitzt kein Terminationssignal mehr, sodass das Transkript, welches vom bidirektionalen Promotor des Transgens in *nd169*-Ende transkribiert wird, folglich auch die Vektorsequenz, die sich im linearisierten pTI- Konstrukt an die verkürzte Version des *nd169*-Gens anschließt, enthält (vgl. Abb. 3.1). Dieses Transkript weist eine Größe von 2,8 kb auf. Die mRNA des endogenen *nd169* weist dagegen eine Größe von 1,8 kb auf. Das in Abbildung 3.7 A dargestellte detektierte *nd169*-Transkript stammt folglich vom Transgen. Der Northernblot in Abbildung 3.7 zeigt deutlich, dass bei gleicher Menge an geladener Gesamt-RNA (vgl. Abb. 3.7 C) weniger Transkript sowohl des *gfp*-Gens als auch des *nd169*-Gens bei 32°C im Vergleich zu 18°C und 26°C vorliegt.

Zieht man nun die in Abbildung 3.6 A gezeigte Menge an *nd169*-spezifischen siRNAs der Zelllinie pTI-1 zur Diskussion hinzu, ergibt das ein gegenläufiges Bild. Bei 32°C liegt weniger Transkript des transgenen *nd169*-Gens vor, diese Menge wird aber von der RNAi-Maschinerie effizient genutzt um eine große Menge an siRNAs zu generieren, die dann wiederum den stärksten Silencing-Phänotyp hervorrufen. Bei 18°C steht dagegen mehr Transkript des Transgens zur Verfügung, welches auch zu deutlich detektierbaren Mengen an siRNAs umgesetzt wird (vgl. Abb. 3.6), jedoch nicht zu einem

ausreichenden Silencing-Phänotyp führt. Somit ist der beobachtete von der Temperatur abhängige Silencing-Phänotyp des endogenen *nd169*-Gens nicht auf die temperaturabhängige Transkriptmenge des Transgens zurückzuführen.

Da in Abbildung 3.7 deutlich mehr Transkript des *gfp*-Gens bei 18°C als bei 32°C vorliegt, sollten die entsprechend kultivierten Zellen auch einen Unterschied in der Fluoreszenz zeigen, sofern keine Temperaturabhängigen Stabilitätseffekte des *gfp* eine Rolle spielen. Dies sollte durch Fluoreszenzaufnahmen überprüft werden, um zu testen, wie verlässlich die aus Abbildung 3.7 gewonnenen Beobachtungen sind. Die Aufnahmen der Fluoreszenz sind in Abbildung 3.8 dargestellt.

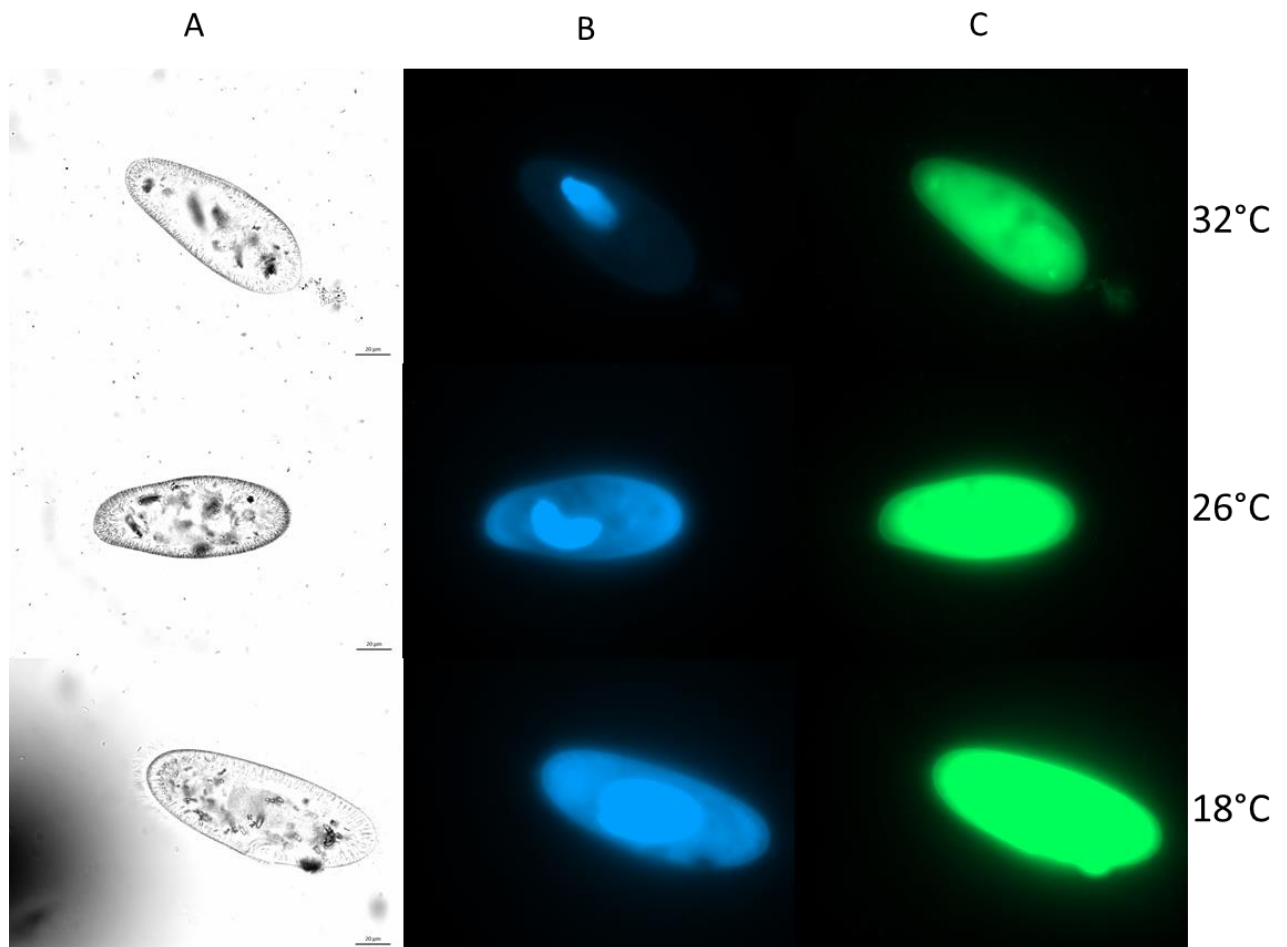


Abbildung 3.8: Fluoreszenzaufnahmen des GFPs transgener pTI- Zelllinien bei verschiedenen Temperaturen. Die Zellen wurden bei 18°C, 26°C und 32°C für mindestens drei Tage kultiviert. A) zeigt die Hellfeldaufnahme der Zelle (DIC). B) zeigt die Kernfärbung mit DAPI. C) zeigt die Fluoreszenz des GFPs bei einer Anregung mit einer Wellenlänge von $\lambda = 488$ nm. Die Belichtungszeit beträgt in C bei allen Zellen 790 ms. Der Maßstab entspricht 20 μm .

Wie in Abbildung 3.8 C deutlich zu sehen ist, fluoreszieren die Zellen bei 26°C und bei 18°C stärker als bei 32°C. Aufgrund der einheitlichen Belichtungszeit von 790 ms, lässt sich der Schluss ziehen, dass die Zellen bei 18°C tatsächlich stärker fluoreszieren und folglich mehr GFP exprimieren als bei 32°C. Es bleibt jedoch anzumerken, dass eventuelle temperaturabhängige Stabilitätseffekte des GFP-Proteins nicht ausgeschlossen werden können.

Die mittels Northernblot detektierte unterschiedliche Transkriptmenge des *gfp* (vgl. Abb. 3.7) korreliert mit der Menge an GFP-Protein, welches an Hand der Fluoreszenzaufnahmen sichtbar wird (Abbildung 3.8).

Da der stärkste Silencing-Phänotyp des endogenen *nd169*-Gens bei 32°C (vgl. Abb. 3.5) nicht an Hand einer temperaturabhängigen Transkriptmenge des injizierten Transgens zu erklären ist, wurde mittels quantitativer real-time PCR überprüft, ob einzelne Komponenten des induzierten RNAi-Mechanismus ein differentielles Expressionsmuster bei verschiedenen Temperaturen aufweisen. Hierfür wurden die Zellen erneut bei den verschiedenen Temperaturen zu einer Massenkultur angezogen und RNA isoliert. Diese wurde anschließend mit Oligo-dT-Primern in cDNA umgeschrieben. Die erhaltene cDNA wurde in der real-time PCR mit genspezifischen Primern quantitativ analysiert (2.11.2.1). Die errechneten relativen Transkriptmengen der einzelnen Komponenten, normalisiert zum Housekeeping-Gen *actin1-1*, sind in Abbildung 3.9 dargestellt.

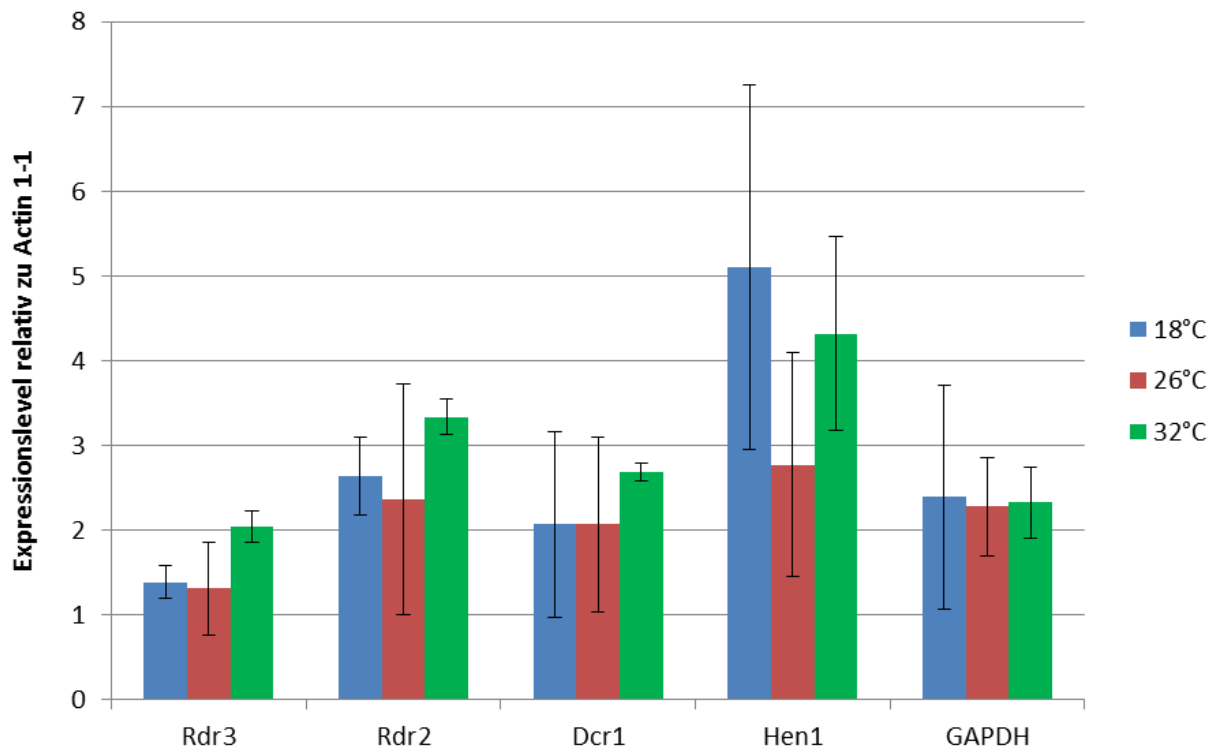


Abbildung 3.9: Relative Expressionslevel der RNAi-Komponenten bei verschiedenen Temperaturen. Dargestellt ist das zu Actin 1-1 relative Expressionslevel der einzelnen RNAi-Komponenten Rdr3, Rdr2, Dcr1 und Hen1, bestimmt durch eine quantitative real-time PCR. Die Kulturen, aus denen die RNA isoliert wurde, wurden bei verschiedenen Temperaturen (18°C, 26°C und 32°C). GAPDH wurde als weiteres Housekeeping-Gen zur internen Kontrolle herangezogen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus jeweils drei biologischen Replikaten ($n = 3$) mit Standardabweichungen. Das Signifikanzniveau wurde bei jeder getesteten Komponente für die Abweichung des Expressionslevels von 32°C und 26°C jeweils zu 18°C berechnet (T-Test; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). Die Messungen zeigen keinen signifikanten Unterschied.

In Abbildung 3.9 ist deutlich zu erkennen, dass es zwar geringfügige Unterschiede im Expressionsmuster der einzelnen Komponenten bei den verschiedenen Temperaturen gibt, diese jedoch nicht signifikant sind. Die mittels T-Test ermittelten p-Werte für die Signifikanz der Abweichung im Expressionslevel sind dem Anhang in Kapitel 8.6 zu entnehmen. Im Vergleich dazu zeigt die interne Kontrolle GAPDH keine Unterschiede. Die Komponenten Rdr2, Rdr3 und Dcr1 weisen bei 32°C das höchste Expressionslevel auf, allerdings ist dieser Anstieg um das 0,5 fache nicht signifikant. Das Expressionslevel von Hen1 weist die stärksten Schwankungen im Expressionsmuster auf, jedoch wurden hier auch die größten Standardabweichungen gemessen.

Die durchgeführten Analysen weisen darauf hin, dass der Transgen-induzierte RNAi-Mechanismus eine Abhängigkeit der Temperatur zeigt, worauf diese jedoch zurückzuführen ist, konnte in dieser

Arbeit nicht eindeutig geklärt werden. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass diese Abhängigkeit weder auf der Menge an Transkript des injizierten pTI- Konstruktes, ferner auf der Menge an synthetisierten siRNAs, noch auf der erhöhten Expression einzelner Komponenten des Mechanismus beruht.

3.2 Tiefensequenzierung kleiner RNA-Spezies aus transgenen Zelllinien

Carradec und Kollegen konnten für den dsRNA-assoziierten RNAi-Weg nicht nur primäre siRNAs, die vom originalen exogenen Triggermolekül stammen, nachweisen, sondern auch sekundäre siRNAs detektieren, die von einer mRNA stammen (Carradec *et al.*, 2014). Sekundäre siRNAs werden von einem endogenen Transkript synthetisiert. Um untersuchen zu können, ob auch im Transgen-induzierten RNAi-Mechanismus sekundäre siRNAs vorkommen, die von einem endogenen Transkript stammen, wurde zunächst versucht diese per Northernblot-Analyse zu detektieren. Im Falle des in dieser Arbeit verwendeten pTI- Transgens, könnten sekundäre siRNAs nur in dem Bereich des *nd169*-Gens nachgewiesen werden, der im Transgen im Vergleich zum endogenen *nd169*-Gen deletiert ist. Können siRNAs in diesem Bereich mit einer spezifischen Sonde im Northernblot nachgewiesen werden, können diese nur von einem endogenen Transkript stammen und sind somit sekundäre siRNAs. Ein Beispiel für den Versuch *nd169*-spezifische sekundäre siRNAs vom 3' Ende der *nd169*-Sequenz, per Northernblot zu analysieren ist in Kapitel 8.5 im Anhang dargestellt. Allerdings konnten mit der verwendeten Sonde keine sekundären siRNAs per Northernblot nachgewiesen werden (vgl. Abb. 8.2). Northernblot-Analysen lassen zudem lediglich eine Aussage über die Menge der detektierten siRNAs zu. Aussagen über die Strangspezifität oder die Orientierung der siRNAs können mit den Northernblot-Analysen nicht getroffen werden.

Um dennoch untersuchen zu können, ob es im Transgen-induzierten RNAi-Mechanismus verschiedene Klassen an siRNAs und somit sekundäre siRNAs gibt, wurden Tiefensequenzierungen kleiner RNA-Spezies durchgeführt, da hierbei zwischen primären und sekundären siRNAs innerhalb eines einzelnen Gens diskriminiert werden kann. Zudem können durch die Analyse der Tiefensequenzierungen auch Aussagen über die Strangspezifität oder den Sequenzabschnitt im Gen von welchem die siRNAs synthetisiert werden, getroffen werden.

Für diese Art der Analyse wurde RNA aus den zu untersuchenden transgenen Zelllinien isoliert (2.10.1), zu Libraries, die spezifisch für kleine RNA-Spezies sind, kloniert (2.13.1) und anschließend auf dem Hiseq-Sequenzierer mittels Illumina-next generation-Sequenzierung sequenziert.

Um eventuell Rückschlüsse auf die Synthese der siRNA-Klassen oder deren spezifische Stabilisierung ziehen zu können, wurden zunächst vor dem Hintergrund transgener Zelllinien folgende Komponenten mittels dsRNA-Feeding stillgelegt und anschließend die daraus isolierte RNA zu Libraries kloniert und sequenziert: Rdr2, Cid2, Ptiwi 8/14, Ptiwi 13, Hen1 und ICL (*icl7a*) als Kontrolle. Das Gen *icl7a* kodiert für ein nicht essentielles Protein des Cytoskeletts. Dieses Protein ist nicht in den zu untersuchenden RNAi-Mechanismus involviert. Es kann somit als Kontrolle verwendet und als „Wildtyp“ angesehen werden, da auch hier die Bedingungen des dsRNA-Feedings greifen.

Dabei wurden zunächst die Komponenten Hen1 und Ptiwi 8/14 sowie die Kontrolle ICL im Hintergrund des pTI- Konstruktes sequenziert um generelle Aussagen über die Stabilisierung der siRNAs treffen zu können und herauszufinden, ob die beiden Ptiwis 8 und 14 in die Akkumulation einer spezifischen Transgen-induzierten siRNA-Klasse involviert sind. In diversen Studien wurden Methylierungen von RNA-Spezies als Stabilitätsmerkmal ausgewiesen (Li *et al.*, 2005; Ji und Chen, 2012). Auch das Laden von RNA-Spezies, wie z.B. miRNAs, in das im RISC-Komplex enthaltene Argonauten-Protein wurde als Stabilitätsmerkmal in Säugerzellen und in *Arabidopsis* beschrieben

(Winter und Diederichs, 2011; Vaucheret *et al.*, 2006). Zudem vermittelt die Slicer-Aktivität des Argonauten-Proteins das eigentliche Silencing. Die katalytische Domäne (PAZ-Domäne) der Argonauten-Proteine, an die die RNA gebunden wird, ist zudem so aufgebaut, dass sie eine Art Tasche bildet und die RNA so vor dem Angriff von Nukleasen schützt (Vaucheret *et al.*, 2006). Argonauten- bzw. Piwi-Proteine stellen somit Schlüsselkomponenten dar.

In einer Studie von Carradec und Kollegen wurde beschrieben, dass die Komponenten Rdr2 und Cid2 einen Einfluss auf sekundäre mit dem dsRNA-Feeding assoziierte siRNAs haben (Carradec *et al.*, 2014). Zudem wurde vermutet, dass Ptiwi 13 eine Rolle bei der Akkumulation der transgenen siRNAs spielt (Marker *et al.*, 2014). Um untersuchen zu können und zu bestimmen ob diese Komponenten auch in die Akkumulation der eventuell vorkommenden sekundären Transgen-induzierten siRNAs involviert sind, wurden diese Komponenten einschließlich der ICL-Kontrolle im Hintergrund des pTI-/- Konstrukt stillgelegt und die aus diesen Kulturpflanzen isolierte RNA zu Libraries kloniert und sequenziert. Das pTI-/- Konstrukt wurde hier ausgewählt, da dieses im 5' kodierenden Bereich des *nd169*-Gens eine Region von 359 Basenpaaren zusätzlich zum deletierten Bereich des 3' Endes im Vergleich zum endogenen *nd169*-Gen aufweist, die spezifisch für eventuell vorkommende sekundäre siRNAs ist und somit mehr Bereiche zur Analyse dieser sekundären siRNAs zur Verfügung stehen.

Die Behandlung und Vorbereitung der RNA für eine mögliche Klonierung in eine siRNA-Library musste im Laufe dieser Arbeit zunächst etabliert werden. Um eine solche Library, die spezifisch für kleine RNA-Spezies ist, klonieren zu können, musste eine Zellkultur zu einer Massenkultur herangezogen werden und Gesamt-RNA aus dieser isoliert werden (2.10.1). Vor der Isolierung der RNA wurden die Zellen auf ihren vegetativen Zustand hin mittels DAPI-Färbung (2.3.8) überprüft um auszuschließen, dass die während der Autogamie sehr abundanten und ca. 26 nt langen scanRNAs nicht mitkloniert werden. Eine solche DAPI-Färbung entspricht jedoch nur einer Stichprobe, die zwar möglichst aussagekräftig gewählt wurde, der damit detektierte Zustand der Zelle jedoch nicht unbedingt auf alle Zellen der Kultur zutreffen muss. Um trotzdem auszuschließen, dass die scanRNAs mitkloniert und somit später mitsequenziert werden, wurde die isolierte Gesamt-RNA über ein denaturierendes Mini-Harnstoff-Gel aufgetrennt und der Bereich des Gels, der die RNA einer Größe zwischen 17 nt und 25 nt enthält, aus dem Gel ausgeschnitten und aufgereinigt. Dieser Bereich wurde zudem ausgewählt, da bereits von Marker und Kollegen gezeigt werden konnte, dass die im Transgen-induzierten RNAi-Mechanismus involvierten siRNAs eine ungefähre Größe von 22 nt aufweisen (Marker *et al.*, 2010), ein Laufartefakt im Gel aber nicht ausgeschlossen werden kann. Das selektive Ausschneiden aus dem Gel entspricht zudem einem ersten Aufreinigungsschritt, da so auch alle größeren und kleineren Fraktionen der RNA aussortiert werden konnten. Ein Beispiel für ein ausgeschnittenes Minigel ist in Abbildung 3.10 A dargestellt. Durch das Ausschneiden der RNA aus dem Gel und anschließendem Eluieren war ein erneutes Fällen der RNA (2.10.3) nötig. Durch dieses Verfahren wurde die Eingangsmenge an RNA für den zum Klonieren verwendeten „NEBNext® Multiplex Small RNA Library Prep Set for Illumina“-Kit jedoch deutlich reduziert, sodass im Laufe des Protokolls, die verwendeten Adapter 1:2 verdünnt in die Ligation eingesetzt wurden. Um die spätere Anzahl der Reads während der Sequenzierung zu erhöhen, wurden die ligierten siRNAs während des Protokolls des Kits per PCR amplifiziert. Um möglichst viel Template für die anschließende Sequenzierung zu erhalten, wurde eine Amplifikation von 15 Zyklen gewählt. Um nicht ligierte Adapter, Adapterdimere und restliche Primer aus der PCR-Reaktion zu entfernen, wurden die nun fertig klonierten siRNA-Libraries zusätzlich über AMPure XP Beads (Beckman/Coulter) aufgereinigt

und mittels Q-Bit Messung quantifiziert. Anschließend wurde 1 µl der Library mit einem DNA-1000-Chip auf dem Bioanalyzer überprüft. Ein Beispiel dieser Analyse ist in Abbildung 3.10 B dargestellt.

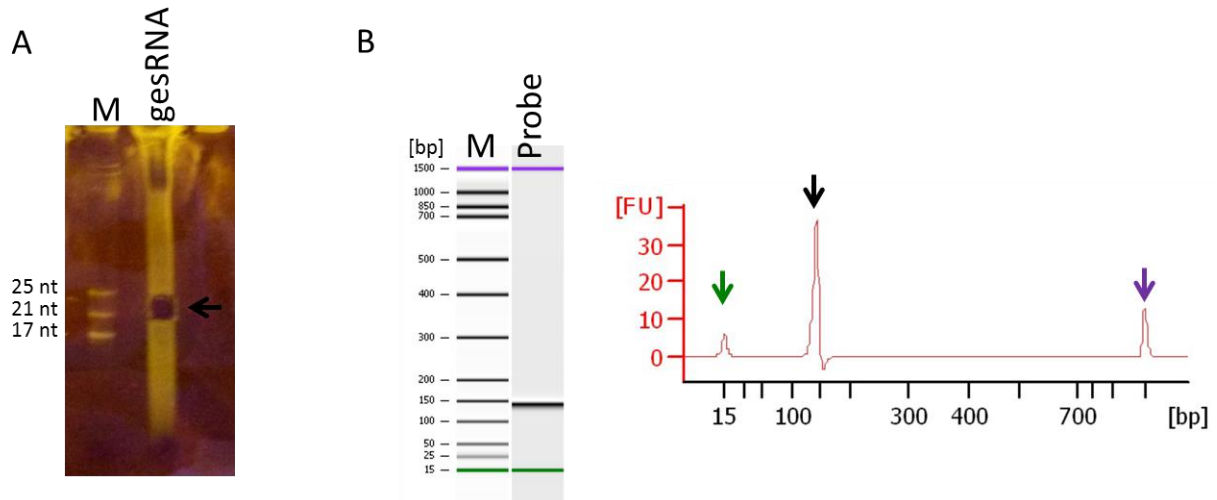


Abbildung 3.10: Aufreinigungsschritte des Klonierungsverfahrens der siRNA-Libraries. A) zeigt ein ausgeschnittenes mit SYBR® Gold gefärbtes Mini-Harnstoff-Gel. Aufgetragen wurden 50 µg einer isolierten Gesamt-RNA (*gesRNA*). Der mit einem schwarzen Pfeil markierte Bereich, der verglichen mit einem 5' hydroxylierten Markermolekül einer Größe von 19-25 nt entspricht, wurde mit einem Skalpell ausgeschnitten. B) zeigt die graphische Darstellung der Analyse mittels DNA-1000-Chip auf dem Bioanalyzer. Links ist die Auftrennung des Größenstandarts (M) gegen eine Probe dargestellt, Rechts das zugehörige Elektropherogramm der Probe. Die Peaks entsprechen der kleinsten (grüner Pfeil) und der größten (lila Pfeil) Markerbande als Referenz, sowie der Größe der klonierten Fragmente (schwarzer Pfeil).

In Abbildung 3.10 A sieht man den ausgeschnittenen Bereich eines verwendeten Mini-Harnstoff-Gels, der einer Größe zwischen 19-25 nt des hydroxylierten Markers entspricht (schwarzer Pfeil). Dieser Bereich entspricht einer Größe der zu klonierenden RNA von ca. 17-25 nt, da der Marker auf Grund der Hydroxylgruppe schneller im Gel wandert als die eigentlichen RNA-Moleküle. Aus Abbildung 3.10 B wird deutlich, dass die durchgeführten Aufreinigungsschritte der Libraries effizient waren. Es ist lediglich eine Bande in der Größe von ca. 140 bp zu erkennen. Dies entspricht der ausgeschnittenen Fragmentgröße inklusive der ligierten Adapter an beiden Enden. Die aufgereinigten und klonierten Libraries konnten somit für die Sequenzierung verwendet werden.

Um tiefere Aussagen über eine Stabilisierung von siRNAs treffen zu können, wurden in dieser Arbeit auch Libraries kloniert und untersucht, die spezifisch für methylierte siRNAs sind. Bei der Konstruktion dieser Art der Libraries wurde sich zunutze gemacht, dass die Reaktion der β -Eliminierung durch eine Behandlung der RNA mit Periodat ein zweistufiger Prozess ist. Der erste Schritt ist die β -Oxidation der RNA durch das Periodat. Durch die Oxidation der RNA liegt keine 3'-OH-Gruppe mehr vor, die für die Klonierung der Library notwendig ist. Im Falle von methylierten RNAs ist eine der *cis*-OH-Gruppen durch eine Methylgruppe ersetzt und die Reaktion der β -Oxidation ist somit blockiert. Die methylierten siRNAs sind jedoch weiterhin ligierbar.

Der zweite Schritt der Reaktion, die β -Eliminierung, stellt die Abspaltung des letzten Nukleotids dar. Diese Abspaltung kann durch ein Harnstoffgel nachvollzogen werden, da es durch die Abspaltung des letzten Nukleotids zu einem Laufunterschied im Gel im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle gibt.

Der RNA, die für diese Art der Libraries eingesetzt wurde, wurde zudem vor der Behandlung mit Periodat ein hydroxylierter Kontroll-Oligo untergemischt, sodass die Reaktion an Hand von diesem

ebenfalls nachvollzogen werden konnte. Bei der Konstruktion dieser Libraries wurden 60 µg RNA mit Periodat behandelt, die Reaktion jedoch nach der β -Oxidation abgestoppt. So konnte sichergestellt werden, dass die nicht methylierten RNA-Spezies oxidiert und damit nicht ligierbar sind und die klonierte Libraries somit nur methylierte siRNA enthalten. Bevor die behandelte RNA mit dem „NEBNext® Multiplex Small RNA Library Prep Set for Illumina“-Kit zu Libraries kloniert wurde, wurden 10 µg der β -oxidierten RNA abgezweigt und mit der Hälfte davon der zweite Schritt, die β -Eliminierung durchgeführt. Beide Proben, die 5 µg der β -oxidierten RNA und die 5 µg der β -eliminierten RNA-Probe wurden elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Membran gebロットet (2.10.5) und mit einer radioaktiv markierten Sonde gegen den Kontroll-Oligo hybridisiert (2.10.7) um die Reaktion der β -Eliminierung nachvollziehen zu können. Der zugehörige Blot ist in Abbildung 3.11 dargestellt.

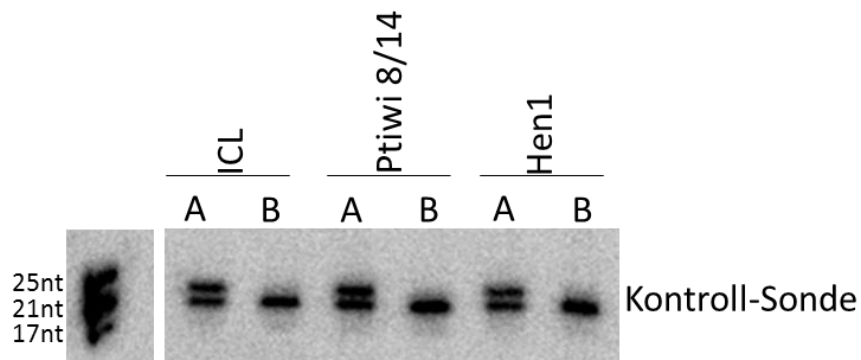


Abbildung 3.11: Northernblot als Kontrolle der siRNA-Libraries, die spezifisch methylierte siRNAs enthalten. A entspricht der Bande der β -Oxidations-Reaktion. B entspricht der Bande der β -Eliminierungs-Reaktion. Aufgetragen sind je 5 µg der behandelten isolierten RNA transgener Zelllinien im Hintergrund des pTI- Konstruktes und Feedings gegen ICL, Hen1 und die Ptiwi8/14. Dies entspricht ca. 0,25 ng des Kontroll-Oligos pro Spur. Hybridisiert wurde der Blot mit der Kontroll-Sonde gegen den Oligo. Die Exposition des Phosphoimager-Screens betrug einen Tag.

Aus Abbildung 3.11 geht hervor, dass die Reaktion der β -Eliminierung bei allen klonierten Libraries erfolgreich verlaufen ist. In den Spuren, die mit „B“ bezeichnet sind, ist klar zu erkennen, dass der zweite Schritt, die β -Eliminierung effektiv war und dies bedeutet, dass auch der erste Schritt der Reaktion, die β -Oxidation erfolgreich war. Allerdings bleibt hier anzumerken, dass bei den Spuren, die mit „A“ gekennzeichnet sind und den oxidierten Ringstrukturen entsprechen, eine Doppelbande zu sehen ist. Dies weist darauf hin, dass ein Teil der β -oxidierten RNA zu diesem Zeitpunkt schon β -eliminiert wurde und die resultierenden RNA-Moleküle wieder ligierbar sind. Trotzdem wurden die klonierten Libraries zur Sequenzierung verwendet.

3.2.1 Größenverteilung der Reads

Zunächst wurde in den verschiedenen Libraries untersucht, welche funktionelle Größe die sequenzierten siRNAs aufweisen und ob diese Größenverteilung von bestimmten Faktoren oder Komponenten abhängt. Die Größenverteilung ergab jedoch zwischen den sequenzierten Libraries keinen Unterschied, weshalb die Größenverteilung der siRNAs der pTI-*icl*-Library beispielhaft in Abbildung 3.12 dargestellt ist.

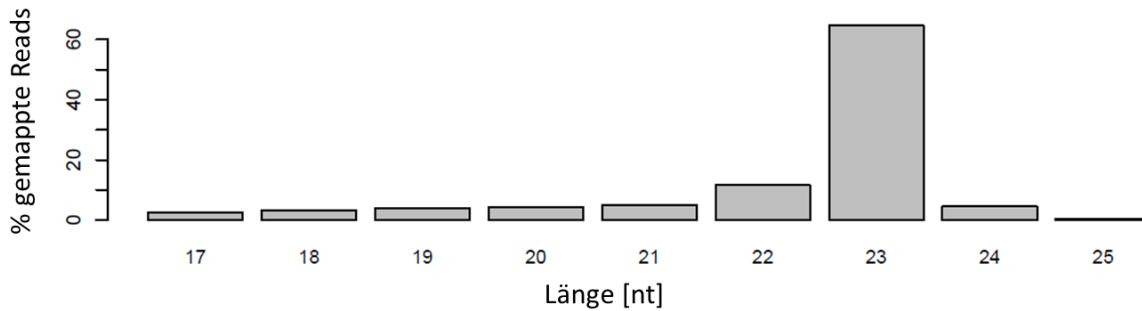


Abbildung 3.12: Größenverteilung der sequenzierten Reads. Aufgetragen ist der prozentuale Anteil der gemappten Reads gegen ihre Länge gemessen in Nukleotiden. Beispielhaft wurde die Größenverteilung der sequenzierten pTI- *icl*-Library dargestellt.

Wie in Abbildung 3.11 zu sehen ist, weisen die sequenzierten siRNAs eine dominante Länge von 23 nt auf, jedoch sind auch siRNAs in der Größe von 17 bis 25 nt zu detektieren. Diese Größenverteilung war allen sequenzierten siRNAs der verschiedenen Libraries gemein. Kleine Schwankungen der Anzahl der gemappten Reads der Länge von 17–22 nt und 24–25 nt zwischen den untersuchten Libraries waren jedoch zu detektieren. In den vorangegangenen Northernblot-Analysen weisen die Transgen-induzierten siRNAs jedoch eine Größe von 22 nt auf. Allerdings wurde die Größe von 22 nt an Hand des Abgleichs mit den Markerbanden bestimmt. Die hydroxylierten Markermoleküle wandern auf Grund der Hydroxylgruppe jedoch langsamer in einem Harnstoffgel als die phosphorylierten siRNAs. Auf Grund dieses Laufunterschiedes und aus dem Peak bei einer Länge von 23 nt in Abbildung 3.12 lässt sich schließen, dass die Größe der siRNAs von 23 nt die biologisch funktionelle Größe im Transgen-induzierten RNAi-Mechanismus darstellt.

3.2.2 Vorkommen von sekundären siRNAs und durch sie vermittelte Transitivity

Sekundäre siRNAs stellen eine Amplifikation von primären siRNAs dar. Sie werden in Pflanzen z.B. von einer RNA abhängigen RNA-Polymerase von Transkripten amplifiziert, die ursprünglich das Ziel von primären siRNAs waren (Yoshikawa, 2013). Ob diese sekundären pflanzlichen siRNAs jedoch *de novo* von der RdRP synthetisiert werden, oder ob die RdRP eine lange doppelsträngige RNA synthetisiert, aus der die sekundären siRNAs via Dicer herausgeschnitten werden, konnte bislang nicht geklärt werden. Sekundäre siRNAs wurden in weiteren Studien an *Arabidopsis* als diejenigen beschrieben, die Transitivity vermitteln (Baulcombe, 2007; Voinnet, 2008). Transitivity beschreibt das Vorkommen von sekundären siRNAs und die Ausbreitung des damit verbundenen Phänotyps über das ursprüngliche Triggermolekül hinaus.

Um zu testen, ob auch im Falle des Transgen-induzierten RNAi-Mechanismus in *Paramecium* transitive sekundäre siRNAs vorkommen, wurden die Reads aus der pTI-/*kleb*-Library gegen das endogene *nd169*-Gen gemappt. Diese Library beinhaltet RNA aus transgenen Zellen, die das pTI-/-Konstrukt tragen, jedoch keinem dsRNA-Feeding unterzogen wurden. Diese Zellen wurden mit dem Bakterium *Klebsiella pneumoniae* gefüttert, das keine dsRNA anreichert. Somit können hier allgemeine Aussagen über den Transgen-induzierten RNAi-Mechanismus und dessen siRNAs getroffen werden.

Dem pTI-/- Konstrukt fehlen im Vergleich zur endogenen Sequenz 359 Basen in der 5' Region und 227 Basen am 3' Ende des kodierenden Bereiches (Abb. 3.1). Finden sich in den sequenzierten Libraries Reads und damit siRNAs, die homolog zu den im Transgen deletierten Bereichen der endogenen Gensequenz sind, bedeutet dies, dass sekundäre siRNAs auch in diesem Mechanismus vorkommen. Da diese nur von einem Transkript des endogenen *nd169*-Gens stammen können, entsprechen sie

den für *Arabidopsis* beschriebenen transitive siRNAs, da diese mRNA des endogenen *nd169*-Gens ursprünglich Ziel der vom Transgen synthetisierten primären siRNAs ist. Eine graphische Darstellung der gemapten Reads über die endogene *nd169*-Sequenz ist in Abbildung 3.13 gezeigt.

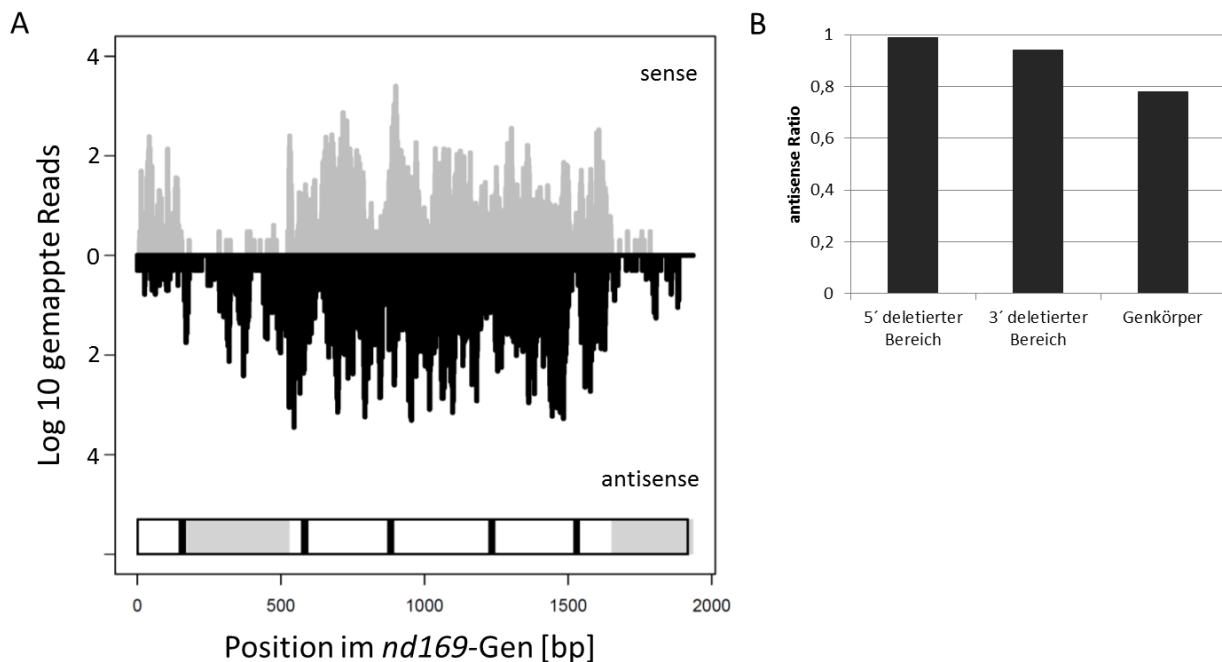


Abbildung 3.13: Verteilung der sequenzierten Reads der pTI^{-/-}-kleb-Library über die endogene *nd169*-Sequenz. **A)** zeigt den Coverageplot. Die Positionen in der *nd169*-Gensequenz sind in Basenpaaren auf der X-Achse aufgetragen und als Rechteck graphisch dargestellt. Die schwarzen Linien im Rechteck entsprechen den Introns, die Grau hinterlegten Bereiche des Rechtecks entsprechen den Regionen, die im pTI^{-/-}-Konstrukt deletiert wurden. Die Y-Achse stellt die Anzahl der gemapten Reads in einer Log₁₀-Skala unterteilt in sense (grau) und antisense (schwarz) Orientierung dar. **B)** zeigt die antisense Ratio der gemapten Reads in den Bereichen, die im pTI^{-/-}-Konstrukt deletiert wurden, sowie im Genkörper des *nd169*-Gens.

Wie in Abb. 3.13 A klar zu sehen ist, können in beiden Bereichen, die im pTI^{-/-}-Konstrukt im Vergleich zum endogenen Gen deletiert sind, eindeutig Reads und somit siRNAs nachgewiesen werden. Dies bedeutet, dass es sekundäre transitive siRNAs im Transgen-induzierten RNAi-Mechanismus gibt. Diese transitive siRNAs können sich nur vom Genkörper her ausbreiten, da nur dieser das Ziel der primären siRNAs war. So entspricht die Transitivität, die dadurch am 3' Ende des *nd169*-Gens detektiert werden kann, einer Transitivität in 3' Richtung. Die detektierte Transitivität im 5' deletierten Bereich entspricht einer Überlagerung aus 3' und 5' gerichteter Transitivität, da Genaufwärts von der im 5' Bereich des Gens deletierten Region, noch ca. 200 Basen verbleiben.

Zudem kann man in der Graphik der antisense Ratio erkennen, dass die Reads, die auf die im Transgen deletierten Bereiche mappen und sekundären siRNAs entsprechen eine über 90 %ige antisense-Orientierung aufweisen (vgl. Abb. 3.13 B). Die Ratio der antisense orientierten Reads entspricht in der 5' deletierten Region 0,99 (99 %) und in der 3' deletierten Region 0,94 (94%). Die Reads, die dagegen auf den Genkörper mappen und einer Mischung aus primären und sekundären siRNAs entsprechen, zeigen eine antisense Ratio von 0,78. Hier sind also etwas mehr sense orientierte siRNAs zu detektieren als in den anderen analysierten Bereichen.

3.3 Methylierung der siRNAs durch die 2'-O- Methyltransferase Hen1

In Abbildung 3.4 und Kapitel 3.1.2 wie auch durch Marker und Kollegen (Marker *et al.*, 2010) wurde bereits dargestellt, dass die in den Transgen-induzierten RNAi-Mechanismus involvierten siRNAs eine Modifikation an ihrem 3' Ende tragen. Bei dieser Modifikation könnte es sich um eine Methylierung handeln, da Methylierungen von RNA-Spezies schon in anderen Studien als Stabilitätsmerkmal ausgewiesen wurden (Li *et al.*, 2005; Ji und Chen, 2012). Diese Art der Modifikation ist selektiv für bestimmte RNA-Spezies. Für *Tetrahymena thermophila* konnte gezeigt werden, dass die Keimbahn assoziierten 29 nt langen scanRNAs methyliert sind, die dort vorkommenden 23-24 nt langen siRNAs jedoch nicht (Kurth und Mochizuki, 2009; Mochizuki und Kurth, 2013). Für *Paramecium tetraurelia* konnten Marker und Kollegen zeigen, dass die Transgen-induzierten siRNAs am 3' Ende modifiziert sind, die dsRNA-Feeding assoziierten jedoch nicht (Marker *et al.*, 2010). Daraus kann der Schluss gezogen werden, dass eine Methylierung unter anderem zur Diskriminierung verschiedener Klassen an siRNAs herangezogen werden kann.

Aus Studien an *Arabidopsis* weiß man, dass eine solche Methylierung durch die 2'-O-Methyltransferase Hen (Hua Enhancer) vermittelt wird (Chen *et al.*, 2002). Das Genom von *Paramecium* weist ein einziges Gen auf, das für eine potentielle 2'-O-Methyltransferase kodiert, welches nach dem Homolog aus *Arabidopsis* ebenfalls *hen1* genannt wurde (siehe auch Abb. 3.17).

Zunächst wurde phänotypisch analysiert, ob dieses Hen1-Homolog in den Transgen-induzierten RNAi-Mechanismus involviert ist. Dafür wurde Hen1 durch das dsRNA-Feeding, wie es von Galvani und Sperling beschrieben wurde, stillgelegt (Galvani und Sperling, 2002). Für den erwarteten Phänotyp des in dieser Arbeit untersuchten Transgen-induzierten RNAi-Mechanismus ergibt sich folgendes Bild: Da die Zellen ein injiziertes Transgen tragen, das Homologie zum endogenen *nd169*-Gen aufweist, und das endogene *nd169*-Gen somit stillgelegt wird, können die Zellen keine Trichozyten mehr ausstoßen. Schaltet man eine Komponente dieses Mechanismus durch das dsRNA-Feeding aus, wird dieser Mechanismus unterbrochen und die Zellen zeigen wieder einen Ausstoß der Trichozyten.

Für eine solche phänotypische Analyse wurden transgene Zellen in einer Massenkultur bei 32°C für 5 Tage mit dem entsprechenden Feeding-Medium gegen Hen1 kultiviert (2.8.4) und anschließend auf den Ausstoß der Trichozyten hin untersucht. Als Kontrolle wurde zudem das Gen *icl7a* durch dsRNA-Feeding stillgelegt, da das durch dieses Gen kodierte Protein nicht in den RNAi-Mechanismus involviert ist und für ein Protein des Cytoskeletts kodiert. Die entsprechende Graphik ist in Abbildung 3.14 A dargestellt.

Um zu überprüfen, ob Hen1 in die Akkumulation und der spezifischen Stabilisierung der Transgen-induzierten siRNAs involviert ist, wurde zudem Gesamt-RNA aus diesen Kulturen isoliert (2.10.1) und auf eine Membran geblottet (2.10.5). Zudem wurde die isolierte RNA mit Periodat behandelt (2.10.4) und ebenfalls mit auf die Membran geblottet um untersuchen zu können, ob Hen1 für die Modifikation der Transgen-induzierten siRNAs verantwortlich ist. Der Northernblot wurde mit radioaktiv markierten Sonden hybridisiert (2.10.7) und ist in Abbildung 3.14 B dargestellt.

Hierbei bleibt anzumerken, dass es schwierig ist, die *nd169*-spezifischen transgenen siRNAs in den Feeding-Kulturen zu detektieren. Dies liegt zum einen daran, dass die Menge an verbliebenen siRNAs bei einem Feeding gegen ein in ihre Synthese oder Stabilisierung involviertes Protein schwer nachzuweisen ist. Dies trifft zwar nicht auf Hen1 zu, jedoch wurde diese Methode auch für andere RNAi-Komponenten durchgeführt, bei denen die Involvierung in beide RNAi-Wege aufgezeigt werden konnte (vgl. Abb. 3.25 und Kapitel 3.5). Zum anderen kommt es teilweise zu einer Art Konkurrenz in

der Synthese der siRNAs. Durch den RNAi-Mechanismus des dsRNA-Feedings werden enorm viele Feeding-assoziierte siRNAs synthetisiert um die Komponenten still zu legen. Es wäre denkbar, dass Komponenten die in beiden RNAi-Wegen involviert sind, mit der Synthese der Feeding-assoziierten siRNAs so ausgelastet sind, dass sie keine oder nur noch sehr wenige Transgen-induzierte siRNAs synthetisieren.

Für die Detektion der Transgen-induzierten *nd169*-spezifischen siRNAs wurde daher eine radioaktiv markierte PCR-Sonde verwendet, die den kompletten open reading frame (ORF) des *nd169*-Gens abdeckt und die Exposition des Phosphoimager-Screens wurde auf drei Wochen angelegt.

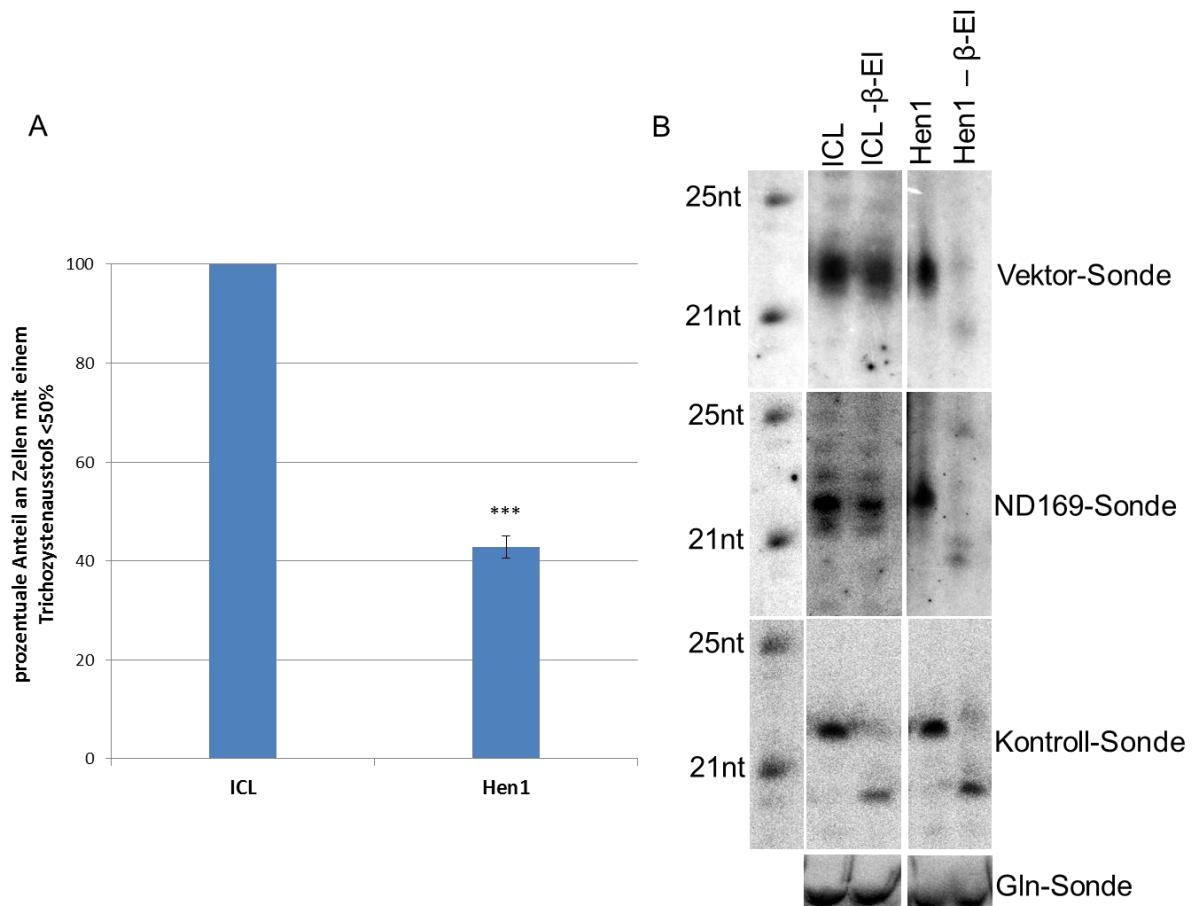


Abbildung 3.14: Nachweis der Involvierung von Hen1 in den Transgen-induzierten RNAi-Mechanismus. A) zeigt die phänotypische Analyse des Hen1-Silencings im Vergleich zur Kontrolle, dem ICL-Silencing. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der Zellen, die fähig sind mehr als 50 % ihrer Trichozysten auszustößen. Das Signifikanzniveau (T-Test; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$) wurde zur ICL-Kontrolle berechnet. Das Experiment wurde dreimal wiederholt ($n = 3$). Es wurden je 100 Zellen ausgezählt. B) zeigt den Northernblot der aus den Feeding-Kulturen isolierten und mit Periodat behandelten Gesamt-RNA gegen die unbehandelte RNA. Hybridisiert wurde der Blot mit radioaktiv markierten Sonden gegen den Vektorbereich, der sich nach der *nd169*-Sequenz auf dem Transgen befindet, um die vom Transgen synthetisierten siRNAs zu detektieren; gegen das *nd169*-Gen, um die *nd169*-spezifischen siRNAs zu detektieren; gegen den untergemischten Kontroll-Oligo um zu testen, ob die β -Eliminierungsreaktion erfolgreich verlaufen ist und mit der Gln-Sonde, die als Ladekontrolle dient. Die Exposition des Phosphoimager-Screens betrug 3 Wochen für die ND169-Sonde und die Vektor-Sonde, bzw. 1 Tag für die beiden anderen Sonden.

Aus Abbildung 3.14 A wird ersichtlich, dass die 2'-O-Methyltransferase Hen1 in den Transgen-induzierten RNAi-Mechanismus involviert ist. Es ist klar zu erkennen, dass die Anzahl der Zellen, die einen Trichozysten ausstoß von weniger als 50 % und damit den gewünschten Silencing-Phänotyp aufweisen, im Vergleich zur ICL-Kontrolle stark reduziert ist. Der prozentuale Anteil der Zellen, die keine Trichozysten ausstoßenden fällt auf 42 %. Diese Abnahme ist mit $p = 3,4e^{-9}$ hoch signifikant und

bedeutet, dass der Stilllegungs-Mechanismus, der diesem Phänotyp zu Grunde liegt, zwar noch ablaufen kann, jedoch erheblich gestört ist. Dies belegt also die Involvierung von Hen1 in diesen Mechanismus.

Vergleicht man die detektierbaren Mengen an *nd169*-spezifischen siRNAs in der Spur des Hen1-Silencings mit der Spur des ICL-Silencings auf dem Northernblot, so sieht man, dass das Stilllegen von Hen1 keinen Einfluss auf die Menge der siRNAs hat (vgl. Abb. 3.14 B ND169-Sonde). Eine Stabilisierung der siRNAs durch eine Methylgruppe scheint folglich keine oder eine nur geringe Rolle für die Akkumulation der siRNAs im untersuchten Transgen-induzierten RNAi-Mechanismus zu spielen. In beiden Spuren ist dieselbe Menge *nd169*-spezifischer siRNAs zu detektieren (vgl. Abb. 3.14 ND169-Sonde). Aus Abbildung 3.14 B und der Hybridisierung mit der Gln-Sonde wird zudem ersichtlich, dass vergleichbare Mengen an Gesamt-RNA aufgetragen wurden (vgl. Abb. 3.14 B Gln-Sonde).

Aus der Hybridisierung des Northernblots mit der ND169-Sonde wird weiter deutlich, dass die Bande der *nd169*-spezifischen siRNAs in der Spur der mit Periodat behandelten RNA des Hen1-Feedings, einen Größenunterschied von ca. 2 nt im Wanderverhalten im Vergleich zur Spur der unbehandelten RNA aufweist. Beim ICL-Feeding ist dies nicht zu beobachten. Dies bedeutet, dass die Transgen-induzierten *nd169*-spezifischen siRNAs im Hen1-Feeding zugänglich für die Periodat-Behandlung sind. Daraus lässt sich eindeutig schließen, dass die Modifikation am 3' Ende der siRNAs im Hen1-Feeding fehlt. Somit muss es sich bei dieser Modifikation um eine Methylgruppe handeln, die durch die RNA-Methyltransferase Hen1 angehängt wird. Zudem wird in der Hybridisierung des Blots mit der Kontroll-Sonde deutlich, dass die Reaktion der β -Eliminierung in den entsprechenden Spuren vollständig ablief. Es ist klar zu erkennen, dass die Bande des β -eliminierten Oligos einen Größenunterschied im Wanderverhalten von ca. 2 nt im Vergleich zur Bande des jeweiligen unbehandelten Oligos aufweist. Dies ist sowohl in der Spur der ICL-Stilllegung, als auch in der Spur der Hen1-Stilllegung zu beobachten (Abb. 3.14 B Kontroll-Sonde).

Aus Abbildung 3.14 B der Hybridisierung mit der Vektor-Sonde wird zudem ersichtlich, dass auch dort spezifische siRNAs detektierbar sind, die diesen Größenunterschied von ca. 2 nt in der Spur der β -eliminierten RNA bei der Stilllegung von Hen1 im Vergleich zur Spur der unbehandelten RNA ebenfalls aufweisen. Diese siRNAs stammen vom Vektorbereich des Transgens, der sich dem *nd169*-kodierenden Bereich des Transgens anschließt und entsprechen somit primären siRNAs. Die Lage der verwendeten Sonde ist in Abbildung 3.1 dargestellt. Allerdings bleibt hier anzumerken, dass das Grundgerüst der pTI Konstrukte dem dsRNA-Feeding-Vektor L4400 entspricht, wodurch die verwendete Vektorsonde in ihrer Sequenz auch zu dem Feeding-Vektor homolog ist und auch die primären dsRNA-Feeding assoziierten siRNAs detektieren könnte. Das zugehörige Alignment ist in Kapitel 8.9 dargestellt. Jedoch wurde von Marker und Kollegen gezeigt, dass die dsRNA-Feeding-assozierten siRNAs keine Modifikation aufweisen (Marker *et al.*, 2010). Da hier jedoch eine Modifikation aufgezeigt werden kann, kann der Schluß gezogen werden, dass hier überwiegend die primären Transgen-induzierten siRNAs detektiert werden und auch diese durch Hen1 methyliert werden.

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass sowohl die mit der Vektor-Sonde detektierbaren primären siRNAs, als auch die mit der ND169-Sonde detektierbaren primären und sekundären siRNAs ihre Modifikation am 3' Ende durch ein Stilllegen von Hen1 verlieren. Diese Modifikation stellt folglich eine Hen1-vermittelte Methylierung dar.

Für *Arabidopsis* konnte gezeigt werden, dass die miRNAs durch ein Stilllegen von Hen1 nicht mehr methyliert sind. Dieses Wegfallen der Methylgruppe führte dazu, dass die miRNAs polyuridinyliert wurden und somit zur Degradation markiert wurden (Yu *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2005; Ji und Chen *et al.*, 2012). Um untersuchen zu können, ob in *Paramecium* eventuell auch Nukleotide an die siRNAs angehängt werden, wenn die Methylgruppe durch ein Silencing von Hen1 wegfällt, wurden die Tiefensequenzierungen herangezogen. Folgende Libraries wurden daraufhin auf ihre Größenverteilung hin untersucht: die pTI-*icl*-Library (ICL) als Kontrolle und die pTI-*hen1*-Library (Hen1) sowie die für methylierte siRNAs spezifische Libraries, pTI-*icl*/Me-Library (ICL-Me) und die pTI-*hen1*/Me-Library (Hen1-Me). Abbildung 3.15 zeigt die graphische Darstellung dieser durchgeführten Analysen in den verschiedenen Libraries.

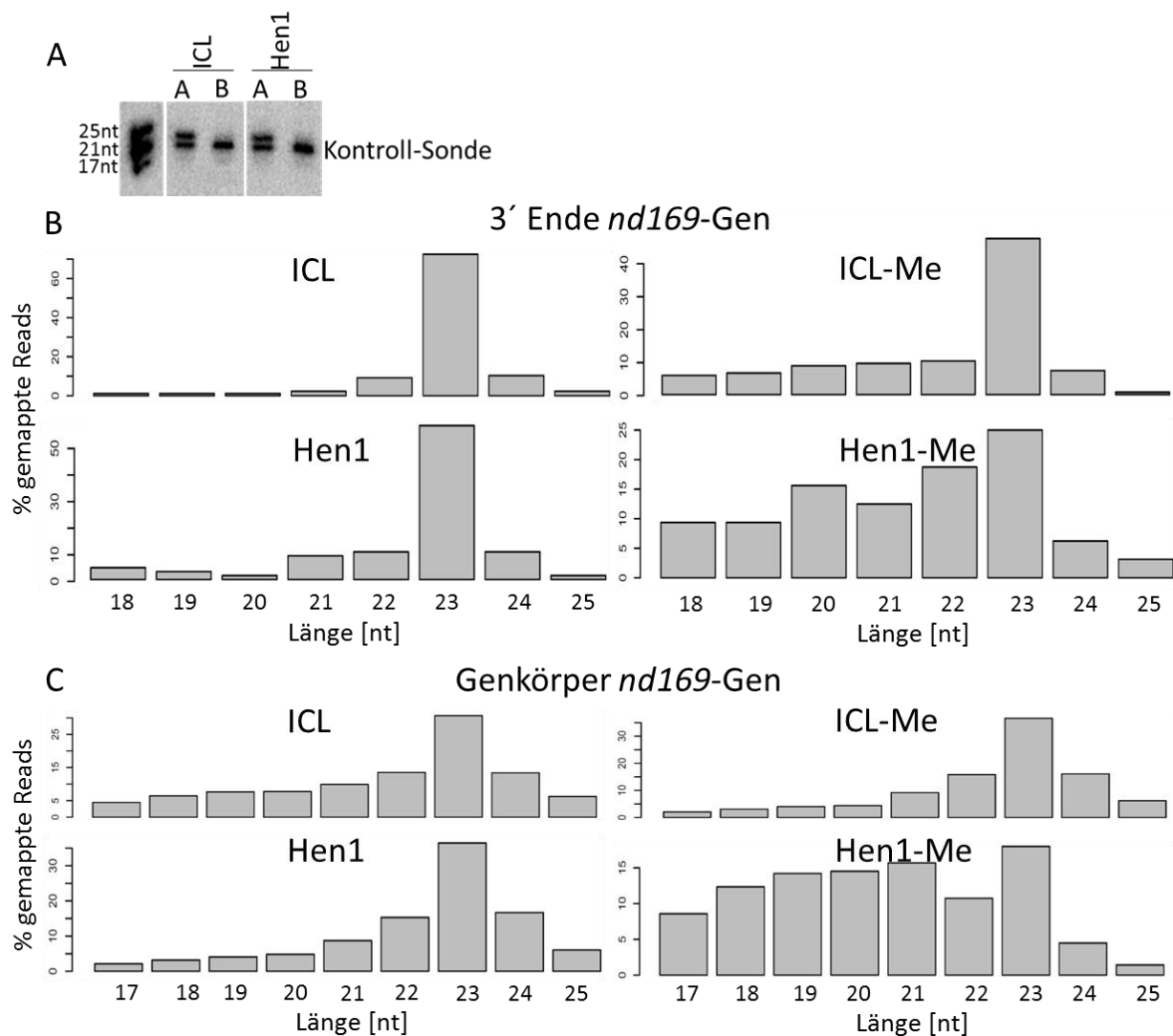


Abbildung 3.15: Nachweis der Methylierung sekundärer Transgen-induzierter siRNAs an Hand der Tiefensequenzierungen. A) zeigt den Northern blot als Kontrolle der siRNA-Libraries, die spezifisch methylierte siRNAs enthalten, wobei A der Bande der β -Oxidations-Reaktion und B der Bande der β -Eliminierungs-Reaktion entspricht. Aufgetragen sind je 5 μ g der behandelten isolierten RNA transgener Zelllinien im Hintergrund des pTI-Konstruktes und Feedings gegen ICL und Hen1. Dies entspricht ca. 0,25 ng des Kontroll-Oligos pro Spur. Hybridisiert wurde der Blot mit der Kontroll-Sonde gegen den Oligo. Die Exposition des Phosphoimager-Screens betrug einen Tag. B) zeigt die prozentuale Größenverteilung der gemappten Reads am 3' Ende des *nd169*-Gens. Dargestellt sind jeweils die Sequenzierungen der pTI-*icl*-Library (ICL) als Kontrolle und der pTI-*hen1*-Library (Hen1) sowie die für methylierte siRNAs spezifische Libraries, pTI-*icl*/Me-Library (ICL-Me) und die pTI-*hen1*/Me-Library (Hen1-Me). C) zeigt die prozentuale Größenverteilung der gemappten Reads im Genkörper des *nd169*-Gens.

Aus Abbildung 3.15 A lässt sich zunächst erkennen, dass die Reaktion der β -Eliminierung sowohl in der pTI-*icl*/Me-Library (ICL) als auch in der pTI-*hen1*Me-Library (Hen1) erfolgreich war. Dies bedeutet, dass diese beiden Libraries nur siRNAs enthalten, die methyliert sind und somit zur genaueren Charakterisierung dieser herangezogen werden können.

Abbildung 3.15 B zeigt die Analyse des 3' Ende des *nd169*-Gens und somit der sekundären siRNAs, da nur diese in dieser Region des *nd169*-Gens mappen können. Vergleicht man die pTI-*icl*-Library (ICL) mit der pTI-*hen1*-Library (Hen1), so sieht man, dass ein Wegfallen der Methylierung durch das Stilllegen von Hen1 keinen Einfluss auf die Größenverteilung der siRNAs hat. Daraus lässt sich schließen, dass das Wegfallen der Methylgruppe nicht das Anhängen von Nukleotiden nach sich zieht, wie es z.B. für die miRNAs aus *Arabidopsis* beschrieben wurde (Yu *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2005; Ji und Chen *et al.*, 2012).

Auch in der pTI-*icl*/Me-Library (ICL-Me) ist in dieser analysierten Region kein Unterschied in der Größenverteilung der gemappten Reads zu erkennen. In der Analyse der pTI-*hen1*Me-Library (Hen1-Me) in dieser Region ist jedoch zu sehen, dass die Größenverteilung zusammenbricht. Es ist kein eindeutiger Peak mehr bei 23 nt zu sehen (vgl. Abb. 3.15 B). Die detektierten Reads in dieser Library entsprechen den sekundären siRNAs, die trotz des Stilllegens von Hen1 noch methyliert sind, was folglich einer Restaktivität von Hen1 entspricht oder stellen unmethylierte Degradationsprodukte dar, die nach der Behandlung der RNA mit Periodat bei der Konstruktion der Libraries wieder ligierbar waren (vgl. Abb. 3.11).

Die siRNAs, die auf den Genkörper des *nd169*-Gens mappen (Abb. 3.15 C), können sowohl primäre als auch sekundäre siRNAs sein. Die Analyse dieser Region entspricht folglich einer Mischung beider siRNA-Klassen. Vergleicht man erneut die pTI-*icl*-Library (ICL) mit der pTI-*hen1*-Library (Hen1), so sieht man, dass ein Wegfallen der Methylierung durch das Stilllegen von Hen1 auch hier keinen Einfluss auf die Größenverteilung beider siRNA-Klassen hat. Auch die Größenverteilung der pTI-*icl*/Me-Library (ICL-Me) aus Abbildung 3.15 C zeigt dieselbe Größenverteilung der gemappten Reads wie die pTI-*icl*-Library (ICL) und die pTI-*hen1*-Library (Hen1). Auch hier ist zu sehen, dass die Größenverteilung der Reads nur bei der Analyse der pTI-*hen1*Me-Library (Hen1-Me) zusammenbricht. Auch hier ist kein eindeutiger Peak bei einer Größe von 23 nt mehr zu detektieren (vgl. Abb. 3.15 C).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das Wegfallen der Methylierung keinen oder einen nur geringen destabilisierenden Effekt auf die Größenverteilung der siRNAs ausübt. Eine Änderung der Größenverteilung, wie es bei einer Polyuridinylierung nach dem Wegfallen der Methylgruppe für *Arabidopsis* gezeigt wurde, konnte hiermit nicht bestätigt werden.

Um den Einfluss der fehlenden Methylierung auf die siRNAs besser beschreiben zu können, wurden die Tiefensequenzierungen der pTI-*icl*-Library (ICL) als Kontrolle und der pTI-*hen1*-Library (Hen1), sowie der pTI-*icl*/Me-Library (ICL-Me) und der pTI-*hen1*Me-Library (Hen1-Me) darauf hin untersucht. Das Ergebnis dieser Analysen ist in Abbildung 3.16 dargestellt.

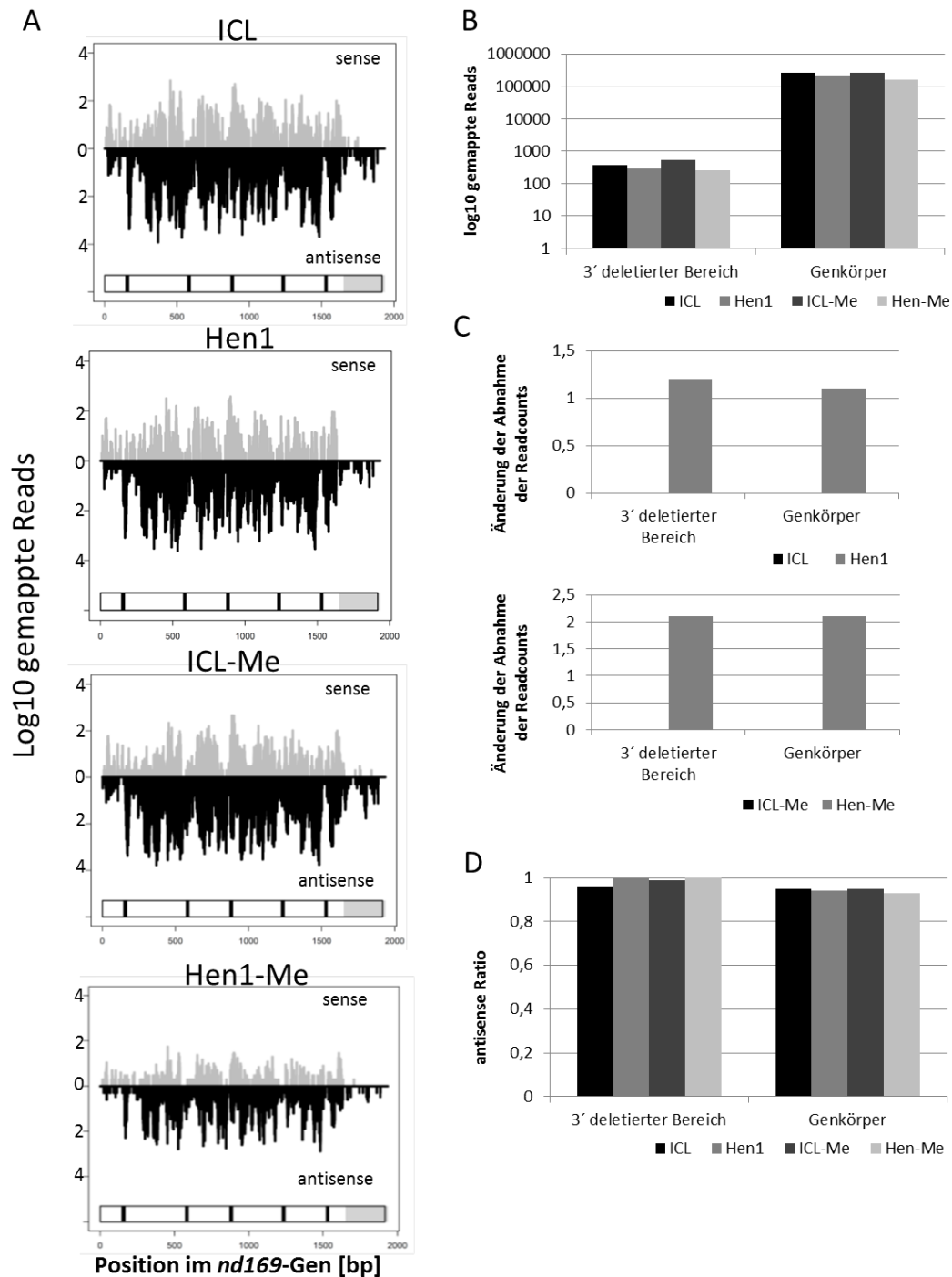


Abbildung 3.16: Verteilung der sequenzierten Reads über die endogene *nd169*-Sequenz der pTI-*hen1*-Library (Hen1) im Vergleich zur pTI-*icl*-Library (ICL). A) Coverageplots. Die Positionen in der *nd169*-Gensequenz sind in Basenpaaren auf der X-Achse aufgetragen und als Rechteck graphisch dargestellt. Die schwarzen Linien im Rechteck entsprechen den Introns, die Grau hinterlegten Bereiche des Rechtecks entsprechen den Regionen, die im pTI-Konstrukt deletiert wurden. Die Y-Achse stellt die Anzahl der normalisierten gemapten Reads in einer Log₁₀-Skala unterteilt in sense (grau) und antisense (schwarz) Orientierung dar. B) entspricht der graphischen Darstellung der normalisierten mappenden Readzahlen in den verschiedenen Regionen, die im pTI-Konstrukt deletiert wurden, sowie im Genkörper des *nd169*-Gens. C) zeigt die Änderung der Abnahme der gemapten Reads in den verschiedenen Regionen der pTI-*hen1*-Library im Vergleich zur pTI-*icl*-Library und der pTI-*hen1Me*-Library im Vergleich zur pTI-*iclMe*-Library D) zeigt die antisense Ratio der gemapten Reads in den Bereichen, die im pTI-Konstrukt deletiert wurden, sowie im Genkörper des *nd169*-Gens.

Abbildung 3.16 A und B bestätigen den Schluss aus den vorherigen Analysen, dass das Wegfallen der Methylierung durch ein Stilllegen von Hen1 keinen oder einen nur geringen Effekt auf die Verteilung

der Reads über das *nd169*-Gen oder deren Stabilisierung ausübt. Es sind in der pTI-*hen1*-Library (Hen1) insgesamt weniger Reads zu verzeichnen, die auf die einzelnen Regionen im Vergleich zur pTI-*icl*-Library (ICL) mappen (Abb. 3.16 A und B). In beiden analysierten Bereichen ist eine 1-1,2fache Abnahme der mappenden Reads zu detektieren (Abb. 3.16 C oberer Graph). Auch die Orientierung der siRNAs ändert sich durch ein Stilllegen von Hen1 nicht. In beiden analysierten Bereichen des *nd169*-Gens liegt die antisense Ratio beider Libraries ungefähr bei 1 (Abbildung 3.16 D). Somit kann der Schluss gezogen werden, dass das Hen1 nicht zwischen sense und antisense orientierten siRNAs unterscheidet und beide gleichermaßen methyliert.

Betrachtet man die pTI-*hen1*Me-library (Hen-Me), so ist zu sehen, dass im Vergleich zur pTI-*icl*Me-Library (ICL-Me) weniger Reads auf die analysierten Bereiche mappen (vgl. Abb. 3.16. A und B). Sowohl im 3' deletierten Bereich als auch im Genkörper nimmt die Anzahl der mappenden Reads um das Zweifache ab (vgl. Abb. 3.16 C unterer Graph). Die Ratio des antisense orientierten Reads ändert sich jedoch bei einer Stilllegung von Hen1 im Vergleich zu ICL in beiden analysierten Bereichen nicht (vgl. Abb. 3.16 D). Es bleibt hier jedoch anzumerken, dass die Hen1-Me-Library Reads der methylierten siRNAs enthält, die aus einer Restaktivität von Hen1 trotz der Stilllegung stammen oder aber sie enthält Reads von RNAs, die nach der Behandlung mit Periodat wieder ligierbar waren (vgl. Abb. 3.11). Eindeutige Rückschlüsse auf die Methylierung von primären oder sekundären siRNAs können somit an Hand von dieser Library nicht gezogen werden.

3.4 Lokalisation von Hen1

RNAi-Mechanismen können in verschiedenen Kompartimenten der Zelle ablaufen und unterschiedliche Regulationsformen induzieren. Diese Regulationen können entweder transkriptionell oder post-transkriptionell ablaufen. Bei der post-transkriptionellen RNAi werden die Gene zwar transkribiert, die mRNA wird jedoch durch den RISC-Komplex zur Degradation markiert oder die Translation gehemmt. Bei der transkriptionellen RNAi werden ebenfalls durch den RISC-Komplex modifizierende Enzyme zum Chromatin geleitet, was zu einer Änderung der Modifikationen am Chromatin führen kann und somit zu einer Änderung der Transkriptionsrate. Um untersuchen zu können in welchem Kompartiment der Transgen-induzierte RNAi-Mechanismus abläuft und eventuelle Schlüsse auf die Art der Regulierung ziehen zu können, wurde ein Antikörper gegen ein Protein des Transgen-induzierten RNAi-Mechanismus synthetisiert. Das Hen1-Protein stellt für diese Zwecke den optimalen Kandidaten dar. Hen1 liegt in *Paramecium tetraurelia* als „single copy“ Gen vor, obwohl *Paramecium* drei Genomduplikationen durchlief (Aury *et al.*, 2006). So weisen 68 % der Gene in *Paramecium* mindestens ein Ohnolog im Genom auf (Aury *et al.*, 2006). Dies lässt vermuten, dass der Selektionsdruck auf diesem Gen sehr hoch ist und dieses Enzym essentiell für die Zelle sein könnte. Somit ist es unwahrscheinlich, dass es zu spezifischen Kreuzreaktionen des Antikörpers mit ähnlichen Proteinen kommen kann. Das Hen1 aus *Paramecium* besitzt eine einzige katalytische Domäne, die einer Methyltransferase-Domäne (MTase) entspricht. Dies wurde durch einem Abgleich mit der Pfam-Datenbank (Finn *et al.*, 2014) bestätigt. Diese Analyse ist vergleichend mit einer von Vilkaitis und Kollegen durchgeführten Studie (Vilkaitis *et al.*, 2010) in Abbildung 3.17 dargestellt.

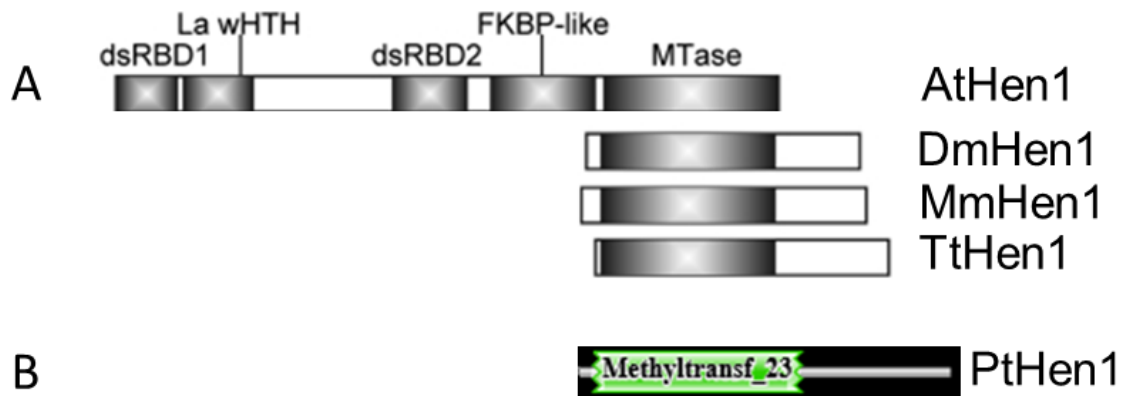


Abbildung 3.17: Analyse der Proteindomänen verschiedener Hen1-Homologe. A) zeigt die aus Vilkaitis *et al.*, 2010 entnommene modifizierte schematische Analyse der Proteindomänen verschiedener Hen1-Homologe aus *Arabidopsis thaliana* (AtHen1), *Drosophila melanogaster* (DmHen1), *Mus Musculus* (MmHen1) und *Tetrahymena thermophila* (TtHen1). B) zeigt das Ergebnis der Analyse der Proteindomänen von Hen1 aus *Paramecium tetraurelia* (PtHen1) mit Hilfe der Pfam-Datenbank (Finn *et al.*, 2014).

Aus Abbildung 3.17 wird ersichtlich, dass das Hen1-Homolog aus *Arabidopsis* neben der MTase-Domäne als einziges Protein noch zahlreiche andere Domänen aufweist, wie zum Beispiel die beiden dsRBD-Motife, die Bindedomänen für doppelsträngige RNA-Moleküle darstellen. Alle weiteren analysierten homologen Hen1-Proteine aus den anderen Organismen einschließlich *Paramecium* besitzen dagegen nur eine einzige bekannte Proteindomäne: die MTase-Domäne. Diese scheint somit in allen eukaryotischen RNA-Methyltransferasen sowohl in ihrer Sequenz als auch in ihrem Vorkommen hoch konserviert zu sein. Um dies genauer beschreiben zu können, wurde als nächstes ein Alignment dieser MTase-Domäne aus verschiedenen Organismen angefertigt. Dies ist in Abbildung 3.18 dargestellt.

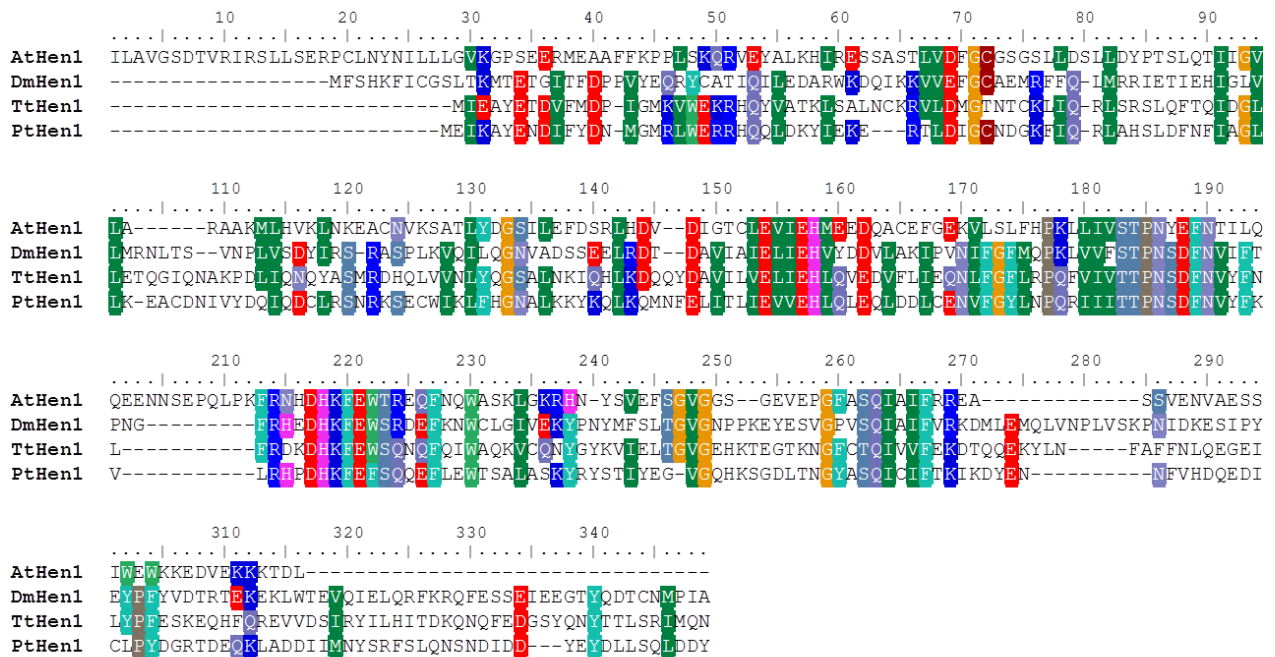


Abbildung 3.18: Alignment der MTase-Domänen der Hen1-Homologe aus verschiedenen Organismen. Das Alignment wurde mit Hilfe des Programms ClustalW erstellt (Thompson *et al.*, 1994). Hierfür wurden die Proteinsequenzen der MTase-Domänen aus *Arabidopsis thaliana*, *Drosophila melanogaster*, *Tetrahymena thermophila* und *Paramecium tetraurelia* gegeneinander abgeglichen. Farblich hinterlegt sind die identischen bzw. zueinander sehr ähnlichen Aminosäuren. Der Schwellenwert für identische Aminosäuren pro Position beträgt 75 %.

An Hand des Alignments in Abbildung 3.18 kann bestätigt werden, dass die MTase-Domänen der analysierten Hen1-Homologe aus den verschiedenen Organismen starke Ähnlichkeiten zueinander aufweisen und diese MTase-Domäne somit in den untersuchten Organismen konserviert ist. Die meisten Abweichungen im Alignment mit den anderen Sequenzen weist die Sequenz aus *Arabidopsis* auf. Dies könnte darauf beruhen, dass diese analysierte Sequenz die einzige pflanzliche ist, die anderen Sequenzen tierischen Ursprungs sind.

Auf Grund dieser Analysen stellt sich die MTase-Domäne des Hen1 als geeignet dar, um als Antigen-Sequenz verwendet zu werden. Zur Erzeugung ausreichender Mengen an Antigen zur Immunisierung eines Hasen und anschließender Antikörper-Gewinnung, wurde das Antigen in *E. coli* überexprimiert (2.12.6). Hierzu wurde die Aminosäuresequenz des ausgesuchten Antigens aus *Paramecium* in den DNA-Code von *E. coli* revers translatiert. Damit die Antikörper später jedoch auch das *Paramecium* spezifische Hen1-Protein detektieren können, musste bei dieser reversen Translation darauf geachtet werden, dass *Paramecium* einen anderen Kodoncode verwendet als *E. coli*. Die so generierte Sequenz, die für das Antigen kodiert und dem Kodoncode von *Paramecium* entspricht, hat eine Länge von 459 Nukleotiden und ist dem Anhang zu entnehmen (vgl. 8.1). Diese Sequenz wurde von der Firma GenScript artifiziell synthetisiert und im Rahmen dieser Arbeit in den Expressionsvektor pRSETA kloniert und in *E. coli* Rosetta2 überexprimiert. Das Plasmid pRSETA kodiert zudem für einen His-Tag. Um nachzuweisen, dass das Antigen tatsächlich überexprimiert wird, wurde Gesamt-Protein isoliert und gegen den WT auf einem SDS-Gel aufgetrennt und mit Blue-Silver gefärbt (Daten nicht gezeigt). Um das überexprimierte Antigen zur Gewinnung eines Antikörpers einsetzen zu können, wurde eine Aufreinigung über Ni/NTA-Beads durchgeführt (2.12.6.1). Hierbei bindet der negativ geladene His-Tag an die positiv geladenen Nickelkügelchen und das Protein kann so über eine Säule

aufgereinigt werden. Das mit Blue-Silver gefärbte SDS-Gel einer solchen Aufreinigung ist in Abbildung 3.19 dargestellt.

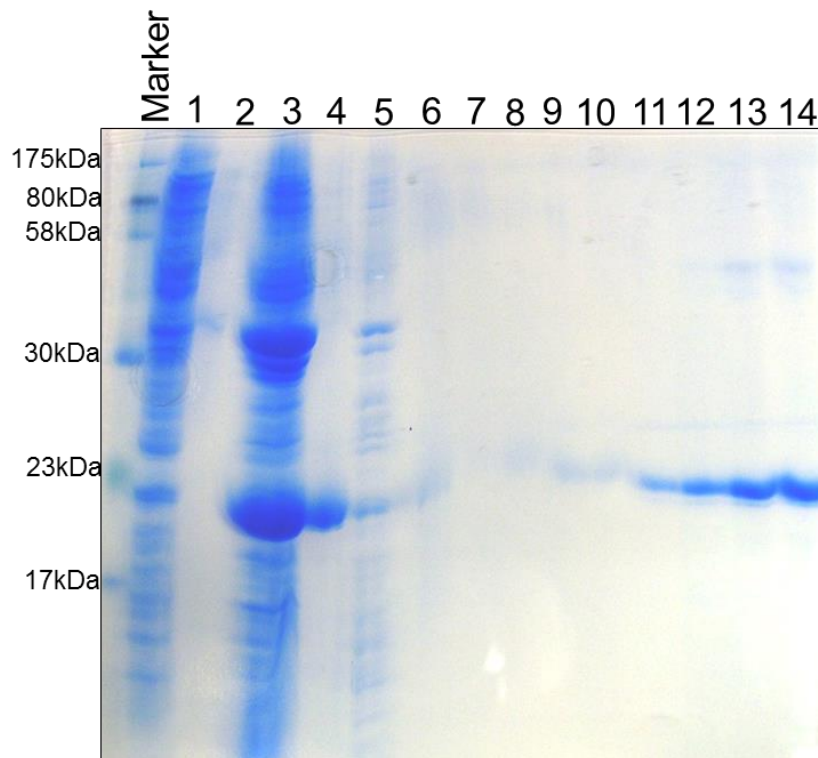


Abbildung 3.19: Mit Blue-Silver gefärbtes SDS-Gel des über eine Ni/NTA-Säule aufgereinigten Hen1-Antigens. Aufgetragen wurden je 10 µl der entnommenen Probe pro Aufreinigungsschritt. Dabei entspricht die Spur 1 dem Überstand nach der Sonifizierung der Zellen, 2 dem aufgefangenem Waschpuffer nach dem Sonifizieren, 3 den Zelltrümmern der sonifizierten Zellen, 4 den Nickelbeads, 5 dem Durchfluss des Lysats über die Nickelsäule und die Spur 6 dem Waschpuffer der Nickelsäule. Die Spuren 7 bis 10 zeigen die Elutionen mit Puffer D, die Spuren 11 bis 14 die Elutionen mit Puffer E.

Das Molekulargewicht des überexprimierten Antigens von Hen1 beträgt zusammen mit dem His-Tag ca. 18,5 kDa, wobei das Molekulargewicht des His-Tags nur knapp 1 kDa (Terpe, 2003) entspricht. In Abbildung 3.18 ist zu sehen, dass diese spezifische Bande in den Zellen angereichert ist (vgl. Abb. 3.19 Spur 3). Zudem ist in dieser Abbildung zu erkennen, dass das Protein über eine Nickelsäule erfolgreich aufgereinigt werden kann (vgl. Abb. 3.19 Spuren 11-14). Zur Immunisierung eines Hasen und anschließender Antikörper-Gewinnung konnte dieses Antigen folglich verwendet werden. Die Antigenmenge des Eluats der Nickelsäule, das in Abbildung 3.19 Spur 14 am meisten Antigen enthält, wurde quantifiziert und zur Immunisierung eines Hasen an die Firma Seqlab übermittelt. Dort wurde einem Hasen nach einem dreimonatigen Immunisierungs-Schema insgesamt viermal das Antigen injiziert und zu verschiedenen Zeitpunkten Blutproben entnommen, um zu testen, ob der Hase Antikörper gegen das injizierte Antigen bildet. Um die erhaltenen Blutproben testen zu können, wurden verschiedene Mengen des aufgereinigten Antigens auf eine Membran gedotet und anschließend mit den Blutseren, welche Antikörper gegen das Antigen enthalten sollten, dekoriert. Der zugehörige Dotplot ist in Abbildung 3.20 dargestellt.

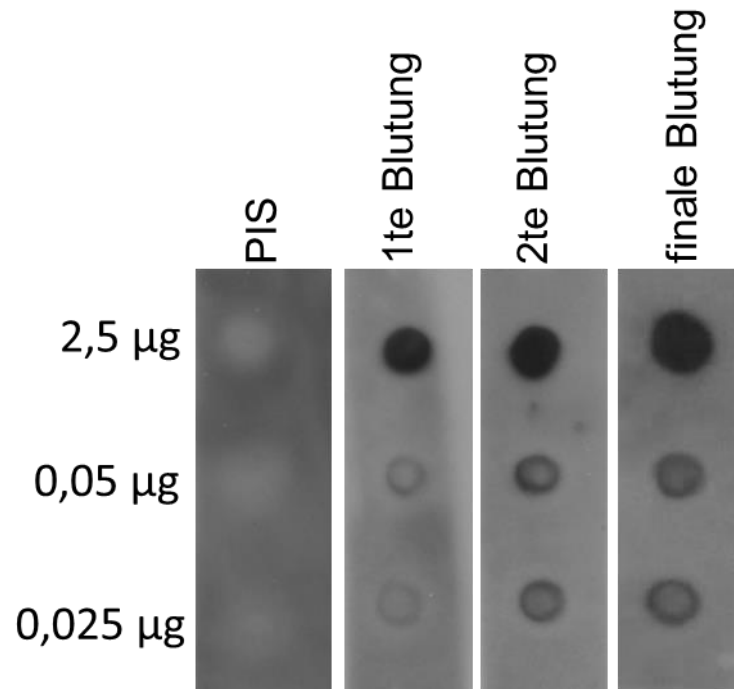


Abbildung 3.20: Dotblot des Hen1-Antigens. Aufgetragen wurden 0,0025 µg, 0,5 µg und 2,5 µg des Hen1-Antigens in pUC57. PIS (Präimmunserum) stellt die Blutprobe des immunisierten Hasen vor der ersten Injektion dar, 1te Blutung entspricht der Blutabnahme des Hasen nach der zweiten Injektion mit dem Antigen und die 2te Blutung entspricht der Blutprobe nach der dritten Injektion des Hasen mit dem Antigen. Die finale Blutung entspricht der Blutprobe mit dem finalen Antikörpertiter. Die Seren wurden jeweils 1:100 verdünnt über Nacht mit dem Blot inkubiert. Der sekundäre Anti-Hase-Antikörper wurde 1:5000 für 1 Stunde inkubiert. Die Entwicklungszeit betrug 1 Sekunde.

Aus Abbildung 3.20 bei der Hybridisierung mit dem Präimmunserum (PIS) wird ersichtlich, dass der Hase zunächst nicht auf das Hen1-Antigen reagiert. Dies bedeutet, dass der Versuchstier hatte zuvor noch keinen Kontakt zu einem ähnlichen Protein oder Organismus und hat somit noch keine Antikörper gegen Hen1 im Blut. Der Hase konnte somit immunisiert und zur Antikörper-Gewinnung genutzt werden.

In der Spur der ersten Blutung in Abbildung 3.20 ist deutlich zu erkennen, dass das Tier nach der zweiten Injektion mit dem Antigen bereits spezifische Antikörper gebildet hat. In der Spur der zweiten Blutung in Abbildung 3.20 wird deutlich, dass hier auch eine Konzentration des Antigens von 0,025 µg gut zu detektieren ist. Daraus lässt sich folglich schließen, dass die Immunisierung des Hasen mit dem Hen1-Antigen erfolgreich verlief und der Hase steigende und ausreichende Mengen an Antikörper gegen das Antigen gebildet hat. Nach einer weiteren Injektion des Hasen mit einer größeren Menge des Antigens wurde die finale Blutung eingeleitet. Das erhaltene Blutserum entspricht nun einem polyklonalen Antiserum gegen das Hen1-Antigen. Der Antikörpertiter der finalen Blutung ist ausreichend um das Antigen in geringen Mengen zu detektieren (vgl. Abb. 3.20 finale Blutung).

Um einen Hinweis auf die Lokalisation von Hen1 in der Zelle zu bekommen, wurden neben dem Gesamt-Protein auch Proteinfractionen aus isolierten Kernen elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Membran geblottet (2.12.4). Das Serum wurde über eine Affinitätsaufreinigung aufgereinigt, um unspezifische Antikörper aus dem Serum zu filtern (2.12.7). Der Westernblot wurde mit dem aufgereinigten Serum dekoriert und ist in Abbildung 3.21 dargestellt. Hierbei wurden Zelläquivalente Mengen des jeweils aufgereinigten Proteins aus je 5 000 Zellen aufgetragen (vgl. 2.12.1).

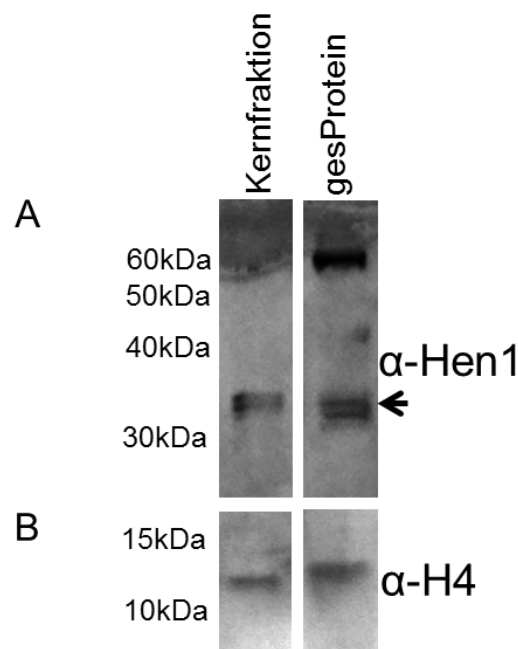


Abbildung 3.21: Westernblot des aufgereinigten Hen1-Antikörpers. Aufgetragen sind Äquivalente Proteinmengen aus 5000 Zellen an Gesamt-Protein bzw. an isoliertem Protein der Kernfraktion. A) zeigt die Dekorierung mit dem Affinitätsaufgereinigtem Antiserum gegen Hen1 (α -Hen1). Der schwarze Pfeil entspricht der spezifischen Bande des nativen *Paramecium* Hen1 von 39,6 kDa. Zur Dekorierung wurden 100 μ l des „rohen“ Serum aufgereingt und in einer 1:1000 Verdünnung über Nacht inkubiert. Der sekundäre Anti-Hase-Antikörper wurde 1:5000 für eine Stunde inkubiert. Die Entwicklungszeit betrug zwei Minuten. B) zeigt die Dekorierung mit einem Antikörper gegen das Histon 4 (α -H4). Diese Markierung dient als Ladekontrolle. Dieser Antikörper wurde 1:1000 verdünnt über Nacht mit dem Blot inkubiert. Der sekundäre Anti-Hase-Antikörper wurde 1:5000 für eine Stunde inkubiert. Die Entwicklungszeit betrug drei Minuten.

Die Abbildung 3.21 A zeigt deutlich, dass der vom Hasen gebildete Antikörper-Titer ausreicht um das native Hen1-Protein in einem Westernblot zu detektieren. Aus dieser Abbildung wird zudem ersichtlich, dass die spezifische Bande des nativen Hen1, die einem an Hand der Markerbanden abgelesenen Molekulargewicht von 35 kDa entspricht (Abb. 3.21 schwarzer Pfeil), sowohl im aufgetragenen Gesamt-Protein, als auch in der Proteinfraction der zuvor isolierten Kerne zu detektieren ist. Allerdings entspricht die Laufhöhe der Bande auf dem Blot nicht ganz dem an Hand der Aminosäuresequenz errechneten Molekulargewicht von 39,6 kDa. Jedoch muss das errechnete Molekulargewicht von 39,6 kDa nicht mit dem Laufverhalten des nativen Proteins in einem SDS-Gel übereinstimmen. Es ist davon auszugehen, dass es sich bei der Bande mit den abgelesenen 35 kDa tatsächlich um das markierte Hen1-Protein handelt.

In der Spur des Proteins aus der Kernfraktion wurde insgesamt weniger Protein aufgetragen (vgl. Abb. 3.21 B). Da die Hen1 spezifische Bande trotz geringer geladener Proteinmenge auch in der Proteinfraction der Kerne zu sehen ist, gibt dies einen Hinweis darauf, dass Hen1 in den Kernen lokalisiert sein könnte.

Mit dem Hen1-Serum wurde eine weitere wahrscheinlich unspezifische Bande in der Spur des Gesamt-Proteins markiert. Diese weist ein Molekulargewicht von etwa 60 kDa auf (Abb. 3.21 A).

Um die tatsächliche Lokalisation von Hen1 nachzuweisen, wurde im Folgenden eine Immunfluoreszenzfärbung gegen das Hen1-Protein durchgeführt. Da das aufgereinigte polyklonale Serum jedoch unspezifische Banden im Gesamt-Protein (vgl. Abb. 3.21 A) detektiert und dies bei einer Immunfluoreszenzfärbung zu falsch-positiven Ergebnissen führen könnte, konnte dieses Serum für die Färbungen nicht genutzt werden. Deshalb wurde ein Fusionsprotein von Hen1 mit einem Flagtag hergestellt. Somit kann anschließend mit einem monoklonalen Antikörper gegen den Flagtag

das Fusionsprotein in der Immunfluoreszenzfärbung detektiert werden. Die Fusion mit einem Flagtag sorgt zudem für eine Signalverstärkung, da der Flagtag als dreifache Kopie vorliegt (3xFlagtag) und somit mehr spezifische primäre Antikörper gegen den Flagtag an das Fusionsprotein binden können. Folglich können auch mehr sekundäre Antikörper den gebundenen primären Antikörper detektieren und dies führt zu mehr fluorochromen Gruppen, die angeregt und dann detektiert werden können.

Für die Herstellung des Fusionsproteins wurde zunächst die für das Hen1 kodierende Gensequenz per PCR und speziellen Primern (vgl. Tab. 2.4) amplifiziert. Diese Gensequenz wurde in den passenden ORF der für die Flagtag kodierenden Sequenz in ein Plasmid kloniert. Dieses Plasmid konnte dann durch die Mikroinjektion in *Paramecium* eingebracht werden, wo es exprimiert und repliziert wird. Da die Lokalisation eines Proteins von Signalpeptiden abhängen kann, die entweder am N-terminalen oder am C-terminalen Ende der Peptidsequenz angehängt werden, wurden in dieser Arbeit verschiedene Fusionproteine kloniert.

Zum einen wurde ein Konstrukt kloniert, bei dem der Flagtag am C-terminalen Ende des Hen1-Proteins sitzt, zum anderen wurde ein Fusionsprotein kloniert, bei dem der Flagtag am N-terminalen Ende des Hen1 sitzt. Diese Konstrukte wurden linearisiert und in den Makronukleus des *Parameciums* injiziert (2.8.5). Die injizierten Zellen wurden zu einer Massenkultur angezogen und Gesamt-Protein durch Aufkochen der Zellen in Lämmli-Puffer (2.12.1) isoliert. Danach wurden zelläquivalente Mengen an Protein (vgl. 2.12.1) auf eine Membran gedotet und mit einem Antikörper gegen den Flagtag dekoriert (2.12.4). Der zugehörige Dotplot ist in Abbildung 3.22 dargestellt.

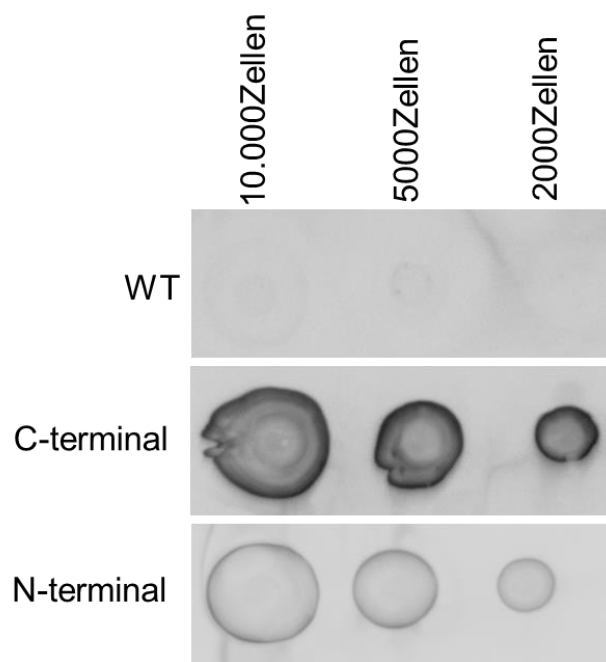


Abbildung 3.22: Dotplot der Hen1-Flagtag-Fusionsproteine. Aufgetragen sind zelläquivalente Mengen an Gesamt-Protein isoliert aus 2000, 5000 und 10 000 Zellen. Hierfür wurden Zellen verwendet, die das C-terminale Konstrukt enthalten, Zellen, die das N-terminale Konstrukt enthalten und Zellen, die kein Konstrukt enthalten (WT). Dekoriert wurde der Blot mit einem monoklonalen Antikörper gegen den Flagtag in einer 1:2500 Verdünnung über Nacht. Der sekundäre Anti-Maus-Antikörper wurde 1:3000 verdünnt für eine Stunde inkubiert. Die Entwicklungszeit betrug 20 Sekunden.

Aus dem Dotplot in Abbildung 3.22 wird ersichtlich, dass sowohl das C-terminale als auch das N-terminale Fusionsprotein in den jeweiligen Zellen exprimiert werden und detektiert werden können.

Im WT dagegen wird nichts detektiert. Es fällt auf, dass das C-terminale Fusionsprotein stärker exprimiert wird als das N-terminale. Jedoch wurden beide Konstrukte nach der Klonierung separat aufgereinigt und in unterschiedliche Zellen injiziert. Es ist somit davon auszugehen, dass keine identischen Mengen an Konstrukt injiziert wurden und somit auch keine identischen Mengen an Protein von den Zellen synthetisiert werden. Beide Fusionsproteine werden exprimiert und liefern ein Produkt, das auf Proteinebene an Hand von Westernblot-Analysen nachweisbar ist.

Um zu überprüfen, ob diese mit dem Antikörper gegen den Flagtag detektierte Konstrukte auch in ihrer Größe den Hen1-Fusionsproteinen entsprechen, wurde ein weiterer Westernblot angefertigt. Hierzu wurde erneut Gesamt-Protein aus den Massenkulturen isoliert, elektrophoretisch in einem SDS-Gel aufgetrennt und auf eine Membran geblottet (2.12.4). Anschließend wurde der Westernblot sowohl mit dem Affinitäts-aufgereinigten polyklonalen Hen1-Serum, als auch erneut mit dem monoklonalen Antikörper gegen den Flagtag dekoriert. Der zugehörige Blot ist in Abbildung 3.23 dargestellt.

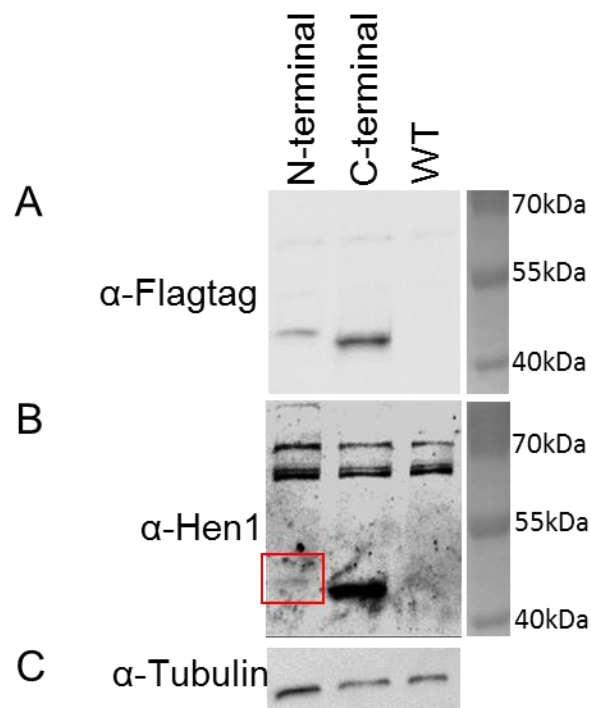


Abbildung 3.23: Westernblot der Hen1-Flagtag-Fusionsproteine. Aufgetragen sind je 80 µg an isoliertem Gesamt-Protein der jeweiligen Zelllinie. A) zeigt die Dekorierung des Blots mit dem monoklonalen Antikörper gegen den Flagtag (α-Flagtag). Dekoriert wurde in einer 1:2500 Verdünnung über Nacht. Der sekundäre Anti-Maus-Antikörper wurde 1:3000 verdünnt für eine Stunde inkubiert. Die Entwicklungszeit beträgt 3 Minuten. B) zeigt die Dekorierung mit dem Affinitäts-aufgereinigtem Antiserum gegen Hen1 (α-Hen1). Zur Dekorierung wurden 100 µl des „rohen“ Serum aufgereinigt und in einer 1:1000 Verdünnung über Nacht inkubiert. Der sekundäre Anti-Hase-Antikörper wurde 1:5000 für eine Stunde inkubiert. Die Entwicklungszeit betrug vier Minuten. Die sehr schwache Bande des Hen1-Proteins der N-terminalen Spur wurde mit einem roten Rechteck markiert. C) zeigt die Dekorierung mit einem Antikörper gegen das alpha-Tubulin (α-Tubulin). Diese Markierung dient als Ladekontrolle. Dieser Antikörper wurde 1:2500 verdünnt über Nacht mit dem Blot inkubiert. Der sekundäre Anti-Maus-Antikörper wurde 1:3000 für eine Stunde inkubiert. Die Entwicklungszeit betrug drei Minuten.

Aus dem Westernblot in Abbildung 3.23 geht hervor, dass die Dekorierungen mit dem Hen1-Serum und mit dem Antikörper gegen den Flagtag dieselbe Hen1-spezifische Bande in den Spuren der jeweils injizierten Zelllinie (C-terminal und N-terminal) aufweisen (vgl. Abb. 3.23 A und B). Diese entspricht einem errechneten Molekulargewicht von 42,33 kDa, wobei der 3xFlagtag einem

Molekulargewicht von 2,73 kDa entspricht (Terpe, 2003). In der uninjizierten Zelllinie (WT) ist dagegen keine Hen1 spezifische Bande zu detektieren. Für die Dekorierung mit dem Flagtag-Antikörper entspricht dies den Erwartungen, da hier ja kein Konstrukt injiziert wurde und somit auch kein Protein synthetisiert werden kann, das von dem Flagtag-Antikörper erkannt wird (Abb. 3.23 A). Für die Dekorierung mit dem Hen1-Serum (Abb. 3.23 B) ist dies jedoch nur dadurch zu erklären, dass die Aufreinigung des Antiserums vor der Dekorierung zwar gelungen ist, jedoch die gewonnene Menge spezifischer Antikörper nur sehr gering war. Somit konnten zwar die überexprimierten Fusionsproteine, nicht jedoch das endogene native Hen1 detektiert werden.

Die wahrscheinlich unspezifische Doppelbande in der Markierung mit dem Hen1-Serum bei einem Molekulargewicht von 60 – 70 kDa ist, wie auch schon in Abbildung 3.21 A, erneut zu sehen.

Anhand der Ladekontrolle an Abbildung 3.23 C ist zu erkennen, dass zudem nicht exakt gleiche Mengen an Protein aufgetragen wurden. Die detektierten Mengen sind zwar vergleichbar, jedoch wurde bei der WT-Spur generell weniger aufgetragen als bei den beiden anderen. Aus diesen Analysen kann somit der Schluss gezogen werden, dass das Hen1-Flagtag-Fusionsprotein sowohl im C-terminalen als auch im N-terminalen Konstrukt in den jeweiligen Zelllinien vollständig in ganzer Länge exprimiert wird und mit dem Flagtag-Antikörper detektiert werden kann.

Diese getesteten transgenen Zelllinien wurden für die Immunfluoreszenzfärbungen verwendet. Dafür wurden die Zellen für 5 Tage bei 32°C inkubiert und zu einer Massenkultur herangezogen. Anschließend wurden die Zellen mit 8 %igem Paraformaldehyd für 30 min fixiert und mit Triton X-100 permeabilisiert (2.12.8.1). Nach mehrmaligem Waschen wurden die fixierten Zellen über Nacht mit dem Flagtag-Antikörper dekoriert und das Fluoreszenzsignal des sekundären Antikörpers mit einem Fluoreszenzmikroskop dokumentiert. Exemplarisch sind die Fluoreszenzaufnahmen in Abbildung 3.24 dargestellt.

In den Hellfeld-Aufnahmen in Abbildung 3.24 ist zu erkennen, dass alle Zellen im Querschnitt aufgenommen wurden. In den DAPI-Färbungen ist bei allen Zellen eindeutig der Makronukleus sowie die beiden Mikronuklei, die in Abbildung 3.24 mit weißen Pfeilspitzen markiert sind, zu erkennen.

In der Aufnahme des N-terminalen Konstruktes kann man in der Alexa Fluor® 495-Anregung kein eindeutiges Signal erkennen. Die Zelle erscheint in der Fluoreszenz homogen rot. Im WT ist dies ebenfalls zu beobachten. Da der Flagtag-Antikörper in den uninjizierten WT-Zellen eigentlich kein spezifisches Ziel detektieren kann, gibt die homogene Färbung der Zellen in der Alexa Fluor® 495-Anregung das Hintergrundlevel an unspezifischen Bindungen an.

In den beiden dargestellten Aufnahmen der Zelllinie mit C-terminalem Konstrukt dagegen ist diese Färbung im Cytoplasma nicht zu erkennen. Das C-terminale Fusionsprotein kann aber eindeutig im Makronukleus sowie in den beiden Mikronuklei detektiert werden. Da die Aufnahme-Ebene so gewählt wurde, dass der Makronukleus im Querschnitt vorliegt, kann man aus den Färbungen des C-terminalen Konstruktes in Abbildung 3.24 erkennen, dass der Kern nicht homogen angefärbt ist, sondern, dass das Signal vielmehr an der Kernmembran lokalisiert ist und somit eine Kreisstruktur in eben diesem Querschnitt bildet (vgl. Abbildung 3.24 Makronukleus). Ebenfalls sind in der Färbung des C-terminalen Konstruktes mit der Alexa Fluor® 495-Anregung die Mikronuklei stark angefärbt. An Hand dieser Immunfluoreszenzfärbungen kann somit der Schluss gezogen werden, dass das Hen1 in den Kernen – sowohl an oder in den beiden Mikronuklei, als auch am oder im Makronukleus, lokalisiert ist.

In den Färbungen wurde allerdings das rekombinante Fusionsprotein und nicht das native Hen1 detektiert. Jedoch ist der Flagtag sehr klein, sodass anzunehmen ist, dass das Fusionsprotein in der

Faltung der Peptidsequenz durch den Flagtag kaum gestört wird und es sich deshalb wie das native Hen1 faltet und dementsprechend gleich lokalisiert ist.

Es lässt sich vermuten, dass am N-terminalen Ende des Proteins Signalpeptide angehängt sind, die die Lokalisation des Proteins in den Kernen vermitteln. Können diese Signalpeptide nicht angehängt werden, da in diesem Fall der Flagtag das N-terminale Ende blockiert, geht das Signal zur eigentlichen Lokalisation verloren. Dies wird durch die homogene Färbung mit dem N-terminalen Konstrukt in Abbildung 3.24 bestätigt.

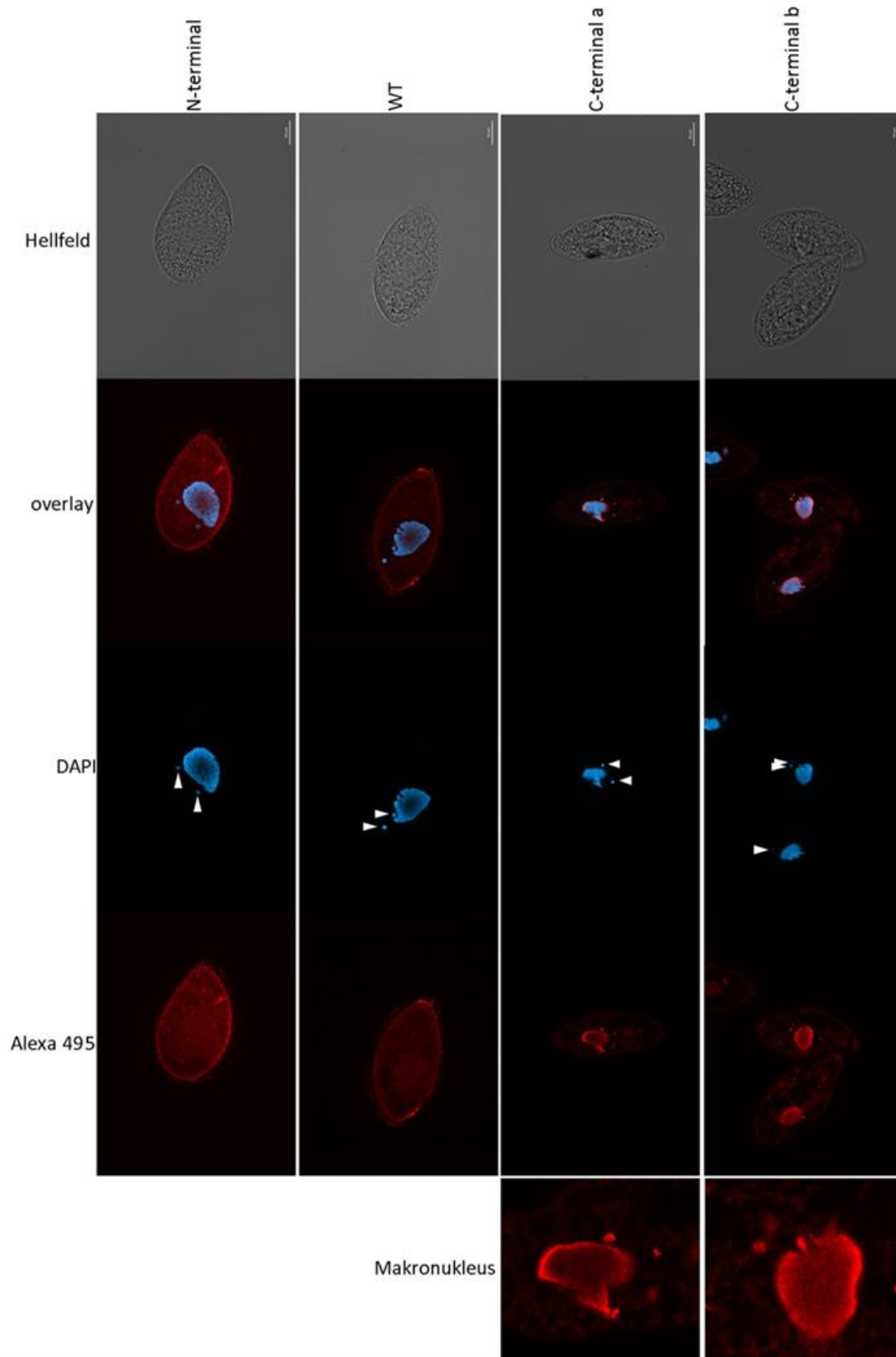


Abbildung 3.24: Immunfluoreszenzfärbung der Fusionsproteine. Dargestellt ist exemplarisch je eine Zelle pro Färbung der jeweiligen Zelllinie, die kein (WT), das C-terminale oder das N-terminale Fusionsprotein trägt. Markiert wurden die Zellen über Nacht bei 4°C mit einer 1:750 Verdünnung des Flagtag-Antikörpers und mit einer 1:5000 Verdünnung des sekundären Alexa Fluor®495 F(ab)₂ Anti-Maus-Antikörpers für zwei Stunden. Die Belichtungszeit für Alexa betrug eine Sekunde. DAPI und Hellfeld wurden mit automatischer Belichtungszeit aufgenommen. Die weißen Pfeilspitzen markieren die Mikronuklei. Die Färbungen wurden dreimal wiederholt.

An Hand der Fluoreszenzaufnahmen lässt sich also sagen, dass das Hen1-Protein in oder an den Kernen von *Paramecium* lokalisiert ist. Dies legt den Schluss nahe, dass es sich bei dem Transgen vermittelten Silencing eher um ein transkriptionelles Silencing handeln könnte, allerdings kann an Hand der durchgeführten Analysen ein post-transkriptionelles Silencing nicht ausgeschlossen werden.

Um den Transgen-induzierten RNAi-Mechanismus weiter charakterisieren zu können und eventuell Rückschlüsse auf die Synthese der entdeckten sekundären siRNAs ziehen zu können, wurden in weiteren Analysen die Involvierung weiterer Komponenten getestet.

3.5 Involvierung weiterer Komponenten in die Akkumulation der siRNAs

Im RNAi-Mechanismus, der dem Transgen-Silencing zu Grunde liegt, wird angenommen, dass Rdr3 in die Synthese der siRNAs involviert sind (Marker *et al.*, 2010). Marker und Kollegen konnten zeigen, dass die entstanden siRNAs eine Modifikation an ihrem 3' Ende tragen, was mit dieser Arbeit bestätigt werden konnte. Weiterhin konnte in dieser Arbeit dargestellt werden, dass es sich bei dieser Modifikation wahrscheinlich um eine Hen1-vermittelte Methylgruppe handelt. Methylierungen dienen der selektiven Stabilisierung von RNA-Spezies (Yu *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2005; Kurth und Mochizuki, 2009). Auch das Binden von RNA-Spezies an ein Argonauten-Protein wirkt stabilisierend und schützt selektiv vor Degradation. Wird eine doppelsträngige RNA-Spezies von einem Argonauten-Protein gebunden, wird der „guide Strang“ selektiv behalten und der „passenger Strang“ verworfen (Kawamata *et al.*, 2010; Tomari *et al.*, 2004; Schwarz *et al.*, 2003; Khvorova *et al.*, 2003). Argonauten-Proteine können RNAs nicht nur binden, sie leiten diese auch zu ihrem Zielort in der Zelle (Guang *et al.*, 2008) und vermitteln das eigentliche Stilllegen des Zielgens. Von der Arbeitsgruppe um Eric Meyer wurden die sogenannten Ptiwis, *Paramecium tetraurelia* spezifische Piwi-Proteine, genauer untersucht und charakterisiert (Bouhouche *et al.*, 2010). Piwis stellen eine Unterklasse der Argonauten-Familie dar. *Paramecium tetraurelia* besitzt insgesamt 17 dieser Unterklasse, jedoch kein Protein der Argonauten-Klasse. In der Studie von Bouhouche und Kollegen konnte gezeigt werden, dass Ptiwi 8, Ptiwi 13 und Ptiwi 14 eine Rolle im Transgen-Silencing spielen (Bouhouche *et al.*, 2010). Hierbei bleibt anzumerken dass die Ptiwis 8 und 14 auf den Transgen-induzierten RNAi-Mechanismus beschränkt sind, Ptiwi 13 dagegen noch in einem weiteren, den als dsRNA-Feeding bekannten RNAi-Mechanismus, eine Rolle spielt (Bouhouche *et al.*, 2010).

Die beiden Komponenten Rdr2 und Cid2 wurden darüber hinaus von Marker und Kollegen in einer weiteren Studie beschrieben (Marker *et al.*, 2014). Bei Rdr2 handelt es sich ebenfalls um eine RNA abhängige RNA-Polymerase, bei Cid2 handelt es sich um eine nicht weiter beschriebene Nukleotidyl-Transferase. Beide Komponenten spielen eine Rolle in dem ebenfalls exogen getriggerten dsRNA-Feeding-Mechanismus.

Um zu testen ob und wenn ja welche Rolle diese Komponenten im Transgen-induzierten RNAi-Mechanismus spielen, wurde diese im Folgenden durch phänotypische Analysen untersucht. Dafür wurden transgene Zellen in einer Massenkultur bei 32°C für 5 Tage mit dem entsprechenden Feeding-Medium kultiviert und anschließend auf ihren Phänotyp hin untersucht. Die entsprechende Graphik ist in Abbildung 3.25 dargestellt. Diese Kulturen wurden zudem zur Klonierung der siRNA-Libraries verwendet (s. Kapitel 3.5). Deshalb wurden die Kulturen des dsRNA-Feedings gegen Ptiwi 8/14 sowie gegen Rdr3 an Zellen durchgeführt, die das pTI-Konstrukt tragen; die Verfütterung

homologer dsRNA zu Rdr2, Cid2 und gegen das Ptiwi 13 dagegen an Zellen, die das pTI/- Konstrukt tragen.

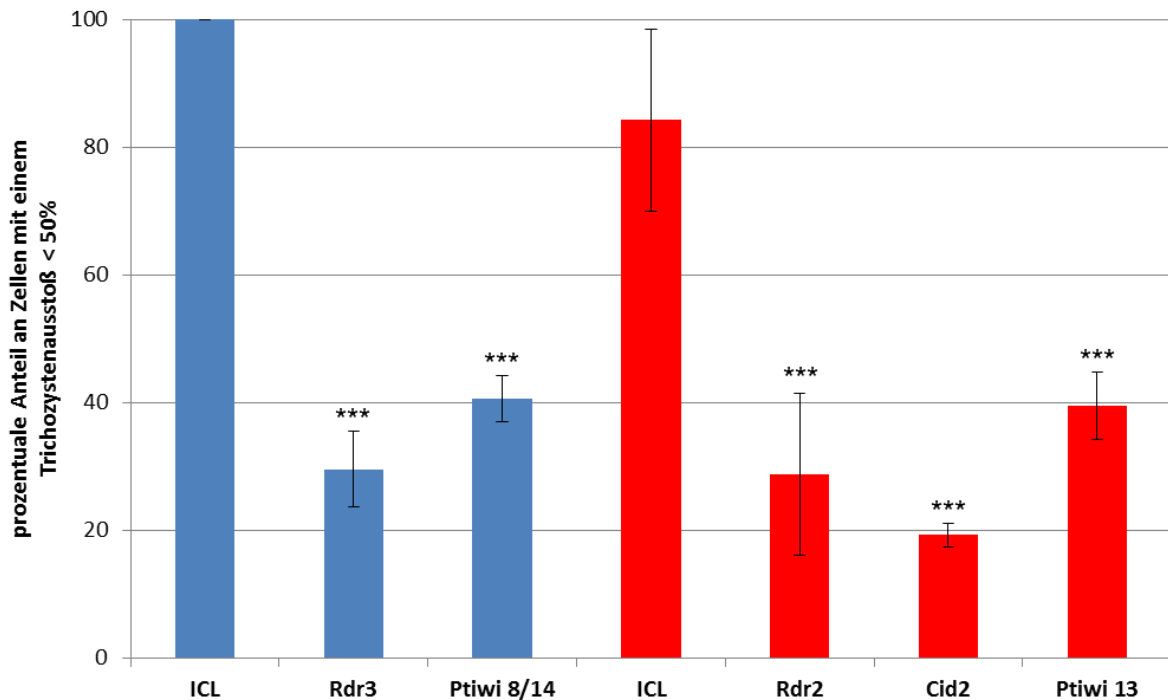


Abbildung 3.25: Prozentualer Anteil der Trichozysten ausstoßenden Zellen der transgenen Kulturen im dsRNA-Feeding. In Blau sind die ausgezählten Zellen der mit dem pTI- Konstrukt injizierten und dem entsprechenden Feeding-Medium kultivierten Zellen dargestellt. In Rot sind die ausgezählten Zellen der mit dem pTI/- Konstrukt injizierten und dem entsprechenden Feeding-Medium kultivierten Zellen dargestellt. Die beiden Ptiwis 8 und 14 wurden als kombinierte Verfütterung durchgeführt. Das Experiment wurde dreimal wiederholt ($n = 3$). Es wurden jeweils 100 Zellen ausgezählt. Das Signifikanzniveau (T-Test; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$) wurde zur jeweiligen ICL-Kontrolle des injizierten Konstruktes berechnet.

Aus Abbildung 3.25 wird ersichtlich, dass alle getesteten Komponenten in den Transgen-induzierten RNAi-Mechanismus involviert sind. Die Verfütterung von dsRNA, die homolog zum Zielgen *icl* ist, entspricht dem Phänotyp der Ausgangszellen, da *icl* für ein Gen des Cytoskeletts kodiert und dieses nicht durch das injizierte Transgen beeinflusst wird. Somit kann das ICL-Silencing als Kontrolle herangezogen werden. Die Verfütterung von dsRNA, die homolog zu *rdr3* ist, wurde als Positivkontrolle ebenfalls mit aufgetragen. Hier wurde eine Involvierung bereits in der Literatur beschrieben (Marker *et al.*, 2010) und konnte auch mit dieser Analyse bestätigt werden ($p = 0,0000302$). Ebenso die jeweiligen Analysen der Ptiwi-Proteine. Bouhouche und Kollegen konnten nachweisen, dass Ptiwi 8 und Ptiwi 14 eine 96 %ige Homologie ihrer Gensequenz aufweisen (Bouhouche *et al.*, 2010). Zudem wird Ptiwi 8 während dem vegetativen Wachstum im Vergleich zu Ptiwi 14 nur schwach exprimiert (Bouhouche *et al.*, 2010). Diese beiden Ptiwis wurden deshalb als Ptiwi 8/14 in einer Doppelverfütterung analysiert. Die Analyse aus Abbildung 3.25 zeigt auch in diesem Fall eine hohe Signifikanz der Abnahme des endogenen *nd169*-Silencings in allen analysierten ds-Verfütterungen gegen die jeweiligen Ptiwi-Proteine verglichen mit der jeweiligen ICL-Kontrolle auf 40 % (Ptiwi 8/14 $p = 5,36e^{-8}$ bzw. Ptiwi 13 $p = 0,000366$). Auch für Rdr2 und Cid2 konnte eine Involvierung in den hier untersuchten Transgen-induzierten RNAi-Mechanismus nachgewiesen werden. Hier sank der Anteil an ausgezählten Zellen, die keine Trichozysten mehr ausstoßen können von 84 % der entsprechenden ICL-Kontrolle hoch signifikant auf 30 % bei Rdr2 und auf 19 % bei Cid2 ab (Rdr2 $p = 0,000392$, Cid2 $p = 3,26e^{-5}$).

Es konnte somit für alle getesteten Komponenten eine Involvierung in den Mechanismus bestätigt werden.

3.5.1 Rolle der analysierten Komponenten im Transgen-induzierten RNAi-Mechanismus

Zunächst sollte die Rolle der von Bouhouche beschriebenen Ptiwis untersucht werden (Bouhouche *et al.*, 2010). Hierfür wurden transgene dsRNA-Feeding-Kulturen, die das pTI- Konstrukt tragen, bei 32°C für 5 Tage kultiviert. Anschließend wurde RNA isoliert (2.10.1) und elektrophoretisch aufgetrennt (2.10.5) und auf eine Membran geblottet (2.10.5). Dieser Blot wurde mit radioaktiv markierten Sonden hybridisiert (2.10.7). Der zugehörige Northernblot ist in Abbildung 3.26 dargestellt.

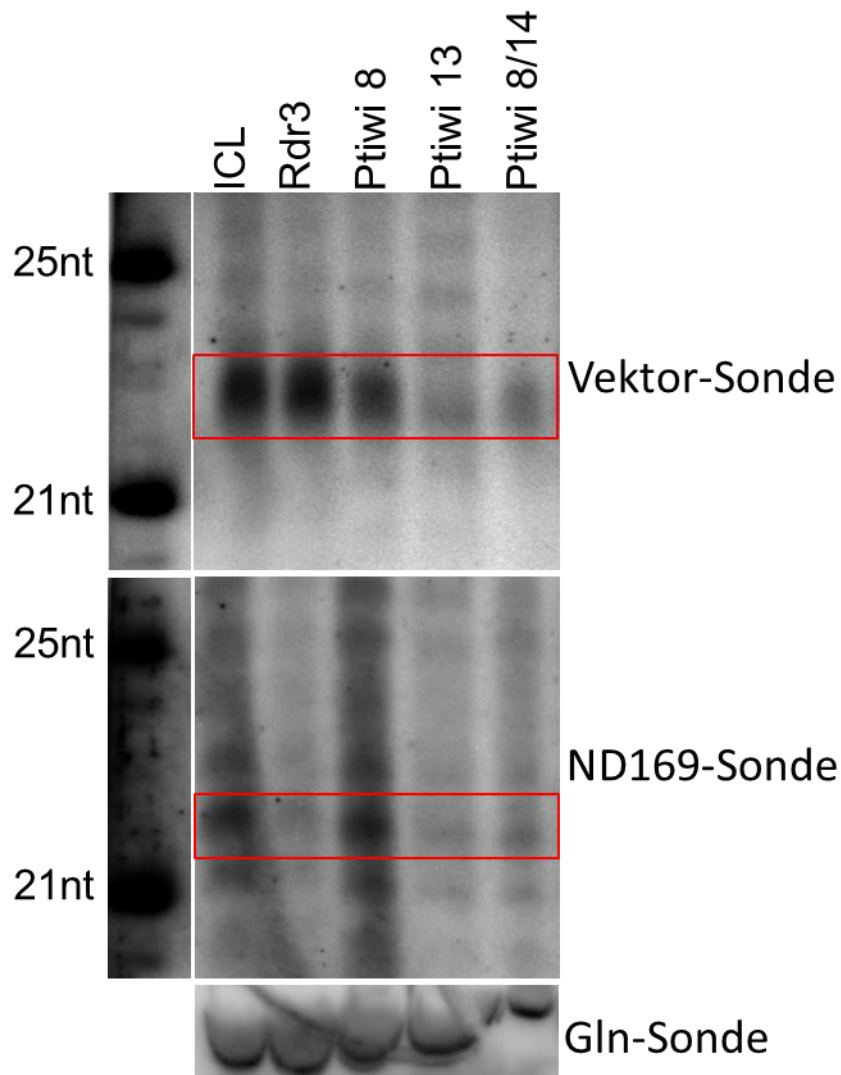


Abbildung 3.26: Northernblot der siRNA-Menge der transgenen Feeding-Kulturen. Hybridisiert wurde der Blot mit radioaktiv markierten Sonden gegen den Vektor-Bereich des Transgens (Oben) und gegen das *nd169*-Gen (Mitte). Die Gln-Sonde (Unten) wurde als Ladekontrolle verwendet. Aufgetragen sind je 15 µg Gesamt-RNA der jeweiligen Feeding-Kulturen transgener pTI- Zellen. Es wurden 16 cm lange Harnstoffgele verwendet. Die Exposition des Phosphoimager-Screens betrug vier Wochen für die ND169-Sonde und die Vektor-Sonde und drei Tage für die Gln-Sonde.

In Abbildung 3.26 ist zu sehen, dass die Menge an *nd169*-spezifischen siRNAs im Rdr3-Feeding der pTI- Zelllinie im Vergleich zur Kontrolle, dem ICL-Feeding, stark reduziert ist (vgl. ND169-Sonde, rotes Rechteck). Nachdem Rdr3 eine Rolle in der Synthese dieser siRNAs zugesprochen wird (Marker *et al.*, 2010), entspricht dies den Erwartungen. Aus Abb. 3.26 lässt sich ebenfalls erkennen, dass die Menge an *nd169*-spezifischen siRNAs im Ptiwi 8 Feeding dagegen im Vergleich zu der Kontrolle unverändert

ist. Betrachtet man nun die Menge an *nd169*-spezifischen siRNAs in der Ptiwi 8/14 Doppelverfütterung, so ist eine Abnahme der Menge an spezifischen siRNAs zu verzeichnen. Dies lässt darauf schließen, dass nicht Ptiwi 8, sondern Ptiwi 14 einen Einfluss auf die siRNA-Menge hat. Ein solcher Einfluss auf die siRNA-Menge kann auch für Ptiwi 13 beschrieben werden.

Bei Rdr3 könnte die Reduktion der Menge an *nd169*-spezifischen siRNAs darauf beruhen, dass Rdr3 in die eigentliche Synthese involviert sein könnte. Da den hier analysierten Ptiwis aus *Paramecium* auch eine Slicer-Aktivität zugesprochen wird (Bouhouche *et al.*, 2010), könnte diese Vermutung auch auf die Ptiwis zutreffen. Allerdings könnte die Reduktion der siRNA-Menge bei einer Stilllegung der Ptiwis auch auf einer fehlenden selektiven Stabilisierung der siRNAs durch die Bindung der siRNA an das Ptiwi beruhen. Sind diese Ptiwis durch das dsRNA-Feeding stillgelegt, so könnten die siRNAs eventuell leichter degradiert werden.

Auch in der Hybridisierung mit der Vektor-Sonde (Abb. 3.26 Vektor-Sonde), die die primären vom Transgen stammenden siRNAs detektiert (vgl. Kapitel 3.3), ist eine Abnahme der siRNA-Menge in der Ptiwi 13 und in der Ptiwi 8/14 Doppelverfütterung zu sehen. Auch hier ist zu erkennen, dass die Reduktion der siRNA-Menge abhängig von Ptiwi 14 und nicht von Ptiwi 8 ist, da die detektierbare siRNA-Menge in der Ptiwi 8 Verfütterung im Vergleich zur ICL-Kontrolle unverändert ist. Die Spur der Rdr3 Verfütterung zeigt in der Hybridisierung mit der Vektor-Sonde (Abb. 3.26 Vektor-Sonde) keine Reduktion der detektierbaren siRNA-Menge. Dies könnte darauf hindeuten, dass Rdr3 zwar in die Akkumulation von Transgen-induzierten siRNAs involviert ist, allerdings zeigen diese Ergebnisse, dass es sich hierbei um die Akkumulation der sekundären siRNAs handeln müsste. Die primären Transgen-induzierten siRNAs vom Vektorbereich des Transgens, die mit dieser Sonde detektiert werden, zeigen keine Abhängigkeit von Rdr3. Auch hier bleibt zu erwähnen, dass das Grundgerüst der pTI Konstrukte dem dsRNA-Feeding-Vektor L4400 entspricht, wodurch die verwendete Vektorsonde in ihrer Sequenz auch zu dem Feeding-Vektor homolog ist und auch die dsRNA-Feeding assoziierten primären siRNAs detektieren könnte (vgl. Abb. 8.3). Jedoch wurde von Marker und Kollegen gezeigt, dass die dsRNA-Feeding-assoziierten siRNAs nicht modifiziert sind (Marker *et al.*, 2010). Die in Abbildung 3.27 mit der Vektor-Sonde detektierten siRNAs weisen allerdings eine Modifikation auf. Somit ist davon auszugehen, dass hier überwiegend die primären Transgen-induzierten siRNAs detektiert werden und somit interpretiert werden können.

Zusammenfassend lässt sich hieraus schließen, dass die beiden Ptiwis 13 und 14 in die Akkumulation sowohl der primären, als auch der sekundären Transgen-induzierten siRNAs involviert sind. Wobei hier anzumerken ist, dass die Reduktion der siRNAs, die auf den Genkörper des *nd169* mappen und mit der ND169-Sonde detektiert werden, auch darauf beruhen kann, dass nur die primären siRNAs reduziert sind, die verblieben sekundären siRNAs jedoch noch nachzuweisen sind (vgl. 4.2.2.1)

Für *Tetrahymena thermophila* wurde beschrieben, dass das homologe Protein (Hen1p) zu Hen1 aus *Paramecium tetraurelia* kleine RNA-Spezies nur methylieren kann, wenn diese an ein Argonauten-Protein gebunden sind (Kurth und Mochizuki, 2009). Auch *Tetrahymena* besitzt nur Argonauten der Piwi-Klasse, insgesamt 12 Stück, die numerisch Twi1-12p genannt werden (Kurth und Mochizuki, 2009). In der Studie von Kurth und Mochizuki wurde die Interaktion von Hen1p mit dem Piwi Twi1p beschrieben. Wurde Twi1p stillgelegt, konnte auch keine Methylierung der siRNAs mehr nachgewiesen werden. Daraus wurde der Schluss gezogen, dass Hen1p und Twi1p direkt interagieren und das Binden der siRNAs durch das Piwi-Protein die Voraussetzung darstellt, dass die siRNAs durch Hen1p methyliert werden können (Kurth und Mochizuki, 2009). Auch für die piRNAs aus *Drosophila* wurde beschrieben, dass diese erst methyliert werden, wenn sie an ein Piwi gebunden sind. Somit

interagieren auch in *Drosophila* das dortige Hen1-Homolog „Pimet“ und das Piwi-Protein direkt miteinander (Saito *et al.*, 2007). Ob dies für die Transgen-induzierten siRNAs und einem der untersuchten Ptiwis in *Paramecium* auch der Fall ist, sollte daher genauer untersucht werden. Hierfür wurde die isolierte RNA aus den dsRNA-Feeding-Kulturen der Ptiwis mit Periodat behandelt (2.10.4), elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Membran geblottet (2.10.5). Anschließend wurde der Northernblot mit radioaktiv markierten Sonden hybridisiert (2.10.7). Der zugehörige Northernblot ist in Abbildung 3.27 dargestellt.

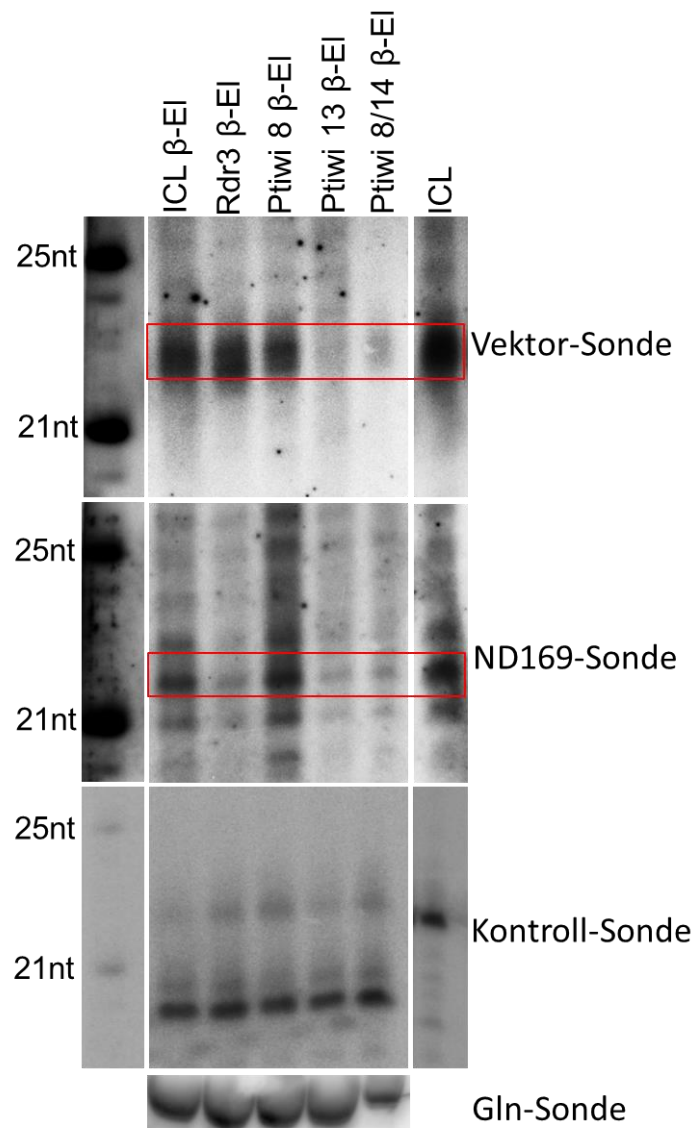


Abbildung 3.27: Northernblot der β -eliminierten Gesamt-RNA transgener Feeding-Kulturen. Aufgetragen sind jeweils 20 μg der isolierten β -eliminierten RNA (β -EI) der jeweiligen dsRNA-Feeding-Kulturen. Zum Größenvergleich wurden 20 μg der isolierten unbehandelten Gesamt-RNA des ICL-Feedings zusätzlich mit aufgetragen. Bei den Periodat behandelten RNAs wurde ein Kontroll-Oligo untergemischt, der den Verlauf der β -Eliminierungsreaktion anzeigt. Die Sonden wurden radioaktiv markiert. In der Mitte ist die Hybridisierung mit einer *nd169*-spezifischen PCR-Sonde dargestellt. Die Bande der *nd169*-spezifischen siRNAs ist mit einem roten Rechteck markiert. Oben ist die Hybridisierung mit der Vektor-Sonde dargestellt. Die spezifischen siRNAs sind mit einem roten Rechteck markiert. Unten ist die Hybridisierung mit einer Kontroll-Sonde, die den Kontroll-Oligo markiert, dargestellt. Die Hybridisierung des Blots mit einer Glutamin-Sonde (Gln-Sonde) dient als Ladekontrolle. Die Exposition des Phosphoimager-Screens betrug vier Wochen für die ND169-Sonde und die Vektor-Sonde, einen Tag für die Kontroll-Sonde und drei Tage für die Gln-Sonde.

Auf dem in Abbildung 3.27 Mitte dargestellten Northernblot kann man bei keiner Spur der Ptiwi-Stilllegungen einen Größenunterschied der *nd169*-spezifischen siRNAs durch die β -Eliminierung im Vergleich zur unbehandelten ICL-Kontrolle erkennen (Abb. 3.27 Mitte; ND169-Sonde). Dieses Bild zeigt sich auch für die Hybridisierung des Blots mit der Vektor-Sonde (Abb. 3.27 Oben; Vektor-Sonde). Auch die hier detektierten siRNAs sind in den Ptiwi Verfütterungen noch methyliert und weisen somit keinen Laufunterschied auf. Wie in der Markierung mit der Kontroll-Sonde (Abb. 3.27 Unten; Kontroll-Sonde) zu sehen ist, ist die Reaktion durch die Behandlung mit Periodat erfolgreich jedoch nicht vollständig verlaufen. Es ist zu sehen, dass kleine Mengen des Oligos nicht vollständig eliminiert wurden. Dies wird durch die leichten Banden der Abbildung 3.27 Unten (Kontroll-Sonde), die eine Größe von 22 nt aufweisen, deutlich. Diese laufen auf derselben Höhe wie die Bande der unbehandelten ICL-Spur. Dennoch können die Banden in den Hybridisierungen mit den anderen Sonden (Vektor- und ND169-Sonde) eindeutig interpretiert werden, da die Reaktion der β -Eliminierung ausreichend war um Unterschiede auch im Laufverhalten der mit diesen Sonden (Vektor- und ND169-Sonde) detektierten siRNAs zu erkennen. Aus Abbildung 3.27 und der Hybridisierung mit der Gln-Sonde wird zudem ersichtlich, dass vergleichbare Mengen an Gesamt-RNA aufgetragen wurden (Abb. 3.27; Gln-Sonde).

Somit kann eine direkte Interaktion von Hen1 mit einem der Ptiwis, wie es für *Tetrahymena* beschrieben wurde (Kurth und Mochizuki, 2009), zwar nicht ausgeschlossen werden, jedoch scheinen das Binden der siRNAs an ein Ptiwi-Protein und die Methylierung der siRNAs durch Hen1 zwei voneinander unabhängige Mechanismen zu sein. Vielmehr hat es den Anschein, als würden die siRNAs erst methyliert und anschließend erst in das Ptiwi geladen.

Da die hier dargestellten Northernblots jedoch lediglich eine Aussage über die detektierbaren Mengen der einzelnen siRNA-Klassen zulassen, jedoch keine Rückschlüsse auf die Orientierung oder den genauen Bereiches des *nd169*-Gens von dem sie synthetisiert werden zulassen, wurden für die Analyse dieser Kriterien die Tiefensequenzierungen der siRNAs herangezogen.

Für die Komponenten Rdr2, Cid2 und Ptiwi 13 wurde eine generelle Involvierung in den Transgen-induzierten RNAi-Mechanismus und in den dsRNA-Feeding assoziierten Mechanismus beschrieben (Marker *et al.*, 2014; Bouhouche *et al.*, 2011). Für die Komponenten Rdr2 und Cid2 konnte zudem von Caradec und Kollegen gezeigt werden, dass sie in die Akkumulation der sekundären siRNAs des dsRNA-Feeding-Mechanismus involviert sind (Carradec *et al.*, 2014).

Um eine Aussage über die Involvierung dieser Komponenten in die Akkumulation oder Synthese der Transgen-induzierten sekundären siRNAs treffen zu können, wurden diese Komponenten durch dsRNA-Feeding in transgenen Zellen stillgelegt (vgl. Kapitel 3.5; vgl. Abb. 3.25) und die aus diesen Kulturen isolierte RNA (2.10.1) zu Libraries kloniert und sequenziert (2.13.1). Um mehr Bereiche zur Analyse der sekundären siRNAs zur Verfügung zu haben, wurde hierbei der transgene Hintergrund des pTI^{-/-} Konstruktes gewählt. Die graphische Darstellung der mit den Sequenzierungen durchgeführten Analysen zur Charakterisierung der siRNAs ist in Abbildung 3.28 dargestellt.

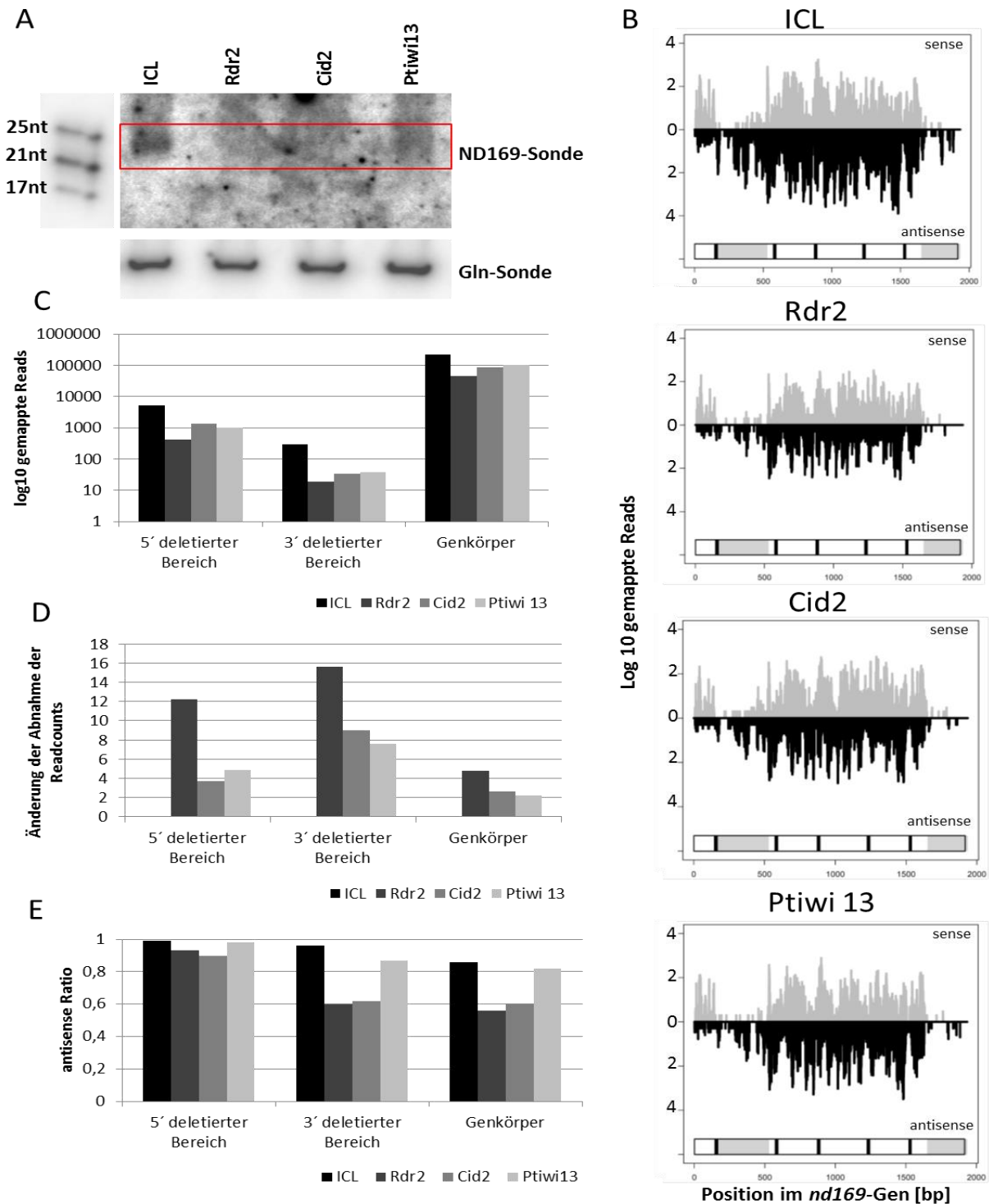


Abbildung 3.28: Verteilung der sequenzierten Reads über die endogene *nd169*-Sequenz der Komponenten Rdr2, Cid2 und Ptiwi 13. A) Northernblot der isolierten RNA aus den jeweiligen Feeding-Kulturen gegen ICL als Kontrolle und die jeweiligen Komponenten Rdr2, Cid2 und Ptiwi 13. Die Exposition des Phosphoimager-Screens betrug 3 Wochen für ND169-Sonde und 1 Tag für die Gln-Sonde. B) Coverageblots. Die Positionen in der *nd169*-Gensequenz sind in Basenpaaren auf der X-Achse aufgetragen und als Rechteck graphisch dargestellt. Die schwarzen Linien im Rechteck entsprechen den Introns, die grau hinterlegten Bereiche des Rechtecks entsprechen den Regionen, die im pTI-/-Konstrukt deletiert wurden. Die Y-Achse stellt die Anzahl der gemappten Reads in einer Log10-Skala unterteilt in sense (grau) und antisense (schwarz) Orientierung dar. C) entspricht der graphischen Darstellung der normalisierten mappenden Readzahlen in den verschiedenen Regionen, die im pTI-/-Konstrukt deletiert wurden, sowie im Genkörper des *nd169*-Gens. D) zeigt die Änderung der Abnahme der gemappten Reads in den verschiedenen Regionen in der pTI-/-*rdr2*-, pTI-/-*cid2*- und pTI-/-*ptiwi13*-Library im Vergleich zur pTI-/-*icl*-Library. E) zeigt die antisense Ratio der gemappten Reads in den Bereichen, die im pTI-/-Konstrukt deletiert wurden, sowie im Genkörper des *nd169*-Gens.

An Hand von Abbildung 3.28 A zeigt sich, dass die detektierbare Menge an *nd169*-spezifischen siRNAs in den Stilllegungen von Rdr2, Cid2 und Ptiwi 13 im Vergleich zur ICL-Kontrolle stark reduziert sind. Bei der dsRNA-Verfütterung gegen Rdr2 und Cid2 ist keine Bande der siRNAs mehr bei der Hybridisierung mit der ND169-Sonde zu detektieren, bei der Stilllegungen von Ptiwi 13 ist noch eine leichte Bande nachweisbar. Dies deutet darauf hin, dass alle drei Komponenten in die Akkumulation der siRNAs involviert sind.

In den Coverageblots (Abbildung 3.28 B) zeigt sich, dass die Reads, die auf die Bereiche mappen, die im pTI-/- Konstrukt deletiert sind, von den Komponenten Rdr2, Cid2 und Ptiwi 13 abhängen. In Abbildung 3.28 B und C ist zu erkennen, dass die generelle Anzahl der Reads in der pTI-/-*rdr2*-Library (Rdr2), der pTI-/-*cid2*-Library (Cid2) sowie der pTI-/-*ptiwi13*-Library (Ptiwi 13) im Vergleich zur pTI-/-*icl*-Library (ICL) reduziert ist, die Bereiche der sekundären siRNAs, also der 5' deletierte und der 3' deletierte Bereich, jedoch am stärksten betroffen sind. Dies wird auch in der Graphik der Änderungsrate in Abbildung 3.28 D deutlich. Hier sieht man, dass die Menge an Reads in der pTI-/-*rdr2*-Library, die auf den 5' deletierten Bereich mappen, um das Zwölffache im Vergleich zur ICL-Kontrolle abnimmt. Die Änderungsrate in der pTI-/-*cid2*-Library sowie der pTI-/-*ptiwi13*-Library beträgt in diesem Bereiche nur ca. das Vierfache. Ebenso im 3' deletierten Bereich. Hier liegt die Menge an Reads in der pTI-/-*rdr2*-Library, die auf den 3' deletierten Bereich mappen, um ca. 15fach reduziert vor im Vergleich zur ICL-Kontrolle. In der pTI-/-*cid2*-Library sowie der pTI-/-*ptiwi13*-Library ist die Anzahl der mappenden Reads um das Neun- bzw. Siebenfache reduziert. Somit bewirkt die Stilllegung von Rdr2 die größte Abnahme der Anzahl an mappenden Reads in den Bereichen, die spezifisch für sekundäre siRNAs sind. Daraus lässt sich schließen, dass die Komponenten Rdr2, Cid2 und Ptiwi 13 in die Akkumulation der sekundären siRNAs involviert sind. Es bleibt anzumerken, dass sich auch die Anzahl an Reads im Genkörper der einzelnen Libraries im Vergleich zur ICL-Kontrolle ändern. Hier ist für die pTI-/-*rdr2*-Library eine Abnahme der Reads um das Fünffache, bei der pTI-/-*cid2*-Library eine Abnahme um das 2,5fache und bei der pTI-/-*ptiwi13*-Library eine Abnahme um das Zweifache zu detektieren. Allerdings stellt dieser Bereich eine Mischung aus primären und sekundären siRNAs dar. Es bleibt also offen, ob diese Abnahme darauf beruht, dass nur die sekundären siRNAs, die in diesem Bereich detektiert werden, reduziert sind oder ob auch die primären siRNAs aus diesem Bereich reduziert sind.

In Abbildung 3.28 E ist die Ratio der antisense orientierten Reads dargestellt. Hier zeigt sich ein geteiltes Bild für die analysierten Bereiche der sekundären siRNAs. Während die antisense Ratio im 5' deletierten Bereich in allen analysierten Libraries bei ca. 1 liegt, verschiebt sich dieses Ergebnis im 3' deletierten Bereich. Hier ist vor allem in der pTI-/-*rdr2*-Library und der pTI-/-*cid2*-Library im Vergleich zur pTI-/-*icl*-Library eine Abnahme der antisense orientierten Reads auf ca. 60% zu verzeichnen. Ein gleiches Bild lässt sich auch für den Genkörper beschreiben. Auch hier ändert sich die Ratio in der pTI-/-*rdr2*-Library und der pTI-/-*cid2*-Library im Vergleich zur ICL-Kontrolle auf denselben Wert von ca. 0,6. Für die pTI-/-*ptiwi13*-Library kann dies jedoch nicht bestätigt werden. Hier ist in keinem der analysierten Bereiche eine deutliche Änderung der antisense orientierten Reads im Vergleich zur pTI-/-*icl*-Library zu detektieren.

Zusammenfassend lässt sich hieraus schließen, dass die Komponenten Rdr2, Cid2 und Ptiwi 13 eine Rolle in der Akkumulation vor allem der sekundären Transgen-induzierten siRNAs haben, da sich die Menge an mappenden Reads in diesen Bereichen bei der Stilllegung dieser Komponenten am stärksten ändert. Wobei diese Änderung bei Rdr2 im Vergleich zu Cid2 und Ptiwi 13 am stärksten ist. Ob diese drei Komponenten auch in die Akkumulation der primären siRNAs involviert sind, bleibt offen.

Da mit den Northernblot-Analysen aus Abbildung 3.25 und 3.26 bereits gezeigt werden konnte, dass auch Ptiwi 14 einen Einfluss auf die Akkumulation der siRNAs hat, wurden nun auch hierzu die Tiefensequenzierungen zur weiteren Charakterisierung der siRNA-Klassen herangezogen. Es muss jedoch darauf hingewiesen werden, dass die dazu klonierte Library nur als Doppelverfütterung gegen Ptiwi 8 und 14 vorliegt und deshalb Ptiwi 14 alleine nur indirekt analysiert werden konnte. Das Ergebnis der durchgeführten Analysen zur Charakterisierung der siRNAs ist in Abbildung 3.29 dargestellt.

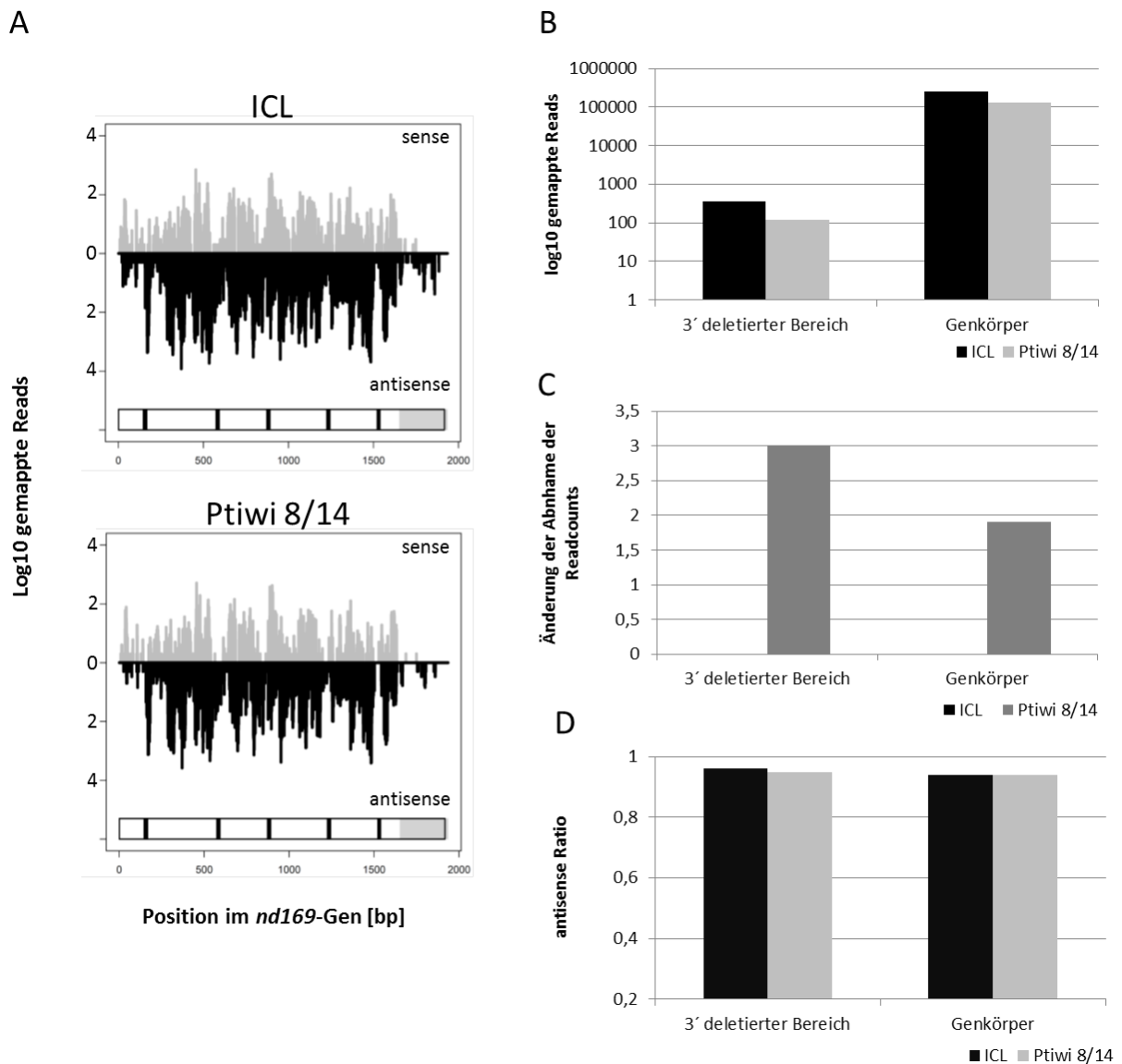


Abbildung 3.29: Verteilung der sequenzierten Reads über die endogene *nd169*-Sequenz der Komponenten Ptiwi 8/14. **A)** Coverageplots. Die Positionen in der *nd169*-Gensequenz sind in Basenpaaren auf der X-Achse aufgetragen und als Rechteck graphisch dargestellt. Die schwarzen Linien im Rechteck entsprechen den Introns, die grau hinterlegten Bereiche des Rechtecks entsprechen den Regionen, die im pTI- Konstrukt deletiert wurden. Die Y-Achse stellt die Anzahl der gemapten Reads in einer Log10-Skala unterteilt in sense (grau) und antisense (schwarz) Orientierung dar. **B)** entspricht der graphischen Darstellung der normalisierten mappenden Readzahlen in den verschiedenen Regionen, die im pTI- Konstrukt deletiert wurden, sowie im Genkörper des *nd169*-Gens. **C)** zeigt die Änderung der Abnahme der gemapten Reads in den verschiedenen Regionen der pTI-*ptiwi8/14*-Library im Vergleich zur pTI-*icl*-Library **D)** zeigt die antisense Ratio der gemapten Reads in den Bereichen, die im pTI- Konstrukt deletiert wurden, sowie im Genkörper des *nd169*-Gens. **E)** zeigt die antisense Ratio der gemapten Reads in den Bereichen, die im pTI- Konstrukt deletiert wurden, sowie im Genkörper des *nd169*-Gens.

Sieht man sich die graphischen Darstellungen in Abbildung 3.29 A und 3.29 B an, so erkennt man, dass die Anzahl der Reads bei der pTI-*ptiwi8/14*-Library im Vergleich zur pTI-*icl*-Library, die auf den Genkörper sowie auch auf den 3' deletierten Bereich mappen, reduziert ist. Deutlich ist dies in Abbildung 3.29 C an Hand der Änderungsrate zu erkennen. Hier ist zu sehen, dass die Menge an mappenden Reads im 3' deletierten in der pTI-*ptiwi8/14*-Library im Vergleich zur pTI-*icl*-Library Bereich dreifach reduziert ist. Im Genkörper beträgt die Abnahme nur ca. das Zweifache. Auch hier bleibt offen, ob diese Abnahme im Genkörper darauf beruht, dass nur die sekundären siRNAs, die in diesem Bereich detektiert werden, reduziert sind oder ob auch die primären siRNAs aus diesem Bereich reduziert sind.

Aus Abbildung 3.29 D wird deutlich, dass sich die Ratio der antisense orientierten siRNAs nicht durch das Stilllegen der beiden Ptiwis ändert.

Es kann also festgehalten werden, dass die beiden Ptiwis 8 und 14 einen generellen Einfluss auf die Akkumulation der sekundären siRNAs, die im 3' deletierten Bereich zu detektieren sind, haben. Ob sie auch einen Einfluss auf die primären siRNAs haben bleibt jedoch offen. Vergleicht man dieses Ergebnis mit den Northernblot-Analysen aus Abbildung 3.26, so lässt sich vermuten, dass dieser Effekt jedoch auf Ptiwi 14 zurückzuführen ist.

Da von der isolierten RNA dieser Ptiwi 8/14 Doppelverfütterung ebenfalls eine Library kloniert wurde, die spezifisch für methylierte siRNAs ist, wurde diese pTI-*ptiwi8/14Me*-Library nun herangezogen um zum einen das Ergebnis der Northernblot-Analyse aus Abbildung 3.27 zu überprüfen, dass das Binden an das Ptiwi 8 oder 14 keinen Einfluss auf die Methylierung durch Hen1 hat, und zum anderen einen Einblick in den zeitlichen Verlauf der Prozesse zu erlangen. Die Ergebnisse der Analysen sind in Abbildung 3.30 dargestellt.

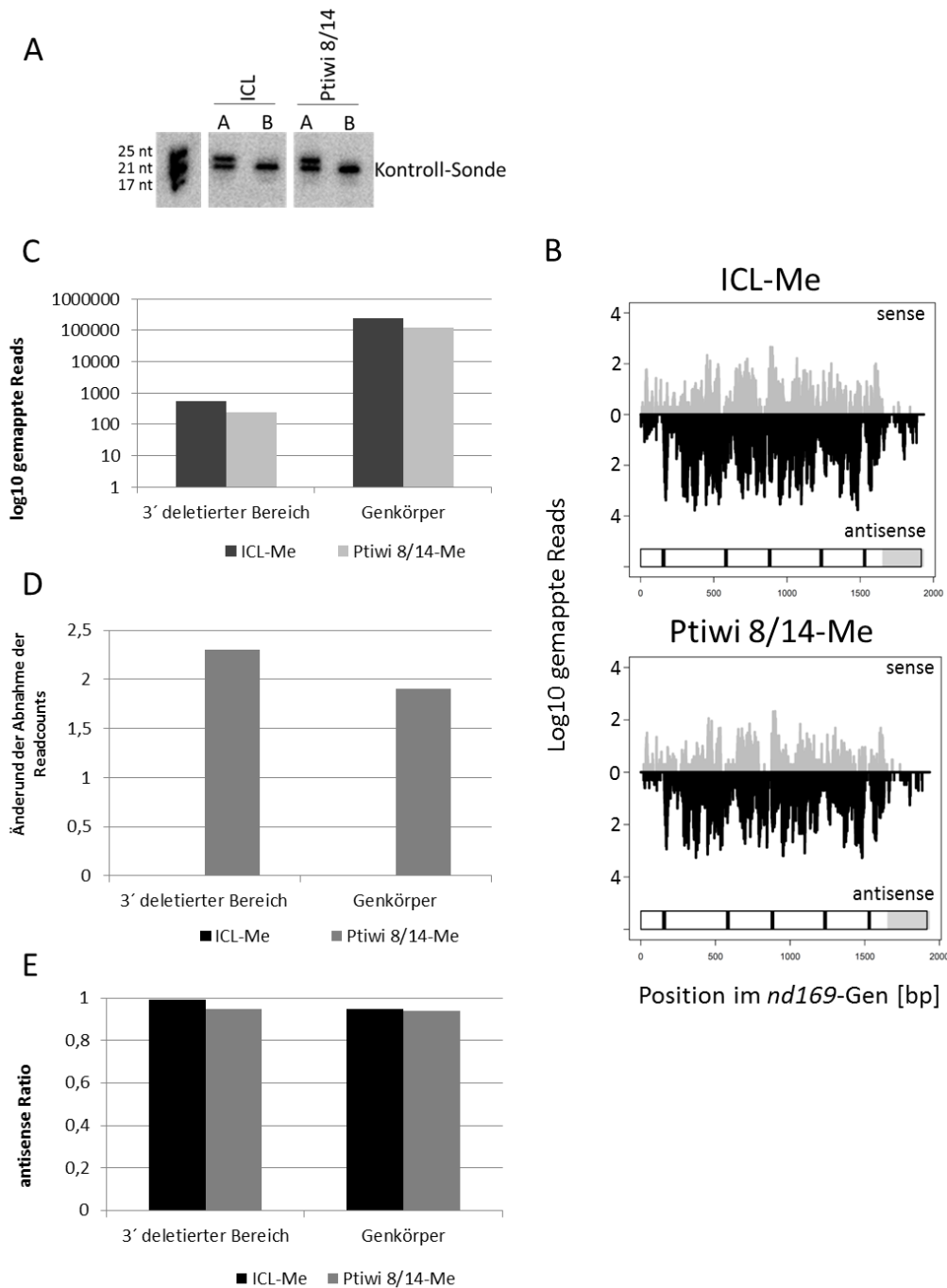


Abbildung 3.30: Vergleich zwischen methylierten und unmethylierten transgenen siRNAs im Ptiwi 8/14 Silencing. A) zeigt den Northernblot als Kontrolle der siRNA-Libraries, die spezifisch methylierte siRNAs enthalten, wobei A der Bande der β -Eliminierungs-Reaktion und B der Bande der β -Oxidations-Reaktion entspricht. Aufgetragen sind je 5 μ g der behandelten isolierten RNA transgener Zelllinien im Hintergrund des pTI- Konstruktes und Feedings gegen ICL und Ptiwi 8/14. Dies entspricht ca. 0,25 ng des Kontroll-Oligos pro Spur. Hybridisiert wurde der Blot mit der Kontroll-Sonde gegen den Oligo. Die Exposition des Phosphoimager-Screens betrug einen Tag. B) Coverageblots. Die Positionen in der *nd169*-Gensequenz sind in Basenpaaren auf der X-Achse aufgetragen und als Rechteck graphisch dargestellt. Die schwarzen Linien im Rechteck entsprechen den Introns, die grau hinterlegten Bereiche des Rechtecks entsprechen den Regionen, die im pTI- Konstrukt deletiert wurden. Die Y-Achse stellt die Anzahl der gemapten Reads in einer Log₁₀-Skala unterteilt in sense (grau) und antisense (schwarz) Orientierung dar. C) entspricht der graphischen Darstellung der normalisierten mappenden Readzahlen in den verschiedenen Regionen, die im pTI- Konstrukt deletiert wurden, sowie im Genkörper des *nd169*-Gens. D) zeigt die Änderung der Abnahme der gemapten Reads in den verschiedenen Regionen der der pTI-*ptiwi8/14*Me-Library im Vergleich zur pTI-*icl*Me-Library. E) zeigt die antisense Ratio der gemapten Reads in den Bereichen, die im pTI- Konstrukt deletiert wurden, sowie im Genkörper des *nd169*-Gens.

Aus Abbildung 3.30 A geht hervor, dass die Reaktion der β -Eliminierung sowohl in der pTI-*ic/Me*-Library als auch in der pTI-*ptiwi 8/14Me*-Library erfolgreich war. Dies bedeutet, dass diese beiden Libraries nur siRNAs enthalten, die methyliert sind und somit zur Analyse herangezogen werden können. Weiter ist in Abbildung 3.30 B und C zu erkennen, dass die mappenden Reads in der pTI-*ptiwi8/14Me*-Library im Vergleich zur pTI-*ic/Me*-Library in beiden Bereichen reduziert ist. Aus der Graphik in Abbildung 3.30 D ist zu entnehmen, dass die Menge der Reads im 3' deletierten Bereich um das 2,2fache abnimmt, im Genkörper ca. 1,9fach. Auch die antisense Ratio ändert sich nicht (vgl. Abb. 3.30 E).

Dies deutet darauf hin, dass die hier detektierten siRNAs noch methyliert sind und würde somit das Ergebnis aus der Northernblot-Analyse aus Abbildung 3.27 bestätigen. Diese beiden Ptiwis würden also nicht von Hen1 benötigt werden, um die Methylgruppe zu transferieren, wie es für *Tetrahymena* beschrieben wurde (Kurth und Mochizuki, 2009). Somit könnte auch der Schluss gezogen werden, dass die Methylierung vor dem Laden der siRNAs in die Ptiwis stattfindet.

Daraus lässt sich zusammenfassen, dass alle gestesten Komponenten eine Rolle bei der Akkumulation der siRNAs spielen. Vor allem Rdr2, aber auch Cid2, Ptiwi 13 und die Ptiwis 8/14 haben einen Einfluss auf die sekundären siRNAs, wobei ein Einfluss auf die primären siRNAs dieser Komponenten offen bleibt. Der hier detektierte Effekt der Doppelverfütterung der Ptiwis 8/14 auf die Akkumulation der siRNAs ist allerdings eher auf Ptiwi 14 zurückzuführen. Zudem gibt es Hinweise darauf, dass das Binden der siRNAs an ein Ptiwi nach dem Methylieren der siRNA stattfindet.

4. Diskussion

4.1 Allgemeine Charakteristika des Transgen-induzierten RNAi-Mechanismus

Galvani und Sperling haben in ihren Studien verschieden aufgebaute Transgene in den Kern von *Paramecium* injiziert und auf ihren induzierten Phänotyp hin untersucht. Sie konnten zeigen, dass ein effizientes Stilllegen des Zielgens nur erfolgt, wenn das dazu homologe Transgen eine Version des Gens enthält, die am 3' Ende verkürzt ist und somit die 3' UTR und das natürliche Terminationssignal fehlen (Galvani und Sperling, 2001). Dies wurde durch die Gruppe um Olivier Garnier bestätigt. Auch sie injizierten verschiedene Konstrukte in Paramecien und konnten zeigen, dass ein effizientes Stilllegen des Zielgens nur erfolgt, wenn die 3' UTR fehlt (Garnier *et al.*, 2004). In der „untranslated Region“ befinden sich Signalsequenzen, die z.B. die natürliche Lokalisation des kodierten Proteins definieren. Ein injiziertes Konstrukt, das diese Information und ein Terminationssignal enthält, ergibt für die Zelle ein normales Transkript und führt nicht zum gewünschten Silencing-Phänotyp des Zielgens (Galvani und Sperling, 2001). Die injizierte verkürzte Version dagegen ergibt für die Zelle ein nicht translatierbares nonsense-Transkript, da zum einen das Terminationssignal und zum anderen das poly-Adenylierungssignal fehlt. Es wird vermutet, dass die Zelle versucht, dieses Transkript über einen RNAi-Mechanismus schnellstmöglich abzubauen, wobei siRNAs eine wichtige Rolle spielen. Sind diese kleinen RNAs homolog zu einem endogenen Zielgen, wird dieses stillgelegt (Galvani und Sperling, 2001). Galvani und Sperling konnten zudem nachweisen, dass es sowohl sense als auch antisense Transkripte des injizierten Transgens gibt. Sie stellten mehrere Hypothesen auf, wie die dsRNA, die den Auslöser zur Synthese der siRNAs darstellt, von der Zelle generiert wird. Zum einen könnten kryptische Initiationsstellen, also eine Art Promotor auf beiden Strängen bewirken, dass eben beide Stränge transkribiert werden und so eine dsRNA ausbilden können. Zum anderen könnten sich invertierte sich wiederholende Sequenzen, sogenannte *inverted Repeats* (IR) aneinander anlagern und somit Hairpin-Konstrukte ausbilden, die die Synthese von kleinen RNAs zur Folge haben (Galvani und Sperling, 2001). Es wurde aber auch die Möglichkeit beschrieben, dass das injizierte Konstrukt ein abberantes Konstrukt liefert, das von einer RNA abhängigen RNA-Polymerase als Template benutzt wird um einen Zweitstrang zu synthetisieren und sich somit eine dsRNA bildet (Galvani und Sperling, 2001). Die in dieser Arbeit verwendeten pTI- und pTI-/- Konstrukte führen zu einem erfolgreichen Stilllegen des Zielgens *nd169*, da sie eine 3' verkürzte Version dieses Gens tragen und somit kein natürliches Terminationssignal oder die 3' UTR aufweisen (vgl. Abb. 3.1). Die entstehenden Transkripte sind somit nicht translatierbar und werden RNAi-abhängig stillgelegt. Dabei ist hier anzunehmen, dass bei der initialen Synthese der dsRNA eine RdRP eine Rolle spielt, da im Laufe dieser Arbeit die Involvierung der Homologe Rdr2 und Rdr3 in die Akkumulation dieser siRNAs gezeigt werden konnte (vgl. Abb. 3.25). Es ist also anzunehmen, dass es sich bei dem Auslöser für die Synthese der dsRNA um ein aberrantes Transkript des Transgens handelt.

4.1.1: Schwellenwert zur Replikation des injizierten Transgens

Gilley und Kollegen führten ebenfalls Studien mit injizierten Konstrukten an *Paramecium* durch. Sie testeten, welchen generellen Aufbau ein injiziertes Konstrukt aufweisen muss, um von Zelle zu Zelle weitergegeben und repliziert zu werden (Gilley *et al.*, 1988). Sie testeten lineare, zirkuläre und supercoiled Konstrukte und konnten für alle Konstrukte Transkripte in Tochterzellen nachweisen. Allerdings entsprachen diese bei den Ringstrukturen nicht dem Volllängen-Transkript sondern

kleineren Fragmenten. Gilley und Kollegen konnten zeigen, dass injizierte ringförmige Konstrukte von der Zelle linearisiert werden (Gilley *et al.*, 1988). Godiska und Kollegen testeten zudem zirkuläre Konstrukte und auch sie konnten sehen, dass diese zirkulären Konstrukte von der Zelle zunächst linearisiert werden (Godiska *et al.*, 1987). Der Mechanismus war jedoch unbekannt. Beide Gruppen konnten nicht belegen, ob die Bruchstellen an spezifischen Motiven oder zufällig erscheinen. In dieser Arbeit wurden deshalb die verwendeten pTI Konstrukte vor der Injektion durch Restriktionsenzyme gezielt linearisiert, um sicherzustellen, dass ein auf dem Transgen kodiertes Gen nicht durch einen zufälligen Bruch der Struktur zerstört wird.

Gilley und Kollegen konnten zudem zeigen, dass in *Paramecium* injizierte Transgene in linearer Form autonom repliziert werden und von Zelle zu Zelle weitergegeben werden. Dabei behalten sie ihre Kopienzahl bei. Dies entsprach in den von Ihnen durchgeführten Studien 50.000 bis 100.000 Kopien pro Zelle (Gilley *et al.*, 1988). Sie konnten zudem zeigen, dass den linearen Konstrukten Telomersequenzen in einer Länge von 300 nt *de novo* angehängt werden und dies nicht an spezifischen Sequenzen erfolgt. Sie konnten daher zeigen, dass das injizierte Konstrukt zum Replizieren keine *Paramecium*-spezifische Sequenz sein muss (Gilley *et al.*, 1988). Auch von Godiska und Kollegen wurde beschrieben, dass die Kopienzahl eines in *Paramecium* injizierten Transgens bei der Aufteilung von Zelle zu Zelle gleich bleibt (Godiska *et al.*, 1987). Dies entsprach in diesen Studien 45.000 bis 135.000 Kopien pro Zelle und ist daher mit der Studie von Gilley und Kollegen vergleichbar (Godiska *et al.*, 1987). Godiska und Kollegen konnten zudem zeigen, dass die Menge an injiziertem Transgen einen Einfluss auf die Exprimierbarkeit des Transgens hat. Wurden in der durchgeführten Studie geringere Mengen an Transgen injiziert, konnten sie keinen Phänotyp nachweisen. Die standardisierte Menge von 45.000 bis 135.000 Kopien pro Zelle erscheint als Schwellenwert (Godiska *et al.*, 1987). In dieser Arbeit wurden transgene Zelllinien untersucht, die viel oder wenig Konstrukt tragen, da eine genaue Quantifizierung der injizierten Konstruktmenge im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt wurde (vgl. Kapitel 3.1.1). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass in beiden Zelllinien das jeweilige injizierte Konstrukt von Zelle zu Zelle weitergegeben wird, da alle Zellen einer Kultur grün fluoreszieren (vgl. Abb. 3.8). Es ist daher anzunehmen, dass die in dieser Arbeit untersuchten Zelllinien beide über diesem von Godiska und Kollegen beschriebenen und von Gilley und Kollegen bestätigten Schwellenwert liegen, der erreicht werden muss, damit das Transgen von der Zelle exprimiert wird.

4.1.2: Schwellenwert zum Stilllegen eines Zielgens durch ein injiziertes Transgen

Garnier und Kollegen konnten in ihrer Studie zu injizierten Transgenen in *Paramecium* beobachten, dass es auch einen Schwellenwert gibt, der überschritten werden muss, um die Stilllegung und damit die Induktion eines RNAi-Mechanismus auszulösen (Garnier *et al.*, 2004). Sie haben Transgene charakterisiert, die nicht nur von der Zelle exprimiert werden, sondern auch ein Stilllegen eines Zielgens induzieren. Diese untersuchten Transgene wiesen entweder eine am 3' Ende verkürzte Version von Genen auf, die somit keine 3' UTR mehr aufwies oder aber sie beinhalteten einen Frameshift in der kodierenden Sequenz. Beide Arten an Transgenen lieferten somit Produkte, die für die Zelle nicht translatierbar waren (Garnier *et al.*, 2004). Garnier und Kollegen konnten ein effektives Stilllegen eines Zielgens nur beobachten, wenn das injizierte Transgen in ausreichender Menge vorlag. Wurden weniger als 800 Kopien des Transgens pro Makronukleus injiziert, war kein eindeutiger Silencing-Phänotyp zu verzeichnen (Garnier *et al.*, 2004). Beide in dieser Arbeit getesteten Zelllinien zeigen etwa denselben Silencing-Phänotyp, obwohl unterschiedliche Mengen an

injiziertem Konstrukt vorliegen. In beiden Zelllinien konnten ca. 90 % der ausgezählten Zellen keine Trichozyten mehr ausstoßen (vgl. Abb. 3.3). Zudem konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass beide Zelllinien ausreichende Mengen an siRNAs synthetisieren um diesen Phänotyp auszulösen (vgl. Abb. 3.4). Daraus lässt sich schließen, dass auch geringere Mengen an injiziertem Transgen ausreichen um eine Kaskade in Gang zu setzen, die nach dem „Alles oder Nichts“-Prinzip abläuft, wenn dieser von Garnier beschriebene Schwellenwert der Transgenmenge zum Auslösen eines Silencings erreicht ist. Mit Erreichen dieses Schwellenwertes wird der RNAi-Mechanismus in Gang gesetzt, die siRNAs synthetisiert und das Zielgen dadurch stillgelegt. Dies trifft jedoch nur dann zu, wenn das injizierte Transgen ein nicht translatierbares Transkript liefert.

4.1.3: Temperaturabhängigkeit des Transgen-induzierten RNAi-Mechanismus

Im Rahmen dieser Arbeit konnte dargestellt werden, dass der Transgen-induzierte RNAi-Mechanismus in *Paramecium tetraurelia* abhängig von der Temperatur ist (vgl. Abb. 3.5). Es konnte gezeigt werden, dass nur bei der Kultivierung der transgenen Zellen bei 32°C ein ausreichender Silencing-Phänotyp von nahezu 100 % generiert werden kann. Mit sinkender Temperatur wurde auch der detektierte Phänotyp geringer, obwohl die Zellen einer Zelllinie die gleiche Menge an Konstrukt tragen. So sank der ausgezählte Trich- Phänotyp der Zelllinie pTI-1 von 98 % bei 32°C auf 56 % bei 26°C und fiel anschließend auf 29 % bei 18°C. Bei der Zelllinie pTI-2 war der Unterschied sogar noch deutlicher. Hier konnte bei 32°C noch ein Trich- Phänotyp von 96 % detektiert werden. Dieser lag bei 26°C noch bei 29 % und fiel auf 13 % bei 18°C (vgl. Abb. 3.5). Auch in anderen Studien an anderen Organismen wurden temperaturabhängige Effekte von RNAi-Mechanismen beschrieben. Für *Arabidopsis* konnte die Gruppe um Szittyta zeigen, dass der RNAi-Mechanismus, der der Abwehr von Viren dient, ebenfalls stark von der Temperatur abhängt (Szittyta *et al.*, 2003). So wiesen Pflanzen, die bei 27°C kultiviert wurden keine Symptome des Virusbefalls auf. Mit sinkenden Temperaturen waren dagegen stärker werdende Symptome zu detektieren. Die Tatsache, dass bei 27°C keine Symptome mehr zu detektieren waren, wurde auf ein „heat masking“ durch ein hyperaktives RNAi-Silencing zurückgeführt (Szittyta *et al.*, 2003). In Pflanzen ähnelt der RNAi-Mechanismus, der durch das Einbringen eines Transgens induziert wird, dem RNAi-Mechanismus, der der Abwehr von Viren dient, identisch sind sie jedoch nicht (Voinnet, 2001). Sie unterscheiden sich lediglich in der Synthese der dsRNA zur Induktion des RNAi-Mechanismus (Dalmay *et al.*, 2000). Während bei einem Transgen-induzierten RNAi-Mechanismus in *Arabidopsis* die dsRNA durch die endogene RNA abhängige RNA-Polymerase SDE1 synthetisiert wird, ist die Virus-induzierte dsRNA-Synthese unabhängig von dieser SDE1 (Dalmay *et al.*, 2000). Szittyta und Kollegen konnten so durch das Einbringen eines Transgens, das ein *gfp*-Gen als Reportergen aufweist, analysieren, welchen Einfluss die Temperatur auf das Stilllegen dieses Reportergens und somit auf den RNAi-Mechanismus hat. Sie führten Analysen zu der detektierbaren Menge an *gfp*-spezifischen siRNAs durch. Sie konnten zeigen, dass die Menge an detektierbaren siRNAs mit steigender Temperatur zunahm. Zudem konnten sie zeigen, dass gleichzeitig die detektierbare Menge an *gfp*-mRNA abnahm (Szittyta *et al.*, 2003). Daraus konnten sie schließen, dass bei höheren Temperaturen mehr siRNAs zur Verfügung stehen um die vorhandenen Transkripte des Reportergens zur Degradation zu markieren. Szittyta und Kollegen haben diesen Effekt damit erklärt, dass die Aktivität des Dicer-Enzyms, welches zur Synthese der siRNAs benötigt wird, bei niederen Temperaturen stark eingeschränkt ist (Szittyta *et al.*, 2003).

Im Laufe dieser Arbeit konnte dargelegt werden, dass die detektierbare Menge der *gfp*-mRNA als Reporter sowie die Menge des transgenen *nd169*-Transkriptes bei Zunahme der Temperatur von 18°C zu 32°C abnimmt (vgl. Abb. 3.7). Es konnte zwar nicht eindeutig gezeigt werden, dass die Menge

an *nd169*-spezifischen siRNAs bei der höchsten untersuchten Temperatur von 32°C ebenfalls am höchsten ist, allerdings konnte aufgezeigt werden, dass die Menge an *nd169*-spezifischen siRNAs bei den niedrigen Temperaturen von 26°C zu 18°C nicht abnimmt (vgl. Abb. 3.6). Im Rahmen dieser Arbeit konnte also eine Korrelation zwischen dem temperaturabhängigen Silencing-Phänotyp des *nd169*-Gens, der siRNA-Menge und der Menge an detektierbarem Transkript hergestellt werden: Bei einer niedrigeren Temperatur liegt die größte Menge an detektierbarem Transkript vor, jedoch der schlechteste Silencing-Phänotyp. Und obwohl mehr Transkript zur Synthese der siRNAs im Vergleich zu den anderen Temperaturen vorliegt, ändert sich die Menge an siRNAs nicht signifikant.

Die Ergebnisse der real-time Analysen aus Kapitel 3.1.3 zeigen, dass dieser temperaturabhängige Silencing-Effekt jedoch nicht auf eine Aufregulierung in der Expression einer bestimmten Komponente des Mechanismus, wie es durch Szittyta und Kollegen für das Dicer-Enzym in *Arabidopsis* beschrieben wurde, zurückzuführen ist. In dieser Arbeit konnte sowohl für Dcr1, als auch für die anderen getesteten Kernkomponenten wie Rdr2, Rdr3 oder Hen1, gezeigt werden, dass diese Enzyme nicht bei einer höheren Temperatur aufreguliert sind. Jedoch kann das spezifische Temperatur-Optimum einer weiteren involvierten Komponente, wie z.B. die Ptiwis, durchaus bei 32°C liegen. Hierzu müssten noch weitere Versuche durchgeführt werden.

Für Pflanzen wurde eine Temperatur von 15°C in mehreren Studien als die Temperatur beschrieben, bei der ein RNAi-vermittelter Silencing-Phänotyp gerade noch detektiert werden kann und damit auch der zu Grunde liegende RNAi-Mechanismus gerade noch funktionell ist. Dies wurde neben *Arabidopsis* (Szittyta *et al.*, 2001) für Soja (Kasai *et al.*, 2009), für die mit dem Tabak verwandte Art *Nicotiana benthamiana* (Chellappan *et al.*, 2005), sowie bei Petunien (Griesbach *et al.*, 2007) beschrieben. Für die Weintraube *Vitis vinifera* konnte durch Ramon und Kollegen in einer Studie dagegen nur eine geringe Abhängigkeit des RNAi-Mechanismus von der Temperatur nachgewiesen werden. In dieser Studie wurden auch die Symptome verschiedener Virenerkrankungen der Weinpflanze bei verschiedenen Temperaturen getestet. Die getestete Spanne erstreckte sich von 5°C über 10°C und 15°C bis hin zu 26°C (Ramon *et al.*, 2013). Hier waren jedoch auch siRNAs und damit ein Silencing-Phänotyp bei einer Temperatur von 4°C in gleicher Menge wie bei 26°C detektierbar und keine Einschränkung in der Abwehr der Viren zu verzeichnen (Ramon *et al.*, 2013). Allerdings bleibt hier anzumerken, dass die Weintraube im Vergleich zu den anderen untersuchten Pflanzen mehrjährig ist und auch den kalten Temperaturen in der Winterperiode im Weinberg ausgesetzt ist. Auch im Winter werden Pflanzen von Viren angegriffen und müssen sich dagegen zur Wehr setzen. Somit kann der Schluss gezogen werden, dass eine mehrjährige Pflanze eine stärkere Temperatur-Toleranz bezogen auf RNAi-Mechanismen aufweist als eine Einjährige. Paramecien sind ubiquitär in Süßgewässern verbreitet und auch sie sind ganzjährigen Temperaturschwankungen ausgesetzt. Somit sollten Paramecien auch eine bessere Anpassung ihres nativen RNAi-Systems an Temperaturschwankungen aufweisen, da dies natürlicherweise auch zur Abwehr von Viren oder Retrotransposons dient (Girard und Hannon, 2007). Man sieht jedoch in den hier durchgeführten Versuchen aus Kapitel 3.1.3, dass die transgenen Paramecien das Zielgen bei 18°C nur sehr begrenzt stilllegen können. Dies konnte durch die Fluoreszenzaufnahmen aus Abbildung 3.8 bestätigt werden. Zudem sollte die Menge an siRNAs ausreichend sein um einen Phänotyp und ein Stilllegen des Zielgens zu bewirken. Allerdings müssen die im Labor getesteten *in vitro*-Versuche erst noch *in vivo* bestätigt werden. Bislang ist zudem kein Virus von *Paramecium* bekannt um dessen RNAi-abhängige Abwehr im Labor nachvollziehen und auf ihre Temperaturabhängigkeit hin untersuchen zu können.

Aber nicht nur für Pflanzen wurde eine Abhängigkeit von RNAi-Mechanismen von der Temperatur beschrieben. Auch in Studien an Säugerzellen (Kameda *et al.*, 2004) und für *Drosophila melanogaster* konnte eine solche Abhängigkeit gezeigt werden (Fortier und Belote, 2000). In der Studie von Kameda und Kollegen wurde eine Abhängigkeit von RNAi-Mechanismen von der Temperatur an verschiedenen Zelllinien untersucht. Diese waren humane Zellkulturen (HEK 193) und Zellen aus der Maus (NIH-3T3; STO) und eines Affen (Cos-1) (Kameda *et al.*, 2004). Alle Zellen wurden auf ihren RNAi-induzierten Silencing-Phänotyp verschiedener Gene bei Temperaturen von 26°C bis 38°C untersucht. Dabei wurde der Silencing-Phänotyp eines *gfp*-Gens und eines *lacZ*-Gens durch entsprechende Konstrukte getestet (Kameda *et al.*, 2004). Kameda und Kollegen konnten zeigen, dass in allen getesteten Zelllinien eine Temperaturabhängigkeit des Silencing-Phänotyps des *gfp* besteht. Sie konnten eine geringere Stilllegungsrate bei Temperaturen feststellen, die bei 28°C und darunter lagen. Auch die Menge an detektierbarem GFP auf Proteinebene war bei 28°C und darunter im Vergleich zu den anderen Temperaturen stark reduziert (Kameda *et al.*, 2004). Allerdings konnte dies nur für das *gfp*-Gen gezeigt werden. Bei der Untersuchung des *lacZ*-Konstruktes war kein deutlicher Silencing-Effekt des *lacZ*-Gens und damit ein Unterschied zwischen den Temperaturen zu detektieren (Kameda *et al.*, 2004). Sie konnten somit zeigen, dass die Abhängigkeit des Silencing-Phänotyps von der Temperatur auch zwischen Zielgenen variiert. Eine wirkliche Erklärung für die Ergebnisse konnten Kameda und Kollegen jedoch nicht finden. Wechselwarme Tiere werden in ihrem Verhalten, ihrem Metabolismus, ihrer Entwicklung und sogar in der Bestimmung ihres Geschlechts von der Temperatur beeinflusst (Cossins und Bowler, 1987). Ob dies jedoch auch für Gleichwarme Tiere wie die Säuger gilt, kann zumindest für einige Punkte nicht ausgeschlossen werden. Somit kann auch eine Temperaturabhängigkeit regulierender Prozesse nicht ausgeschlossen werden.

Kameda und Kollegen konnten eine Temperaturabhängigkeit nur Zielgen-spezifisch für das *gfp* zeigen, nicht jedoch für das *lacZ*. Das in dieser Arbeit durch das pTI- Konstrukt induzierte Silencing betrifft das *nd169*-Gen in *Paramecium*. Es könnte sich auch bei *Paramecium* um einen Zielgen-spezifischen Silencing-Effekt der Temperaturabhängigkeit des *nd169*-Gens handeln. Um dies auszuschließen, müssten jedoch weitere Experimente mit anderen Zielgenen durchgeführt werden.

Die Geschlechtsausbildung von *Drosophila* wurde auch als einen temperaturabhängigen RNAi-Mechanismus von Fortier und Belote beschrieben (Fortier und Belote, 2000). In dieser Studie wurde die Geschlechtsentwicklung transgener Fliegen bei 22°C und bei 29°C untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Entwicklung bei 29°C normal ablief, bei 22°C jedoch stark gestört war (Fortier und Belote, 2000). Von den Autoren wurde die These aufgestellt, dass dieser Effekt darauf beruhen könnte, dass eine Komponente des RNAi-Mechanismus eine Temperaturabhängigkeit aufweist (Fortier und Belote, 2000). Zudem könnte die höhere Temperatur dazu beitragen, dass die naszierenden Transkripte der eingebrachten Konstrukte schneller an RNA-Bindeproteine binden und sich auch schneller wieder lösen. Dies führt zu schneller gebildeten stabileren dsRNA-Konstrukten, die als Ausgangstrigger zur Synthese der siRNAs benötigt werden (Fortier und Belote, 2000). Wie schon erwähnt, kann nicht ausgeschlossen werden, dass eine Komponente des Mechanismus ein Aktivitäts-Optimum bei höheren Temperaturen hat, jedoch konnte für keine der getesteten Komponenten eine stärkere Expressionsrate bei höheren Temperaturen festgestellt werden (vgl. Abb. 3.9). Es bleibt hier aber anzumerken, dass der Metabolismus der Paramecien bei 18°C ebenfalls verlangsamt ist. So teilen sich die Zellen anstelle von viermal pro Tag bei 32°C nur noch einmal pro Tag. Der Silencing-Phänotyp könnte somit lediglich verzögert sein. Allerdings wurde auch bei längerer Kultivierung der Zellen bei 18°C kein besserer Phänotyp erzielt (Daten nicht gezeigt).

Zusammenfassend kann man daher sagen, dass für den Transgen-induzierten RNAi-Mechanismus in *Paramecium tetraurelia* eine Abhängigkeit des Silencing-Phänotyps von der Temperatur nachgewiesen werden konnte. Das induzierte Silencing des *nd169*-Zielgens ist nur bei höheren Temperaturen effizient. Allerdings beruht dieser temperaturabhängige Silencing-Effekt weder auf der Menge der detektierbaren synthetisierten siRNAs, noch auf der Aufregulierung einzelner Komponenten oder an der Menge des Transkriptes, das zur Synthese der siRNAs zur Verfügung steht.

4.2 Tiefensequenzierung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Libraries kloniert, die die siRNAs des Transgen-induzierten RNAi-Mechanismus enthalten. Hierfür wurde der „NEBNext® Multiplex Small RNA Library Prep Set for Illumina“-Kit verwendet und als Resultat der Methode entsprach nach der Illumina-Sequenzierung ein sequenzierter Read einer siRNA.

Zunächst musste die Methode der Tiefensequenzierung kleiner RNA-Spezies und die dafür notwendige Vorbereitung der RNA jedoch etabliert werden. Es wurde Gesamt-RNA aus transgenen Zellen isoliert und elektrophoretisch aufgetrennt. Der Bereich zwischen 17 und 25 nt wurde aus dem Gel ausgeschnitten und die darin enthaltene RNA eluiert und aufgereinigt (vgl. Abb. 3.10 A). Der Bereich wurde so gewählt, da die eventuell vorkommenden scanner RNAs (scanRNAs) eine Größe von 26 nt aufweisen und in der Zelle nur während der Autogamie vorkommen. Diese liegen zu abundant in der Zelle vor um eine ausreichende Coverage der eigentlichen zu sequenzierenden siRNAs zu gewährleisten. Aus diesem Grund wurde der Bereich knapp unterhalb von 26 nt ausgeschnitten.

Aus Kapitel 3.2 dieser Arbeit geht hervor, dass die Klonierung der Libraries und die Aufreinigung als gelungen angesehen werden kann, da nur eine, der siRNAs samt ligierten Adaptoren entsprechende Bande im Bioanalyser detektiert werden konnte (vgl. Abb. 3.10 B). Auch das Klonieren der spezifischen Libraries, die nur methylierte siRNAs enthalten, kann als gelungen angesehen werden. Es konnte zwar nicht verhindert werden, dass ein kleiner Teil der β -oxidierten siRNAs bereits β -eliminiert und dadurch mitsequenziert wurde, dennoch konnte gezeigt werden, dass die Aufoxidierung der unmethylierten siRNAs durch die Behandlung mit Periodat erfolgreich verlief (vgl. Abb. 3.11). Die Etablierung der Vorbereitung der RNA war somit erfolgreich und die klonierten Libraries konnten sequenziert werden. Die Ergebnisse der Illumina-Sequenzierungen aller Libraries konnten somit für die Analyse und Charakterisierung der in den Transgen-induzierten RNAi-Mechanismus involvierten siRNAs herangezogen werden.

4.2.1: Größenverteilung der Transgen-induzierten siRNAs

An Hand der in Abbildung 3.12 dargestellten Größenverteilung konnte gezeigt werden, dass die im Transgen-induzierten RNAi-Mechanismus eine Rolle spielenden siRNAs eine funktionelle Größe von 23 nt aufweisen. Von Marker und Kollegen wurde eine funktionelle Größe dieser siRNAs von 22 nt beschrieben (Marker *et al.*, 2010), jedoch wurde dies lediglich mit Northernblot-Analysen gezeigt. Allerdings wurde die Größe von 22 nt bei Marker und Kollegen an Hand des Abgleichs mit den Markerbanden bestimmt (Marker *et al.*, 2010). Die hydroxylierten Markermoleküle wandern auf Grund der Hydroxylgruppe jedoch langsamer in einem Harnstoffgel als die phosphorylierten siRNAs. Auf Grund dieses Laufunterschiedes und aus dem Peak bei einer Länge von 23 nt in Abbildung 3.12 dieser Arbeit, lässt sich vermuten, dass eine Größe von 23 nt die eigentlich funktionelle Größe der Transgen-induzierten siRNAs ist. Würden siRNAs einer anderen Größe eine Rolle spielen, die nicht so

abundant sind, könnten sie im Northernblot eventuell nicht detektiert werden, mit der Sequenzierung werden sie dagegen erfasst. Generell ist die Größe einer RNA-Spezies, neben dem Vorläufer, aus dem sie geschnitten oder von dem sie synthetisiert werden, ein wichtiges Charakterisierungsmerkmal. Jede bekannte RNA-Spezies in einem Organismus hat eine definierte Größe. So weisen in *A. thaliana* die siRNAs und miRNAs eine Größe von 21-24 nt, die piRNAs dagegen eine Größe von 24-31 nt auf (Vilkaitis *et al.*, 2010). In *T. thermophila* sind die siRNAs 23-24 nt groß, wohingegen die scanRNAs eine Größe von 28-29 nt aufweisen (Kurth und Mochizuki, 2009). Für *C. elegans* wurde gezeigt, dass die zu den piRNAs aus anderen Organismen vergleichbaren kleinen RNAs, eine Größe von 21 nt aufweisen und ein Uracil am 3' Ende tragen, weshalb sie auch 21U-RNAs genannt werden (Montgomery *et al.*, 2012). Nach dem gleichen Prinzip werden auch die siRNAs in *C. elegans* benannt. Dort gibt es zwei Klassen an siRNAs, die 26G-siRNAs und die 22G-siRNAs, die jeweils eine Größe von 22 nt bzw. 26 nt aufweisen (Montgomery *et al.*, 2012). Es kann also festgehalten werden, dass die in *Paramecium* durch ein Transgen induzierten kleinen RNAs mit einer Größe von 23 nt den siRNAs aus anderen Organismen entsprechen. Eine Präferenz für ein bestimmtes letztes Nukleotid, wie es für die pi- und siRNAs aus *C. elegans* beschreiben wurde, konnte mit dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Es hat den Anschein, dass *Paramecium* keine solche Präferenz aufweist (vgl. Abb. 8.4 ICL).

4.2.2: Vorkommen sekundärer siRNAs im Transgen-induzierten RNAi-Mechanismus

Zudem konnte im Laufe dieser Arbeit gezeigt werden, dass im Transgen-induzierten RNAi-Mechanismus zwei Klassen von siRNAs zu detektieren sind: die primären siRNAs, die vom Transgen stammen und die sekundären, die von der mRNA des endogenen *nd169*-Gens stammen. Es konnten siRNAs detektiert werden, die auf die Bereiche der *nd169*-kodierenden Sequenz mappen, die im Transgen im Vergleich zur endogenen Sequenz deletiert sind und somit von einem endogenen Transkript synthetisiert wurden (vgl. Abb. 3.13 A). Zudem konnte dargestellt werden, dass diese sekundären siRNAs in ihrer Orientierung eine fast ausschließliche antisense Orientierung aufweisen. Die antisense Ratio liegt bei 0,99 im 5' deletierten Bereich und bei 0,94 im 3' deletierten Bereich (vgl. Abb. 3.13 B).

Ob die dennoch detektierten sense orientierten sekundären siRNAs komplementär zu den antisense orientierten sind und Duplexe ausbilden können, wie es für Dicer-Produkte der Fall wäre, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht. Es kann somit keine Aussage über die Involvierung eines Dicers in die Synthese dieser sekundären siRNAs getroffen werden. Eine RNA abhängige RNA-Polymerase könnte eine lange doppelsträngige RNA synthetisieren, aus der die sekundären siRNAs via Dicer herausgeschnitten werden; eine RdRP könnte die sekundären siRNAs aber auch *de novo* synthetisieren. Wenn ein Dicer in die Synthese der sekundären Transgen-induzierten siRNAs involviert wäre, könnte das Dicer-like Enzym Dcl4 das potentiell involvierte Enzym sein. In der Arbeitsgruppe von Simon und Kollegen wurde im Rahmen einer Masterarbeit untersucht, welche Dicer-Enzyme eine Rolle bei der Regulation der Oberflächenantigene (SAG) von *Paramecium* spielen (C. Lauenstein, 2012). Der RNAi-Mechanismus zur Regulation dieser SAG's ist dem Transgen-induzierten RNAi-Mechanismus sehr ähnlich, da viele Komponenten wie z.B. Rdr3 (Marker *et al.*, 2010) oder Hen1 (V. Käfer, 2012) in beide Mechanismen involviert sind. Im Rahmen der Masterarbeit von C. Lauenstein konnte dargestellt werden, dass Dcl4 in die Regulation der Expression der SAG's involviert ist (C. Lauenstein, 2012). Ob dieses Dicer-like Protein auch in den Transgen-induzierten RNAi-mechanismus involviert ist, müsste jedoch erst noch untersucht werden.

Die Länge der primären und sekundären siRNAs wurde in verschiedenen Organismen als Unterscheidungsmerkmal zwischen den beiden Klassen ausgewiesen. So weisen z.B. in *Arabidopsis thaliana* und *Glycine max* die sekundären siRNAs eine Länge von 21 nt auf, wohingegen die primären siRNAs eine Länge von 22 nt zeigen (Yosikawa, 2013; Cho *et al.*, 2013). In *C. elegans* wurden den sekundären eine Länge von 22 nt zugewiesen, den primären dagegen eine Länge von 23 nt (Zhang *et al.*, 2012). Aus Abbildung 3.15 dieser Arbeit geht hervor, dass sowohl die sekundären als auch die primären detektierten siRNAs eine funktionelle Größe von 23 nt aufweisen (vgl. pTI-*icl*-Library in Abb. 3.15 B und 3.15 C). Für die Transgen-induzierten siRNAs in *Paramecium* konnte die Länge als Unterscheidungsmerkmal zwischen primären und sekundären siRNAs nicht bestätigt werden.

4.2.2.1: Primäre und sekundäre Transgen-induzierte siRNAs: Zusammenhänge und Abhängigkeiten

Im Transgen-induzierten RNAi-Mechanismus konnten im Laufe dieser Arbeit beide Klassen an siRNAs nachgewiesen werden. Die primären siRNAs, die vom Auslösermolekül des Mechanismus, dem Transgen, stammen und die sekundären siRNAs, die wahrscheinlich RdRP-abhängig von einem endogenen Transkript synthetisiert werden. Sekundäre siRNAs stellen somit eine Amplifikation und dadurch eine Verstärkung des Signals von primären siRNAs dar. Die Synthese der sekundären siRNAs ist folglich abhängig von dem Vorhandensein der primären siRNAs. Die genauen Zusammenhänge sind jedoch bis jetzt ungeklärt. In der Literatur wurden sekundäre siRNAs vor allem in Pflanzen untersucht. Sie werden in Pflanzen von einer RNA-abhängigen RNA-Polymerase von endogenen Transkripten von Sequenzbereichen amplifiziert, die ursprünglich das Ziel von primären siRNAs waren (Yoshikawa, 2013). Bei einer Studie an der Soja-Pflanze konnte dies sogar durch einen zeitlichen Ablauf bestätigt werden (Cho *et al.*, 2013). Es konnte gezeigt werden, dass die sekundären siRNAs zeitlich verzögert nach den primären siRNAs synthetisiert werden (Cho *et al.*, 2013). Zudem konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass die sekundären siRNAs nur dann synthetisiert werden, wenn die Anzahl der primären siRNAs einen bestimmten Schwellenwert überschreitet (Cho *et al.*, 2013). In einer Studie in *Arabidopsis* wurde dagegen gezeigt, dass eine einzige primäre siRNA gebunden an eine mRNA ausreicht, um die Synthese von sekundären siRNAs zu triggern (Moissiard *et al.*, 2007). Ein Schwellenwert zur Synthese der sekundären siRNAs, sofern er denn durch weitere Studien bestätigt werden kann, scheint für jeden Organismus verschieden zu sein. Auch in dem hier untersuchten Transgen-induzierten RNAi-Mechanismus in *Paramecium* ergeben sich mehrere Möglichkeiten zur Synthese der sekundären siRNAs. Auch hier könnte die Menge an sekundären siRNAs direkt mit der Menge an primären siRNAs korrelieren, wie es von Cho und Kollegen in Soja beschrieben wurde (Cho *et al.*, 2013). Dies würde bedeuten, dass z.B. bei einer Reduktion der primären siRNAs, durch z.B. ein Stilllegen einer in ihre Synthese involvierte Komponente, auch die sekundären siRNAs reduziert würden, da weniger Triggermoleküle vorhanden sind. Somit könnte man aber auch die Komponente nicht eindeutig zuordnen, da ja bei deren Stilllegung beide Klassen an siRNAs reduziert sind und somit beide den Anschein haben, als würden sie von dieser Komponente abhängen. Auf der anderen Seite könnte es aber auch sein, dass eine einzige primäre siRNA ausreicht um die Synthese einer großen Menge an sekundären siRNAs auszulösen, wie es für *Arabidopsis* beschrieben wurde (Moissiard *et al.*, 2007). Würde man in diesem Fall die Menge an primären siRNAs reduzieren, würde die Menge an sekundären siRNAs nicht betroffen sein. Da diese Zusammenhänge zwischen primären und sekundären siRNAs nicht eindeutig geklärt sind, ist eine Zuordnung der einzelnen in dieser Arbeit untersuchten RNAi-Komponenten zu den primären bzw. sekundären siRNAs schwierig (vgl. 4.4.1 und 4.4.2).

Für die sekundären siRNAs aus *Arabidopsis* wurde zudem beschrieben, dass sie, wenn sie vorhanden sind, weit abundanter als die primären siRNAs sind (Zhang *et al.*, 2012). Für die sekundären siRNAs aus *C. elegans* wurde jedoch das genaue Gegenteil beschrieben. Durch Sijen und Kollegen konnte gezeigt werden, dass die sekundären siRNAs in geringer Menge als die primären vorliegen (Sijen *et al.*, 2001). Aus Abbildung 3.13 dieser Arbeit geht hervor, dass die sekundären siRNAs in *Paramecium* generell weniger abundant sind als die primären. Der Mechanismus der Synthese der sekundären siRNAs aus *Paramecium* scheint folglich eher dem aus *C. elegans* zu ähneln, als dem pflanzlichen.

4.2.3: Transitivität

Sekundäre siRNAs werden in der Literatur als diejenigen beschrieben, die Transitivität vermitteln (Baulcombe, 2007; Voinnet, 2008). Transitivität beschreibt das Vorkommen von sekundären siRNAs und die Ausbreitung des damit verbundenen Silencing-Phänotyps über das ursprüngliche Triggermolekül hinaus. In *Arabidopsis* wurde die Synthese der sekundären transitiven siRNAs ausführlich untersucht und beschrieben. Es konnte gezeigt werden, dass die 22 nt langen primären siRNAs an Ago1 gebunden werden und eine homologe mRNA mit Hilfe der Slicer-Aktivität von Ago1 schneiden (Cuperus *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2010). Das Binden einer 22 nt langen miRNA an Ago1 induziert zudem eine Konformationsänderung des Ago1, die die Rekrutierung der RNA abhängigen RNA-Polymerase 6 (RdR6) und einem weiteren Protein SGS3 vermittelt (Manavella *et al.*, 2012). Die genaue Funktion von SGS3 ist nicht vollständig aufgeklärt, jedoch konnte belegt werden, dass dieses Protein eine stabilisierende Wirkung auf die von Ago1 geschnittenen Hälften der mRNA hat und diese somit vor Abbau schützt (Yoshikawa *et al.*, 2005). Die von Ago1 geschnittene Hälfte der mRNA, die die Polyadenylierung enthält, wird von RdR6 und SGS3 zu einem Doppelstrang umgesetzt, welcher anschließend von einem Dicer-like Protein, dem Dcl4, zu sekundären sogenannten tasiRNAs (trans-acting small interfering RNA) geschnitten wird, welche dann weitere Transkripte zur Degradation markieren (Manavella *et al.*, 2012; Yoshikawa, 2013).

Auch in dieser Arbeit konnte Transitivität nachgewiesen werden. Hier wurden sekundäre siRNAs in Bereichen detektiert, die nicht nur dem ursprünglichen Triggermolekül, dem injizierten Transgen entsprechen, sondern auch darüber hinaus z.B. im flankierenden Bereich am 3' Ende des endogenen *nd169*-Gens detektierbar sind. Somit konnte auch hier gezeigt werden, dass die verzeichnete Transitivität von den sekundären siRNAs abhängig ist (vgl. Abb. 3.13). Eine solche Abhängigkeit zwischen Transitivität und sekundären siRNAs wurde in Pflanzen für *Arabidopsis* (Yoshikawa, 2013; Vazquez und Hohn, 2012; Manavella *et al.*, 2012) und für Soja (Cho *et al.*, 2013) dargestellt. Auch für *S. pombe* und *C. elegans* konnte dies gezeigt werden (Simmer *et al.*, 2010; Sijen *et al.*, 2001). In der Studie an *C. elegans* von Sijen und Kollegen konnte zudem gezeigt werden, dass die Menge an detektierbaren sekundären siRNAs mit größer werdender Distanz zum Ausgangstrigger abnimmt (Sijen *et al.*, 2001). Dies wurde von Sijen und Kollegen durch die Synthese der sekundären siRNAs begründet. Da die sekundären siRNAs von einer RNA abhängigen RNA-Polymerase generiert werden, könnte es zum einen sein, dass diese RdRP generell nur kurze Stücke synthetisiert. Zum anderen könnte es aber auch sein, dass das von ihr genutzte Template nur eine begrenzte Länge aufweist. Ferner könnten zudem Bindeproteine oder Sekundärstrukturen des Templates dazu führen, dass die RdRP in der Synthese der sekundären siRNAs gehemmt wird (Sijen *et al.*, 2001).

In einer anderen Studie an *Arabidopsis* konnte von Vermeersch und Kollegen gezeigt werden, dass eine durch ein Transgen induzierte Silencing-Kaskade über drei Loci, durch das Einbringen eines Introns gehemmt wird (Vermeersch *et al.*, 2010). Dabei wurde dargestellt, dass die Länge der eingebrachten Introns eine Rolle spielt. Je länger das in den ersten Locus eingebrachte Intron war, desto schlechter wurde der letzte Locus der Kaskade gesilenced (Vermeersch *et al.*, 2010).

Transitivität ist somit ein endlicher Prozess, der zwar als Kaskade mehrere Loki und somit z.B. ganze Genfamilien regulieren kann, sich aber nicht über das ganze Genom ausbreitet.

Transitivität kann sich generell von einem Locus sowohl in 5´ Richtung, als auch in 3´ Richtung ausbreiten (Moissiard *et al.*, 2007). Aus Abbildung 3.13 dieser Arbeit geht hervor, dass die im 3´ deletierten Bereich detektierte Transitivität einer in 3´ Richtung entspricht. Da sich die sekundären siRNAs nur vom Genkörper her ausbreiten können, da nur dieser das Ziel der primären siRNAs ist, kann für den 5´ deletierten Bereich keine Richtung der Transitivität bestimmt werden. Dieser Bereich wird zu beiden Seiten von Bereichen flankiert, die Teil des primären Triggers sind. Somit stellt die hier detektierte Transitivität eine Mischung aus 5´ gerichteter und 3´ gerichteter Transitivität dar (vgl. Abb. 3.13).

Zusammenfassend kann hier festgehalten werden, dass die Etablierung der Methode der Tiefensequenzierung generell gut funktioniert hat und die Schlüsse, die aus den Analysen der Sequenzierungen gezogen werden können, aussagekräftig sind. Durch diese Analysen konnte gezeigt werden, dass es primäre und sekundäre siRNAs im Transgen-induzierten RNAi-Mechanismus in *Paramecium* gibt und beide Klassen eine funktionelle Größe von 23 nt aufweisen. Zudem konnte gezeigt werden, dass die sekundären transitiven siRNAs Transitivität in 3´Richtung vermitteln. Ob sie auch 5´ gerichtete Transitivität vermitteln, bleibt jedoch offen.

4.3 Methylierung der siRNAs durch die 2´-O-Methyltransferase Hen1

Von Simone Marker und ihren Kollegen konnte gezeigt werden, dass transgene siRNAs in *Paramecium* eine Modifikation an ihrem 3´ Ende tragen (Marker *et al.*, 2010). Im Rahmen dieser Arbeit konnten ausreichende Hinweise aufgezeigt werden, die vermuten lassen, dass es sich bei dieser Modifikation um eine Methylgruppe handelt, die durch die 2´-O-Methyltransferase Hen1 transferiert wird (vgl. Abb. 3.14 B). Eine phänotypische Analyse an transgenen pTI- Zellen hat gezeigt, dass bei einem Stilllegen von Hen1 der induzierte RNAi-Mechanismus gestört ist und somit vermehrt transgene pTI- Zellen in der Lage sind, wieder Trichozysten auszustößen (vgl. Abb. 3.14 A). In Abbildung 3.14 A konnte dargestellt werden, dass bei einem Stilllegen von Hen1 die Anzahl der Zellen, die keine Trichozysten mehr ausstoßen können und so den gewünschten Phänotyp aufweisen, auf 42 % hoch signifikant im Vergleich zur Kontrolle absank. Dies bestätigt eine Involvierung von Hen1 in den Transgen-induzierten RNAi-Mechanismus. Durch die in Abbildung 3.14 B dargestellte Northernblot-Analyse konnte gezeigt werden, dass die Modifikation am 3´ Ende der detektierten siRNAs bei einem Stilllegen von Hen1 fehlt. Somit konnte bewiesen werden, dass Hen1 für diese Modifikation am 3´ Ende verantwortlich ist und es sich dabei um eine Methylgruppe handeln muss.

In mehreren Studien wurde eine Methylierung verschiedener RNA-Spezies als Stabilisierungsmerkmal beschrieben (Li *et al.*, 2005; Ji und Chen, 2012). Die Gruppe um Li und Kollegen konnte zeigen, dass ein Fehlen von Hen1 in *Arabidopsis* dazu führt, dass die miRNAs in ihrer Länge variieren (Li *et al.*, 2004). Dies beruht darauf, dass das Fehlen der Methylgruppe als Signal für die Zellen dient, mehrere Nukleotide an die miRNAs anzuhängen. Dabei war das meist angehängte Nukleotid Uracil, sodass von einer Polyuridylierung gesprochen werden kann (Li *et al.*, 2004). Ein solcher Poly-U-Schwanz gilt als Markierung für eine anschließende Degradation (Shen und Goodman, 2004). Auch von Ji und Chen wurde beschrieben, dass das Anhängen eines Poly-U-Schwanzes und die Degradation von RNA-Spezies weit verbreitete Prozesse sind, wenn die Methylgruppe durch ein Stilllegen der entsprechenden Methyltransferase wegfällt (Ji und Chen, 2012).

Allerdings sind nicht alle kleinen RNA-Spezies methyliert. Vielmehr sind es in jedem Organismus spezifische RNA-Spezies, die eine solche Modifikation tragen. So werden zum Beispiel in

Tetrahymena die Keimbahn-assoziierten scanRNAs methyliert (Kurth und Mochizuki, 2009); im Zebrafisch sind es die piRNAs, die von einem Hen1-Homolog methyliert werden (Kammaing *et al.*, 2010). Somit kann der Schluss gezogen werden, dass eine Methylierung als selektives Merkmal gilt (Kurth und Mochizuki, 2009; Mochizuki und Kurth, 2013). In dieser Arbeit konnte mit Hilfe der Tiefensequenzierungen demonstriert werden, dass Hen1 die im Transgen-induzierten RNAi-Mechanismus synthetisierten primären und sekundären siRNAs gleichermaßen methyliert (vgl. Abb. 3.16 A und B). Zudem konnte gezeigt werden, dass Hen1 nicht zwischen sense und antisense orientierten siRNAs diskriminiert (vgl. Abb. 3.16 D).

Allerdings scheint es hier den Anschein zu haben, dass obwohl die detektierbaren primären als auch die sekundären siRNAs methyliert sind, diese spezifische Stabilisierung keinen großen Einfluss auf deren Akkumulation ausübt (vgl. Abb. 3.14). Es konnte an Hand der Tiefensequenzierungen gezeigt werden, dass die generelle Anzahl beider siRNA-Klassen im Hen1-Silencing im Vergleich zur Kontrolle reduziert ist (vgl. Abb. 3.16 A und B). So konnte eine ca. 1,2fache Reduktion der Reads im 3' deletierten Bereich verzeichnet werden, die Anzahl der Reads, die auf den Genkörper mappen war ca. einfach reduziert (vgl. Abb. 3.16 C oberer Graph). Somit sind die primären wie auch die sekundären Transgen-induzierten siRNAs um ca. das Einfache reduziert. Auch die funktionelle Größe von 23 nt bleibt erhalten. In der pTI-*hen1Me*-Library zeigt sich ein anderes Bild. Da Hen1 nur stillgelegt nicht aber ausgeknockt wurde, sind in dieser Library siRNAs zu finden, die auf Grund einer Restaktivität von Hen1 noch methyliert sind. Oder, wie in Abb. 3.15 A zu sehen ist, nach der Abspaltung des letzten Nukleotids durch die Behandlung mit Periodat wieder ligierbar waren, jedoch nicht methyliert sind. Da sich die funktionelle Größe von 23 nt im Hen1-Silencing nicht ändert, konnte also kein Anhängen eines poly-U-Schwanzes gezeigt werden, wie das für miRNAs in *Arabidopsis* der Fall ist (Li *et al.*, 2004) (vgl. Abb. 8.4).

Der Schluss, dass ein Wegfallen der Methylgruppe keinen starken Einfluss auf die Akkumulation der siRNAs hat, konnte auch mit den Northernblot-Analysen aus Abbildung 3.14 B bestätigt werden. Hier ist im Hen1-Silencing die gleiche Menge an spezifischen siRNAs zu detektieren, wie in der ICL-Kontrolle (vgl. Abb. 3.14 B). Allerdings zeigte sich auf phänotypischer Ebene ein signifikanter Effekt im Hen1-Silencing verglichen mit der Kontrolle (vgl. Abb. 3.14 A). Daraus kann man schließen, dass die siRNAs zwar nicht mehr methyliert sind und auch nicht abgebaut werden, der Phänotyp aber dennoch eingeschränkt ist. Das Wegfallen der Methylgruppe muss einen Effekt downstream im Mechanismus auslösen. Nachdem im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass das methylieren der siRNAs unabhängig vom Binden der siRNAs an ein Ptiwi ist (vgl. Abb. 3.27), kann dies als downstream Komponente ausgeschlossen werden. Das Vorhandensein der Methylgruppe hat keinen Einfluss auf das Bindeverhalten der Ptiwis.

4.3.1: Aufbau der MTase-Domäne von Hen1 und die Gewinnung eines Antiserums gegen diese MTase-Domäne

Obwohl *Paramecium* drei Genomduplikationen durchlief (Aury *et al.*, 2006), liegt nur eine Genkopie von Hen1 im Genom vor. Dies deutet auf einen hohen selektiven Druck auf diesem Gen hin und, dass dieses Gen möglicherweise ein essentielles für die Zelle ist. Auch wenn die Methylierung der siRNAs im Transgen-induzierten RNAi-Mechanismus nur eine kleine Rolle spielt, so kann doch der Schluss gezogen werden, dass die Hen1-induzierte Methylierung anderer RNA-Spezies essentiell für die Zelle ist.

Das Hen1 aus *Paramecium* ähnelt in seinem Aufbau eher den tierischen Hen1-Homologen aus der Maus, der Fruchtfliege oder dem verwandten Ciliaten *Tetrahymena* (Vilkaitis *et al.*, 2010). Auch das aus *Paramecium* stammende Hen1 weist wie die anderen tierischen Homologe nur eine einzelne katalytisch aktive Domäne auf, die MTase-Domäne (vgl. Abb. 3.17), die dafür notwendig ist, die Methylgruppe auf die RNA zu transferieren (Vilkaitis *et al.*, 2010). Das Vorhandensein einer einzigen Domäne grenzt sie klar gegen die pflanzlichen Hen1-Homologe ab. Das in der Studie von Vilkaitis und Kollegen analysierte pflanzliche Homolog aus *Arabidopsis* wies viele verschiedene Domänen auf (Vilkaitis *et al.*, 2010). Auch durch die Studien von Mui Chan und Kollegen und Huang konnte eine solche Abgrenzung auf Grund der Größe des Proteins und der Anzahl und Art der Domänen zwischen tierischen und pflanzlichen Homologen bestätigt werden (Mui Chan *et al.*, 2009; Huang, 2012). Trotz der Unterschiede zwischen tierischen und pflanzlichen Hen1-Homologen konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die katalytisch aktive MTase-Domäne in allen Organismen hoch konserviert ist (vgl. Abb. 3.18).

Diese MTase-Domäne des Hen1 aus *Paramecium* stellt somit den idealen Bereich dar, um als Antigen für die Synthese eines Antikörpers zu fungieren. Aus diesem Grund wurden im Rahmen dieser Arbeit 153 Aminosäuren der MTase-Domäne als Antigen in *E. coli* überexprimiert. Aus Abbildung 3.19 kann man erkennen, dass die Überexpression des Antigens erfolgreich war. Aus Abbildung 3.20 und der Hybridisierung mit dem Präimmunserum ist zudem zu erkennen, dass der Hase, der zur Immunisierung und zur Gewinnung des Antiserums genutzt wurde, vor Beginn der Immunisierung keinen Kontakt zu einem *Paramecium* und einem Hen1-ähnlichen Protein hatte und deshalb auch keinen spezifischen Antikörpertiter aufweist. Im Laufe der Immunisierung wurde der Hen1-spezifische Titer jedoch höher bis er schließlich ein Level erreicht hatte, mit dem im Westernblot spezifische Banden detektiert werden können (vgl. Abb. 3.20 und folgende). Die Westernblot-Analyse aus Abbildung 3.21 zeigt deutlich, dass der Antikörpertiter des affinitätsaufgereinigten Antiserums ausreichend ist um Hen1-spezifische Banden zu detektieren. Auf diesem Blot wurde die Proteinfraktion aus isolierten Kernen gegen Gesamt-Protein aufgetragen. Es ist zu erkennen, dass in beiden Fraktionen eine Hen1-spezifische Bande von ca. 35 kDa, verglichen mit den definierten Größen der Markerbanden, detektiert werden kann. Das auf Grund der Aminosäure-Sequenz errechnete Molekulargewicht von Hen1 wurde mit 39,6 kDa angegeben, jedoch ist das Signal so stark, dass es sich bei der Bande bei 35 kDa sicher um die Hen1-Bande handelt, und der Größenunterschied zwischen errechnetem Molekulargewicht und der detektierten Größe der entsprechende Bande im Blot auf einen Laufartefakt im Gel zurück zu führen ist (vgl. Abb. 3.21). Die Detektion der Bande in der Proteinfraktion der isolierten Kerne, lässt den Schluss zu, dass das Hen1-Protein in den Kernen lokalisiert sein könnte.

Zudem wurde bei dieser Analyse in der Fraktion des Gesamt-Proteins eine weitere deutliche Bande mit einem Molekulargewicht von ca. 60 kDa nachgewiesen. Ob diese Bande unspezifisch ist, oder ob es sich hierbei eventuell um ein Dimer des Hen1-Proteins handelt, konnte im Verlauf dieser Arbeit nicht bestimmt werden. Es wurden zwar Versuche durchgeführt, ein eventuell vorliegendes Dimer in Monomere durch die Behandlung mit einem 8 M Harnstoff-Puffer (8 M Urea, 120 mM Tris pH = 7,4) oder durch die Behandlung mit TCEP (Tris-(2-carboxyethyl)-phosphin Hydrochlorid; [50 mM] pH = 7) zu denaturieren, jedoch blieben diese Versuche erfolglos (Daten nicht gezeigt). Da also nicht ausgeschlossen werden kann, dass die detektierte Bande bei 60 kDa eine unspezifische ist, ist das aus dem Hasen gewonnene polyklonale Antiserum für eine Fluoreszenzfärbung ungeeignet. Eine Lokalisation des Hen1-Proteins mit einer Fluoreszenzfärbung ist aber wichtig um die mögliche Lokalisation in den Kernen zu bestätigen. Die fixierten Zellen der Fluoreszenzfärbungen entsprechen dem aufgetragenen Gesamt-Protein des in Abbildung 3.21 dargestellten Westernblot und somit

würden beide Proteine, die den Banden bei 35 und 60 kDA auf dem Blot entsprechen, angefärbt werden. Es wäre folglich keine Diskriminierung zwischen ihnen möglich. Um diese Kreuzreaktionen zu vermeiden, wurde der open reading frame des *hen1* in einen Expressionsvektor kloniert, der es erlaubt N-terminale und C-terminale Fusionsproteine mit einem Flagtag zu generieren. Diese Vektoren wurden linearisiert und in *Paramecium* injiziert. Im Laufe dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass beide Konstrukte, das C-terminale und das N-terminale Fusionsprotein in den Zellen exprimiert werden (vgl. Abb. 3.22). Zudem konnte gezeigt werden, dass beide Konstrukte sowohl mit dem affinitätsaufgereinigten Antiserum gegen das Hen1-Protein, als auch mit einem monoklonalen Antikörper gegen den Flagtag im Westernblot nachgewiesen werden können und die selbe Bande detektieren, die dem Fusionsprotein in voller Länge entspricht (Vgl. Abb. 3.23).

Aus den Westernblot-Analysen aus Abbildung 3.22 und 3.23 geht zudem hervor, dass die detektierten Banden beim N-terminalen Fusionsprotein im Vergleich zum C-terminalen Fusionsprotein deutlich schwächer und schwerer nachzuweisen sind. Dies liegt daran, dass beide Konstrukte separat manuell in verschiedene Zellen injiziert wurden und somit unterschiedliche Mengen eingebracht wurden. Das Fehlen jeglicher detektierbarer Banden in der Spur des WT in Abbildung 3.23 ist durch die Affinitätsaufreinigung zu erklären. Hierfür wurde das überexprimierte Antigen, das auch zur Immunisierung des Hasen verwendet wurde, auf eine Membran gebロットet und das Serum anschließend darüber aufgereinigt. Das Serum wurde mit dem Membranschnipsel, auf dem das Antigen gebunden ist, inkubiert. Dies bewirkt, dass die spezifischen Antikörper an das gebundene Protein binden und unspezifische Antikörper ausgewaschen werden. Im Anschluss konnte dann der spezifische Antikörper eluiert werden. Da bei dieser Methode jedoch nicht sichergestellt werden kann, dass zum einen gleich viel Antigen auf jedem Schnipsel bindet und zum anderen, dass gleiche Mengen an spezifischem Antikörper eluiert werden können, kann es Unterschiede in der Sensitivität des aufgereinigten Serums geben. Da auf dem in Abbildung 3.23 dargestellten Blot zudem die überexprimierten Fusionsproteine aufgetragen sind, kann es sein, dass die überexprimierten Fusionsproteine die spezifischen Antikörper wegfangen und so leichter zu detektieren sind; die verbliebene Menge an Antikörper dann nicht ausreicht um das native Hen1 zu detektieren.

Es konnte durch die Markierung des Westernblots aus Abbildung 3.23 allerdings gezeigt werden, dass die Fusionsproteine vollständig exprimiert werden und im Westernblot detektiert werden können. Zudem konnte dargestellt werden, dass die Markierung mit dem Antikörper gegen den Flagtag, dieselbe Bande markiert wie das Hen1-Serum. Somit war es möglich, das Hen1-Protein in einer Fluoreszenzfärbung mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers gegen den Flagtag zu detektieren.

4.3.2: Lokalisation von Hen1

Die in dieser Arbeit durchgeführten Immunfluoreszenzfärbungen zeigen deutlich, dass das C-terminale Fusionsprotein sowohl im bzw. am Makronukleus, als auch in bzw. an den beiden Mikronuklei zu detektieren ist (vgl. Abb. 3.24). Weiter zeigt sich, dass das C-terminale Hen1-Fusionsprotein eher an der Kernmembran des Makronukleus zu finden ist (vgl. Abb. 3.24 Makronukleus). Auch für *Arabidopsis* wurde in einer Struktur-Analyse-Studie des pflanzlichen Hen1-Homologs beschrieben, dass dieses ein putatives Kernlokalisierungs-Signal aufweist (Chen *et al.*, 2002). Dies wurde jedoch nicht mit Fluoreszenzfärbungen bestätigt. Allerdings wurde in *Tetrahymena thermophila* das Hen1-Homolog, das wie in *Paramecium* als single copy Gen vorliegt, mittels Immunfluoreszenzfärbungen lokalisiert (Kurth und Mochizuki, 2009). Kurth und Mochizuki konnten zeigen, dass das Hen1-Protein im Makronukleus zu finden ist. Allerdings konnten sie das

Protein nur während der Konjugation detektieren, wenn sich die Mikronuklei gerade meiotisch teilen. In späteren Stadien der Zelle war es ihnen nicht möglich Hen1 zu lokalisieren (Kurth und Mochizuki, 2009). Zudem konnte das native Hen1 aus *Tetrahymena* nicht in Proteinisolaten aus vegetativen Zellen im Westernblot detektiert werden, da es laut Autoren eine zu geringe Expressionsrate hat (Kurth und Mochizuki, 2009). Beide Ergebnisse, die fehlende Detektierbarkeit des nativen Hen1-Homologs im Westernblot und die Detektion des Hen1 in der Fluoreszenzfärbung, die nur während der Konjugation gezeigt werden konnte, deuteten darauf hin, dass Hen1 in *Tetrahymena* während der Konjugation stärker exprimiert wird als in vegetativen Stadien.

Durch einen Abgleich mit der Genomdatenbank (ParameciumDB, <http://paramecium.cgm.cnrs-gif.fr/>) konnte auch für das Hen1 in *Paramecium* gezeigt werden, dass Hen1 während der Autogamie, einem Selbstfertilisierungsprozess, der der Konjugation ähnelt, stärker exprimiert wird als in vegetativen Stadien der Zelle (vgl. Abb. 8.1 im Anhang). Allerdings wurden aus Gründen der Handhabung vegetative Zellen für die Färbungen genutzt. Da in dieser Arbeit jedoch Fusionsproteine detektiert wurden, die durch die Injektion in einem überexprimierten Zustand in der Zelle vorliegen, war es hier möglich das Hen1 auch in anderen Zell-Stadien zu detektieren. Zudem ist die Expressionsrate von Hen1 in *Paramecium* für eine Detektion im Westernblot ausreichend, wie die Abbildung 3.21 zeigt.

Eine Lokalisation von Hen1 im Makronukleus könnte einen Hinweis darauf liefern, welche Art von Genregulation der Transgen-induzierte RNAi-Mechanismus auslöst. Da gezeigt werden konnte, dass Hen1 alle Klassen an involvierten siRNAs methyliert (vgl. Abb. 3.16) und Hen1 im Kern lokalisiert ist, ist anzunehmen, dass die Methylierung der siRNAs auch im Kern stattfindet. Folglich liegen viele methylierte siRNAs im Kern vor, um dort ihre Funktion auszuüben. Dies würde bedeuten, dass es sich bei der Art der vermittelten Genregulation um ein transkriptionelles Silencing handelt, da hierbei modifizierende Enzyme zum Chromatin rekrutiert werden, die den Histoncode und damit den Zustand des Chromatins verändern können. Natürlich kann die Lokalisation eines einzigen in den Mechanismus involvierten Proteins nicht als Nachweis für die Art der Genregulation angesehen werden. Um die Art der Regulierung eindeutig zu bestätigen, müssten noch weitere Versuche durchgeführt werden. So könnten zum Beispiel ChIP-Analysen (Chromatin-Immunopräzipitation, ChIP) zeigen, ob und wenn ja welche Histonmarker in transgenen Zellen im Vergleich zum Wildtyp verändert sind und somit den Nachweis einer transkriptionellen Genregulierung zeigen. Es gibt jedoch auch Beispiele aus anderen Organismen, die zeigen, dass kleine regulatorische RNAs zwischen dem Kern und dem Cytoplasma wandern, bzw. aktiv an ein Piwi gebunden transportiert werden. So vermitteln z.B. die piRNAs in *Drosophila* im Cytoplasma über den sogenannten „Ping-Pong-Kreislauf“ ein post-transkriptionelles Gensilencing durch den Abbau einer homologen mRNA (Rozhkov *et al.*, 2012; Le Thomas *et al.*, 2013; Saito *et al.*, 2013; Brennecke *et al.*, 2007). Durch das abwechselnde Binden an Aubergine und Ago3 und deren Slicer-Aktivität werden zudem immer neue piRNAs synthetisiert, die dann an Piwi gebunden in den Kern transportiert werden um dort ein transkriptionelles Gensilencing zu vermitteln (Rozhkov *et al.*, 2012; Le Thomas *et al.*, 2013; Saito *et al.*, 2013; Brennecke *et al.*, 2007). In einer dieser Studien konnte zudem gezeigt werden, dass diese Translokation des Piwi-Proteins in den Kern nur stattfinden kann, wenn dieses eine piRNA geladen hat (Le Thomas *et al.*, 2013). Ein ähnlicher Ping-Pong-Kreislauf wurde in der Maus für die piRNAs und die Proteine Mili und Miwi2 beschrieben. Hier ist es Miwi2, das sowohl im Cytoplasma als auch im Kern lokalisiert sein kann (Aravin *et al.*, 2008; Kuramochi-Miyagawa *et al.*, 2008). Für *C. elegans* wurde das Argonauten-Protein NRDE3 beschrieben, welches nötig ist um siRNA-vermittelt Zellkern-lokalisierte RNAs stillzulegen (Guang *et al.*, 2008). Zudem konnte in dieser Studie an *C. elegans* demonstriert werden, dass das Binden der siRNA durch NRDE3 im Cytoplasma stattfindet und die

Translokation in den Kern erst im Anschluß stattfindet (Guang *et al.*, 2008). Auch in Ciliaten wurden solche Translokationen von kleinen RNA-Spezies schon genauer beschrieben. So konnte in *Paramecium* und in *Tetrahymena* gezeigt werden, dass die dortigen scanRNAs, die vergleichbar mit den piRNAs aus anderen Organismen sind, während der Autogamie an ein Piwi gebunden aus den Mikronuklei über das Cytoplasma in die Anlagen des neu entstehenden Makronukleus gebracht werden (Mochizuki *et al.*, 2002; Noto *et al.*, 2010; Lepère *et al.*, 2010). Da im Laufe dieser Arbeit vermutet werden konnte, dass die in den Transgen-induzierten RNAi-Mechanismus involvierten siRNAs erst nach dem Methylieren an ein Piwi gebunden werden (vgl. Abb. 3.27), und diese Methylierung auf Grund der Lokalisation von Hen1 wahrscheinlich im Kern stattfindet, ergibt dies einen weiteren Hinweis darauf, dass es sich um ein transkriptionelles Gensilencing handeln könnte. Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine post-transkriptionelle Regulierung weder bestätigt noch ausgeschlossen werden. Eine solche post-transkriptionelle Genregulierung wurde jedoch von Galvani und Sperling in ihren Studien zu injizierten Transgenen in *Paramecium* gezeigt (Galvani und Sperling, 2001). Allerdings wurde dies nur für ein einziges Gen, das *T4a*-Gen der Trichozysten-Matrix-Proteine gezeigt, das zusätzlich einer positiven Feedback-Regulation der Transkription unterliegt (Galvani und Sperling, 2001). Es liegen folglich andere Grundvoraussetzungen vor, sodass das hier untersuchte Transgen nicht unbedingt mit dem Transgen aus der Studie von Galvani und Sperling verglichen werden kann.

An Hand von den hier generierten Daten, lässt sich jedoch vermuten, dass die Transgen-induzierte Genregulierung wohl eine Mischung aus transkriptionellem und post-transkriptionellem Silencing darstellt.

Das N-terminale Fusionsprotein konnte in der Fluoreszenzfärbung aus Abbildung 3.24 keiner speziellen Organelle zugewiesen werden. Es war vielmehr homogen in der Zelle verteilt zu detektieren. Da das C-terminale Fusionsprotein jedoch eindeutig den Kernen zugewiesen werden konnte, lässt dies den Schluss zu, dass am N-terminalen Ende des Proteins Signalpeptide sitzen müssen, die die native Lokalisation vermitteln, wie es z.B. in Pflanzen beschrieben wurde (Tang *et al.*, 2014).

Es bleibt hier jedoch anzumerken, dass die in dieser Arbeit durchgeführten Immunfluoreszenzfärbungen nur die Lokalisation der Fusionsproteine detektieren, nicht das native Hen1. Jedoch ist der für die Fusionsproteine verwendete 3xFlagtag mit einem Molekulargewicht von 2,73 kDa (Terpe, 2003) so klein, dass davon auszugehen ist, dass dieser die Proteinfaltung kaum beeinflusst. Es ist somit anzunehmen, dass sich das Fusionsprotein wie das native Hen1 verhält und die Markierung in den Kernen auch dem nativen Hen1 entspricht.

Die Signale des C-terminalen Fusionsproteins in den Mikronuklei deuten darauf hin, dass Hen1 in *Paramecium tetraurelia* mit der Keimbahn assoziiert ist, da die Mikronuklei der Ciliaten der Keimbahn der höheren Eukaryoten entsprechen. Für die Maus und *Drosophila* konnte gezeigt werden, dass Hen1 auf die Keimbahn beschränkt vorliegt. Für *Drosophila* konnte durch Saito und Kollegen demonstriert werden, dass Hen1 die sogenannten piRNAs (Piwi interacting RNAs) methyliert, die nur in den Gonaden zu finden sind (Saito *et al.*, 2007). Diese interagieren mit dem Ago2-Protein und vermitteln so die Eliminierung von transposablen Elementen aus dem Genom der Keimbahnzellen. Dieses piRNA-abhängige Stilllegen der Transposons konnte in *Drosophila* von der Gruppe um Horwich und Kollegen bestätigt werden (Horwich *et al.*, 2007). Auch für die Maus wurde durch Kirino und Kollegen gezeigt, dass die auf die Keimbahn beschränkten piRNAs aus der Maus ebenfalls durch das Hen1-Homolog methyliert werden (Kirino *et al.*, 2007 a,b und c). Hen1 konnte in

der Maus ausschließlich in den Hoden nachgewiesen werden (Kirino *et al.*, 2007 a). Kamminga und Kollegen konnten Ähnliches für den Zebrafisch zeigen (Kamminga *et al.*, 2010). Hier konnte Hen1 in der Keimzellen spezifischen Struktur Nuage der Gonaden nachgewiesen werden, wo es mit dem ebenfalls ausschließlich dort lokalisierten Piwi-Protein „Ziwi“ interagiert (Kamminga *et al.*, 2010). Für *C. elegans* konnte dagegen dargestellt werden, dass das dortige Hen1-Homolog „henn-1“ sowohl in der Keimbahn als auch im Soma zu finden ist und somit nicht auf die Keimbahn beschränkt vorliegt (Billi *et al.*, 2012). Es konnte überall dort lokalisiert werden, wo auch das jeweilige mit den methylierten RNAs interagierende Argonauten-Protein detektiert werden konnte (Billi *et al.*, 2012). Eine Kolokalisation von Hen1 mit einem der getesteten Ptiwis in *Paramecium* wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht nachgewiesen.

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass das Hen1 aus *Paramecium* sowohl in der Keimbahn, also den Mikronuklei, als auch im Soma, im Makronukleus, zu detektieren ist und somit nicht nur auf die Keimbahn beschränkt vorliegt, wie es für viele Organismen beschrieben wurde. Diese Verteilung ähnelt also am ehesten der für *C. elegans* beschriebenen.

4.4 Involvierung weiterer Komponenten in den Transgen-induzierten RNAi-Mechanismus

Marker sowie Carradec und Kollegen konnten in mehreren Studien an *Paramecium* einen ebenfalls exogen getriggerten RNAi-Mechanismus, der dsRNA-Feeding assoziierte, detaillierter beschreiben. Sie konnten für den dsRNA-Feeding-Mechanismus zeigen, dass es auch dort primäre und sekundäre siRNAs gibt (Marker *et al.*, 2010; Marker *et al.*, 2014; Carradec *et al.*, 2014). Marker und Kollegen konnten durch Northernblot-Analysen nachweisen, dass die RNA abhängige RNA-Polymerase Rdr3 in die Akkumulation der Transgen-induzierten siRNAs involviert ist (Marker *et al.*, 2010). In einer anderen Studie konnten Carradec und Kollegen zeigen, dass Rdr2 und die Nukleotidyltransferase Cid2 in die Akkumulation der sekundären dsRNA-Feeding assoziierten siRNAs involviert sind (Carradec *et al.*, 2014). Für das *Paramecium* spezifische Piwi Ptiwi13 wurde von Bouhouche und Kollegen beschrieben, dass es sowohl in den Transgen-induzierten, als auch in den dsRNA-Feeding assoziierten RNAi-Mechanismus involviert ist (Bouhouche *et al.*, 2010). Auch die Ptiwis 8 und 14 wurden von Bouhouche und Kollegen als in den Transgen-induzierten RNAi-Mechanismus involviert beschrieben (Bouhouche *et al.*, 2010). Im Rahmen dieser Arbeit wurde deshalb untersucht, welche Rolle die von Bouhouche, Marker und Carradec beschriebenen Komponenten im Transgen-induzierten RNAi-Mechanismus von *Paramecium* spielen. Mit der zunächst durchgeführten phänotypischen Analyse aus Abbildung 3.25 kann bestätigt werden, dass sowohl die beiden RdRPs Rdr2 und Rdr3, als auch die drei Ptiwis 8, 13 und 14 und die Nukleotidyltransferase Cid2 im Transgen-induzierten RNAi-Mechanismus eine Rolle spielen. Bei der Stilllegung aller Komponenten nimmt die Anzahl der Zellen, die keine Trichozysten mehr ausstoßen können, signifikant im Vergleich zur Kontrolle ab (vgl. Abb. 3.25). Dies bedeutet, dass der Silencing-Mechanismus durch das Stilllegen der jeweiligen Komponente unterbrochen wurde und die Komponente somit involviert ist.

4.4.1: Die Ptiwis 8, 13 und 14 im Transgen induzierten RNAi-Mechanismus

Zunächst wurden die in den Transgen-induzierten RNAi-Mechanismus involvierten Ptiwis an Hand von Northernblot-Analysen genauer untersucht. In den Northernblot-Analysen aus Abbildung 3.26 ist

zu erkennen, dass die detektierbare Menge an siRNAs in den Stilllegungen der einzelnen Ptiwis im Vergleich zur ICL-Kontrolle stark variiert.

Es ist zu sehen, dass die Menge an Transgen-Vektor-spezifischen primären siRNAs im Vergleich zur ICL-Kontrolle in der Stilllegung von Ptiwi 13 und Ptiwi 8/14 als Doppelverfütterung stark abnimmt (vgl. Abb. 3.26). Allerdings bleibt hier anzumerken, dass das Grundgerüst der pTI- Konstrukte dem dsRNA-Feeding-Vektor L4400 entspricht, wodurch die verwendete Vektorsonde in ihrer Sequenz auch zu diesem Feeding-Vektor homolog ist und auch primäre dsRNA-Feeding assoziierte siRNAs detektieren könnte (vgl. Abb. 8.3). Von Marker und Kollegen wurde jedoch dargestellt, dass diese dsRNA-Feeding-assoziierten siRNAs keine Modifikation an ihrem 3' Ende aufweisen. Im Rahmen dieser Arbeit konnte jedoch eine solche Modifikation bei den mit dieser Sonde detektierten siRNAs aufgezeigt werden. Somit ist davon auszugehen, dass bei der Hybridisierung mit der Vektor-Sonde überwiegend die primären Transgen-induzierten siRNAs detektiert werden. Da in der Spur der einzelnen Ptiwi 8-Stilllegung keine Abnahme der mit der Vektor-Sonde detektierten siRNA-Menge zu verzeichnen ist, ist die detektierte Abnahme der Menge an primären siRNAs bei der Doppelverfütterung eher auf Ptiwi 14 zurückzuführen (vgl. Abb. 3.26). Auch das Expressionslevel dieser beiden Ptiwis aus Abbildung 8.1 im Anhang deutet auf eine verstärkte Rolle von Ptiwi 14 in die Akkumulation der siRNAs hin. Ptiwi 14 ist im Vergleich zu Ptiwi 8 im vegetativen Stadium der Zelle höher exprimiert, wohingegen Ptiwi 8 während der Autogamie stärker exprimiert wird als das Ptiwi 14 (Bouhouche *et al.*, 2010). Da für diese Northernblot-Analysen RNA aus vegetativen Zellen isoliert und analysiert wurde, können auch nur Rückschlüsse auf Ptiwi 14 gezogen werden. Um die genaue Rolle von Ptiwi 8 im Transgen-induzierten RNAi-Mechanismus untersuchen zu können, müsste RNA aus autogamen Zellen isoliert und mittels Northernblot analysiert werden. Jedoch kann festgehalten werden, dass die beiden Ptiwis 13 und 14 wahrscheinlich in die Akkumulation der primären Transgen-induzierten siRNAs involviert sind.

Aus Abbildung 3.26 wird zudem ersichtlich, dass diese beiden Ptiwis 13 und 14 auch die Menge an *nd169*-spezifischen siRNAs beeinflussen. Auch diese siRNAs sind in ihrer Menge im Silencing der Ptiwis im Vergleich zur ICL-Kontrolle stark reduziert (vgl. Abb. 3.26). Die *nd169*-spezifischen siRNAs stellen eine Mischung aus primären vom Transgen synthetisierten und sekundären von einer mRNA des endogenen *nd169*-Gens synthetisierten siRNAs dar. Deshalb kann nicht eindeutig gesagt werden, dass die Ptiwis 13 und 14 in die Akkumulation der sekundären siRNAs involviert sind, da die detektierte Reduktion der siRNA-Menge mit der ND169-Sonde im Genkörper darauf beruhen könnte, dass nur die primären siRNAs reduziert sind und nur noch die sekundären mit der Sonde detektiert werden.

Um genauer zu charakterisieren, welche Klasse von Transgen-induzierten siRNAs von welchem Ptiwi abhängt, wurden die Tiefensequenzierungen herangezogen. Diese erlauben eine Unterscheidung zwischen den primären und sekundären *nd169*-spezifischen siRNAs innerhalb eines Gens, sodass eine detailliertere Charakterisierung der Ptiwis in die Involvierung der Synthese und Stabilisierung der beiden Klassen möglich ist. Bei den Northernblot-Analysen müssen für die Detektion unterschiedlicher siRNAs verschiedene Sonden generiert, der Blot gestrippt und neu hybridisiert werden. Dies kann zur Folge haben, dass beim Strippen des Blots entweder RNA mit heruntergewaschen wird, oder aber, dass die Sonde nicht vollständig abgewaschen wird und somit noch Restsignale detektiert werden können, die zu falsch-positiven Ergebnissen führen. Somit können keine Vergleiche zwischen zwei verschiedenen Sonden gezogen werden, sondern nur die Spuren innerhalb einer Markierung verglichen werden. Die Tiefensequenzierung umgeht dieses

Problem und stellt die genaueste Methode dar um vergleichende Analysen durchführen zu können. Trotzdem lassen Northernblots unterstützend durchaus aussagekräftige Rückschlüsse zu und sind wichtig um die Sequenzierungen interpretieren zu können.

Aus Abbildung 3.29 wird ersichtlich, dass die Doppelverfütterung der Ptiwis 8 und 14 in der Sequenzierung einen Einfluss auf die Akkumulation der Transgen-induzierten siRNAs hat. Zieht man zudem die Northernblot-Analysen aus Abbildung 3.26 hinzu, so ist zu erkennen, dass sowohl die primären als auch die sekundären *nd169*-spezifischen siRNAs in ihrer Anzahl reduziert sind (vgl. Abb. 3.26 und 3.29). Es kann daher davon ausgegangen werden, dass diese beiden Ptiwis in die Akkumulation beider Transgen-induzierter siRNA-Klassen, den primären und den sekundären, involviert sind. Zusammen mit den Northernblot-Analysen aus den Abbildungen 3.26 und 3.27 kann jedoch der Schluss gezogen werden, dass dieser Effekt eher auf Ptiwi 14 als auf Ptiwi 8 zurückzuführen ist. Um dies bestätigen zu können, müssten jedoch neue Libraries von den einzelnen Ptiwis kloniert, sequenziert und ausgewertet werden. Dies war im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich. Es wäre jedoch auf Grund der starken Homologie der beiden Ptiwis möglich, dass das Ptiwi 8 nur als „Reserve“ dient und einspringt, wenn Ptiwi 14 ausfällt. Allerdings zeigen die im Anhang aufgeführten Expressionslevel (vgl. Kapitel 8.4), dass Ptiwi 14 konstitutiv exprimiert wird, wohingegen Ptiwi 8 nur während der Autogamie stark exprimiert wird. Dies könnte einen Hinweis darauf geben, dass die beiden Ptiwis obwohl sie ähnlich zueinander sind doch unterschiedliche Funktionen in der Zelle übernehmen und einander deshalb nicht ersetzen.

Für das Ptiwi 13 ergibt sich ein ähnliches Bild. Hier konnte gezeigt werden, dass in der Analyse der Tiefensequenzierung die Bereiche des *nd169*-Gens, die den sekundären siRNAs entsprechen, im Vergleich zur ICL-Kontrolle am stärksten abweichen (vgl. Abb. 3.28). Die Anzahl der Reads, die in diesen Bereichen mappen, sind um das 4-7,5fache reduziert (vgl. Abb. 3.28 D). Zwar ist auch eine Abnahme der Anzahl der mappenden Reads im Genkörper zu verzeichnen, allerdings stellt dieser eine Mischung aus primären und sekundären siRNAs dar. Die Reduktion der Reads in diesem Bereich könnte somit darauf beruhen, dass die sekundären siRNAs reduziert sind und nur noch die verbliebenen primären siRNAs zu detektieren sind und die Anzahl deshalb reduziert ist (vgl. Abb. 3.28 B, C und D). In den Northernblot-Analysen aus Abbildung 3.26 wird allerdings deutlich, dass die primären siRNAs bei einer Stilllegung von Ptiwi 13 reduziert sind (vgl. Abb. 3.26). Es kann somit auch hier festgehalten werden, dass das Ptiwi 13 in die Akkumulation beider Klassen an siRNAs involviert ist. Allerdings konnte dargestellt werden, dass sich die Stilllegung von Ptiwi 13 analog zu den Stilllegungen der Komponenten Rdr2 und Cid2 in den Sequenzierungen verhält und für letztere konnte von Marker und Carradec und Kollegen gezeigt werden, dass diese in die Akkumulation der sekundären dsRNA-induzierten siRNAs involviert sind (Marker *et al.*, 2014; Carradec *et al.*, 2014). Dies legt den Schluss nahe, dass Ptiwi 13 doch eher in die Akkumulation der sekundären Transgen-induzierten siRNAs involviert sein könnte.

Für *Tetrahymena* konnte gezeigt werden, dass das Stilllegen des Piwi-Homologs Twi1p dazu führt, dass die detektierten siRNAs keine Methylierung mehr aufweisen (Kurth und Mochizuki, 2009). Daraus wurde der Schluss gezogen, dass das Binden der siRNAs an das Piwi ein essentieller Schritt ist, damit Hen1 in direkter Interaktion mit Twi1p die Methylierung ausführen kann (Kurth und Mochizuki, 2009). Eine solche Interaktion des Piwi-Proteins mit dem Hen1-Homolog Pimet konnte auch in *Drosophila* gezeigt werden (Saito *et al.*, 2007). In der in dieser Arbeit durchgeführten Northernblot-Analyse aus Abbildung 3.27 konnte jedoch gezeigt werden, dass die Transgen-induzierten primären siRNAs trotz der Stilllegung der Ptiwis 8, 13 und 8/14 in einer Doppelverfütterung methyliert sind. Für die sekundären siRNA kann jedoch an Hand der Northernblot-Analyse keine eindeutige Aussage

getroffen werden (vgl. Abb. 3.27). Allerdings wurde im Rahmen dieser Arbeit die pTI-*ptiwi8/14Me*-Library kloniert und sequenziert und konnte zur Analyse der sekundären siRNAs herangezogen werden. Da diese Library nur methylierte siRNAs enthält, sind siRNAs, die in den Bereichen detektiert werden, die spezifisch für sekundäre siRNAs sind, folglich noch methyliert. Aus Abbildung 3.30 wird an Hand der Tiefensequenzierung somit deutlich, dass die detektierten sekundären siRNAs trotz der Stilllegung der Ptiwis 8 und 14 methyliert sind. Für Ptiwi 13 wurde jedoch keine Tiefensequenzierung der methylierten siRNAs im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt, weshalb hier keine eindeutigen Rückschlüsse auf die sekundären siRNAs in Bezug auf die Reihenfolge der Methylierung und das Binden getroffen werden können. Allerdings geben die bereits erwähnten Northenblot-Analysen aus Abbildung 3.27 einen Hinweis darauf, dass die im Ptiwi 13-Silencing detektierten primären siRNAs noch methyliert sind. Es kann somit der Schluss gezogen werden, dass das Binden der siRNAs an eines der drei getesteten Ptiwis nicht nötig ist, damit Hen1 die Methylgruppe auf die siRNAs transferieren kann. Somit kann nicht nur gesagt werden, dass beide Prozesse unabhängig voneinander ablaufen, es kann auch ein Rückschluss auf die Reihenfolge der Prozesse gezogen werden. Es ist daher anzunehmen, dass beide Klassen an Transgen-induzierten siRNAs zuerst von Hen1 methyliert und erst im Anschluss in das Ptiwi geladen werden um zum Zielort in der Zelle geleitet zu werden. Eine schematische Übersicht der möglichen Abläufe ist in Abbildung 4.1 dargestellt.

Zusammenfassend lässt sich für die Ptiwis folgendes Bild zeichnen. Das *Paramecium* spezifische Ptiwi 14 ist in die Akkumulation beider Transgen-induzierten siRNA-Klassen involviert, wobei eine Beteiligung von Ptiwi 8 nicht ausgeschlossen werden kann. Das Ptiwi 13 spielt ebenfalls in der Akkumulation beider siRNA-Klassen eine Rolle. Auf Grund der Analogie zu Rdr2 und Cid2 lässt sich jedoch der Schluss ziehen, dass Ptiwi 13 in der Akkumulation der sekundären Transgen-induzierten siRNAs involviert sein könnte. Zudem lässt sich vermuten, dass das Laden der siRNAs in das Ptiwi unabhängig von der Methylierung der siRNAs ist und zeitlich erst nach dieser stattfindet.

4.4.2: Die RNA abhängige RNA-Polymerasen 2 und 3 und die Nukleotidyltransferase Cid2 im Transgen-induzierten RNAi-Mechanismus

Im Anschluss wurden die RNA abhängigen RNA-Polymerasen Rdr2 und Rdr3 zusammen mit der Nukleotidyltransferase Cid2 untersucht. An Hand der phänotypischen Analyse aus Abbildung 3.25 konnte für alle drei Komponenten eine Involvierung in den Transgen-induzierten RNAi-Mechanismus bestätigt werden. Bei allen sank der Anteil an Zellen, die einen Silencing-Phänotyp aufweisen hoch signifikant ab (vgl. Abb. 3.25). Marker und Kollegen konnten für Rdr3 beschreiben, dass diese Polymerase in die Akkumulation der Transgen-induzierten siRNAs involviert ist (Marker *et al.*, 2010). Allerdings konnten Marker und Kollegen in dieser Studie eine Beteiligung von Rdr2 im Transgen-induzierten RNAi-Mechanismus noch nicht aufzeigen (Marker *et al.*, 2010). Dies konnte erst in der Studie von 2014 dargestellt werden, als an transgenen Zelllinien getestet wurde, die einen moderaten Trich- Phänotyp aufwiesen (Marker *et al.*, 2014). Bei der Verwendung eines solchen Klons ist es leichter, geringere Änderungen im Trich- Phänotyp zu detektieren und auszuzählen. Bei einem Klon, der einen starken Trich- Phänotyp aufweist, könnte es dagegen passieren, dass geringere Änderungen maskiert werden. In den in dieser Arbeit untersuchten Zelllinien war es kein Problem, Rdr2 als involviert zu beschreiben, obwohl die Zelllinie einen deutlichen Trich- Phänotyp aufwies (vgl. pTI-/- ICI und Rdr2 in Abb. 3.25).

Im Rahmen der hier dargestellten Ergebnisse konnte der Schluss gezogen werden, dass Rdr3 bei der Akkumulation der sekundären siRNAs eine Rolle spielt. Die Northernblot-Analyse aus Abbildung 3.26 zeigt deutlich, dass die detektierbaren Mengen an primären siRNAs, die mit der Vektor-Sonde detektiert werden, nicht von der Stilllegung von Rdr3 betroffen sind. Auch hier bleibt festzuhalten, dass es sich bei den mit der Vektor-Sonde detektierten siRNAs auf Grund der aufgezeigten Modifikation wahrscheinlich um Transgen-assoziierte siRNAs handelt und nicht um dsRNA-Feeding assoziierte (vgl. Marker *et al.*, 2010), obwohl diese Sonde beide Fraktionen detektiert.

Dagegen sind die *nd169*-spezifischen siRNAs, die ein Mischung aus primären und sekundären siRNAs darstellen, in ihrer detektierbaren Menge bei der Stilllegung von Rdr3 im Vergleich zur ICL-Kontrolle stark reduziert (vgl. Abb. 3.26). Dieser Effekt könnte darauf beruhen, dass die sekundären siRNAs im untersuchten *nd169*-Bereich durch die Stilllegung von Rdr3 wegfallen und somit nur die primären detektiert werden. Allerdings bleibt hier anzumerken, dass diese Schlussfolgerungen lediglich auf Grund der Northernblot-Analysen gezogen wurden. Es sind weitere Untersuchungen erforderlich um dies zu bestätigen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde keine Library von einer Rdr3-Stilllegung kloniert und ausgewertet.

Marker und Kollegen konnten für die RNA-abhängige RNA Polymerase Rdr2 und die Nukleotidyltransferase Cid2 bestätigen, dass sie sowohl in den Transgen-induzierten, als auch in den dsRNA-Feeding assoziierten RNAi-Mechanismus involviert sind (Marker *et al.*, 2014). Für Rdr2 und Cid2 konnte an Hand der in dieser Arbeit durchgeführten Northernblot-Analysen bestätigt werden, dass sie einen Effekt auf die Akkumulation der Transgen-induzierten siRNAs haben (vgl. Abb. 3.28 A). Beide Komponenten zeigten durch ihre Stilllegung einen beinahe Verlust der detektierbaren Bande der siRNAs (vgl. Abb. 3.28 A). Allerdings wurde dieser Northernblot nur mit der *nd169*-Sonde hybridisiert und zur detaillierteren Analyse des Einflusses dieser Komponenten auf primäre und sekundäre Transgen-induzierte siRNAs wurden die Tiefensequenzierungen herangezogen. Durch diese Analyse der Tiefensequenzierungen konnte klar gezeigt werden, dass sowohl Rdr2 als auch Cid2 einen Einfluss vor allem auf die sekundären siRNAs haben (vgl. Abb. 3.28 B und C). Hier waren vor allem die siRNAs in den Bereichen, die spezifisch für sekundäre Transgen-induzierte siRNAs sind, stark reduziert (vgl. Abb. 3.28 B, C und D 5' deletierter und 3' deletierter Bereich). Im Bereich des Genkörpers war dagegen die geringste Reduktion der Anzahl mappender Reads zu verzeichnen (vgl. Abb. 3.28 D). Dies lässt sich dadurch erklären, dass die im Genkörper detektierten siRNAs eine Mischung aus primären und sekundären siRNAs darstellen. Fallen die sekundären siRNAs in diesem Bereich weg, bleiben die primären siRNAs übrig und sind immernoch detektierbar. Dies führt zur Reduktion der Gesamtmenge in diesem Bereich.

Eine Abhängigkeit der sekundären siRNAs von einer RdRP wurde schon in vielen Organismen beschrieben. In *C. elegans* hängen die sekundären siRNAs von der RNA abhängigen RNA-Polymerase Rrf-1 ab (Aoki *et al.*, 2007; Moissiard *et al.*, 2007). Für *S. pombe* wurde beschrieben, dass Rdp1, ein RdRP-Homolog, für die Synthese der sekundären siRNAs verantwortlich ist (Simmer *et al.*, 2010; Moissiard *et al.*, 2007). In *Arabidopsis* konnte gezeigt werden, dass die sekundären siRNAs von der RNA abhängigen RNA-Polymerase RdR6 abhängen (Manavella *et al.*, 2011; Yoshikawa, 2013; Moissiard *et al.*, 2007). Auch in dieser Arbeit konnte für Rdr2 der stärkste Einfluss auf die sekundären siRNAs im Vergleich zu den weiteren getesteten Komponenten des RNAi-Mechanismus gezeigt werden (vgl. Abb. 3.28). Diese Klasse an sekundären siRNAs ist durch die Stilllegung von Rdr2 nahezu eliminiert. Es kann somit der Schluss gezogen werden, dass Rdr2 in die Synthese der sekundären Transgen-induzierten siRNAs in *Paramecium* involviert ist.

Bei Cid 2, dessen genaue Funktion jedoch noch unbekannt ist (Marker *et al.*, 2014), war der Einfluss auf die Menge der sekundären Transgen-induzierten siRNAs in *Paramecium* zwar deutlich, aber nicht

so stark wie bei Rdr2 (vgl. Abb. 3.28). Dies legt den Schluss nahe, dass Cid2 in die Stabilisierung der sekundären siRNAs involviert sein muss nicht aber in die Synthese.

Für *S. pombe* konnte gezeigt werden, dass die RNA abhängige RNA-Polymerase Rdr1 mit dem Cid-Homolog Cid12 und einer RNA-Helikase Hrr1 interagiert und einen Komplex, den RDRC („RNA-directed RNA Polymerase complex“) bildet (Motamedi *et al.*, 2004). Bei der Bildung dieses Komplexes ist Cid12 direkt beteiligt. Cid12 ist notwendig, damit Hrr1 mit dem Komplex assoziieren kann. Hrr1 wiederum ist für die Interaktion mit einem weiteren Komplex, dem RITS, verantwortlich. Nur wenn beide Komplexe interagieren, kann ein transkriptionelles Silencing des Zielgens stattfinden (Motamedi *et al.*, 2004). Rdr1 kann zwar auch ohne seine Partner einen Doppelstrang synthetisieren, jedoch wird dieser nur zu siRNAs prozessiert, wenn die anderen Komponenten daran beteiligt sind (Motamedi *et al.*, 2004).

Auch für *T. thermophila* wurde beschrieben, dass die RNA abhängige RNA-Polymerase Rdr1 mit einem Komplex assoziiert ist, der weitere vier Proteine beinhaltet. Zwei dieser vier Proteine, Rdn1 und Rdn2 genannt, weisen Ähnlichkeiten zu Ribonukleotidyltransferasen auf (Lee *et al.*, 2009). Beide Gene sind Paraloge zueinander und sind zu 39 % in ihrer kodierenden Sequenz identisch und in weiteren 24 % sehr ähnlich zu einander. Beide Nukleotidyltransferasen polyuridinylieren einzelsträngige RNA-Spezies *in vitro* (Lee *et al.*, 2009). Es konnte gezeigt werden, dass Rdr1 auch ohne die vier anderen Partner eine Polymerase-Aktivität aufweist, allerdings konnte auch nachgewiesen werden, dass das Vorhanden sein der Nukleotidyltransferasen begünstigend für die Akkumulation der siRNAs ist (Lee *et al.*, 2009). Es wird vermutet, dass das 3' Ende der RISC geschnittenen RNA, die Ziel der primären siRNAs war, durch eine Polyuridinylierung stabilisiert wird und somit leichter von der RdrP erkannt und als Template zur Generierung der dsRNA genutzt werden kann (Lee *et al.*, 2009).

In *C. elegans* wurde das Cid-Homolog Rde-3 entdeckt (Chen *et al.*, 2005). Es konnte gezeigt werden, dass Rde-3 die Akkumulation der siRNAs beeinflusst und eine Stilllegung dieses Proteins die Fertilität und Lebensfähigkeit der Tiere einschränkt (Chen *et al.*, 2005). Rdr-3 enthält eine konservierte Nukleotidyltransferase2-Domäne und gehört somit in die Superfamilie der β -Nukleotidyltransferasen (Chen *et al.*, 2005). Auch hier wurde der Effekt durch eine Rdr-3 vermittelte Stabilisierung des 3' Endes einer degradierten mRNA erklärt, die somit zugänglicher für die RNA abhängige RNA-Polymerase ist und dadurch als Template für die Synthese sekundärer siRNAs dient (Chen *et al.*, 2005).

Marker und Kollegen haben in ihrer Studie an *Paramecium* spekuliert, dass die RNA abhängige RNA-Polymerase Rdr2 und das Cid2 auch direkt interagieren und so einen RDRC-Komplex bilden (Marker *et al.*, 2014). Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse belegen, dass sowohl Rdr2, als auch Cid2 in die Akkumulation vor allem der sekundären Transgen-induzierten siRNAs involviert sind. Zudem zeigen beide einen starken phänotypischen Effekt (vgl. Abb. 3.25). Es liegt somit der Schluss nahe, dass Cid2 und Rdr2 möglicherweise interagieren um die Synthese der sekundären Transgen-induzierten siRNAs zu vermitteln. Es wäre denkbar, dass Cid2 die mRNA, die das Ziel der primären siRNAs war, durch das Anhängen von bestimmten Nukleotiden stabilisiert und somit für Rdr2 das Signal gibt daraus das Template für die sekundären siRNAs zu generieren. Dies müsste jedoch mit weiteren Versuchen erst noch bestätigt werden.

Zusammenfassend lässt sich jedoch sagen, dass die RNA abhängige RNA-Polymerase Rdr2 und die Nukleotidyltransferase Cid2 in die Akkumulation der sekundären Transgen-induzierten siRNAs involviert sind. Dabei liegt der Schluss nahe, dass Rdr2 sogar in die Synthese der sekundären siRNAs involviert ist. Zudem hat es den Anschein, dass Rdr2 und Cid2 zu einem Komplex assoziieren.

4.5: Möglicher Ablauf des Transgen-induzierten RNAi-Mechanismus in *Paramecium*

Aus den in dieser Arbeit erstellten Ergebnissen kann nun ein detaillierterer Ablauf des Transgen-induzierten RNAi-Mechanismus gezeichnet werden, wie er in Abbildung 4.1 schematisch dargestellt ist. Das injizierte pTI- Transgen wird in ein aberrantes Transkript des am 3' Ende verkürzten *nd169*-Gens umgeschrieben, das zu einem Doppelstrang umgesetzt wird. Der genaue Mechanismus hierfür ist jedoch noch unklar. Dieser Doppelstrang wird zu primären siRNAs prozessiert. Diese werden von Hen1 methyliert und in ein Ptiwi geladen. In welches Ptiwi konnte nicht eindeutig geklärt werden, aber Ptiwi 14 ist hierfür der wahrscheinlichste Kandidat. Da die siRNAs komplementär zur kodierenden Sequenz des *nd169*-Gens sind, können sie nicht nur das aberrante Transkript des Transgens *in cis* zur Degradation markieren, sie passen auch auf die transkribierte mRNA des endogenen *nd169*-Gens *in trans*. Die so markierte mRNA wird von Rdr2 zusammen mit Cid2 entweder als Template genutzt um einen Doppelstrang zu synthetisieren, der zu sekundären siRNA prozessiert wird. Oder die sekundären siRNAs werden von Rdr2 in Kooperation mit Cid2 *de novo* von der mRNA transkribiert. Auch diese sekundären siRNAs werden von Hen1 methyliert und anschließend wahrscheinlich an Ptiwi 13 gebunden und erneut in den Kreislauf eingebracht.

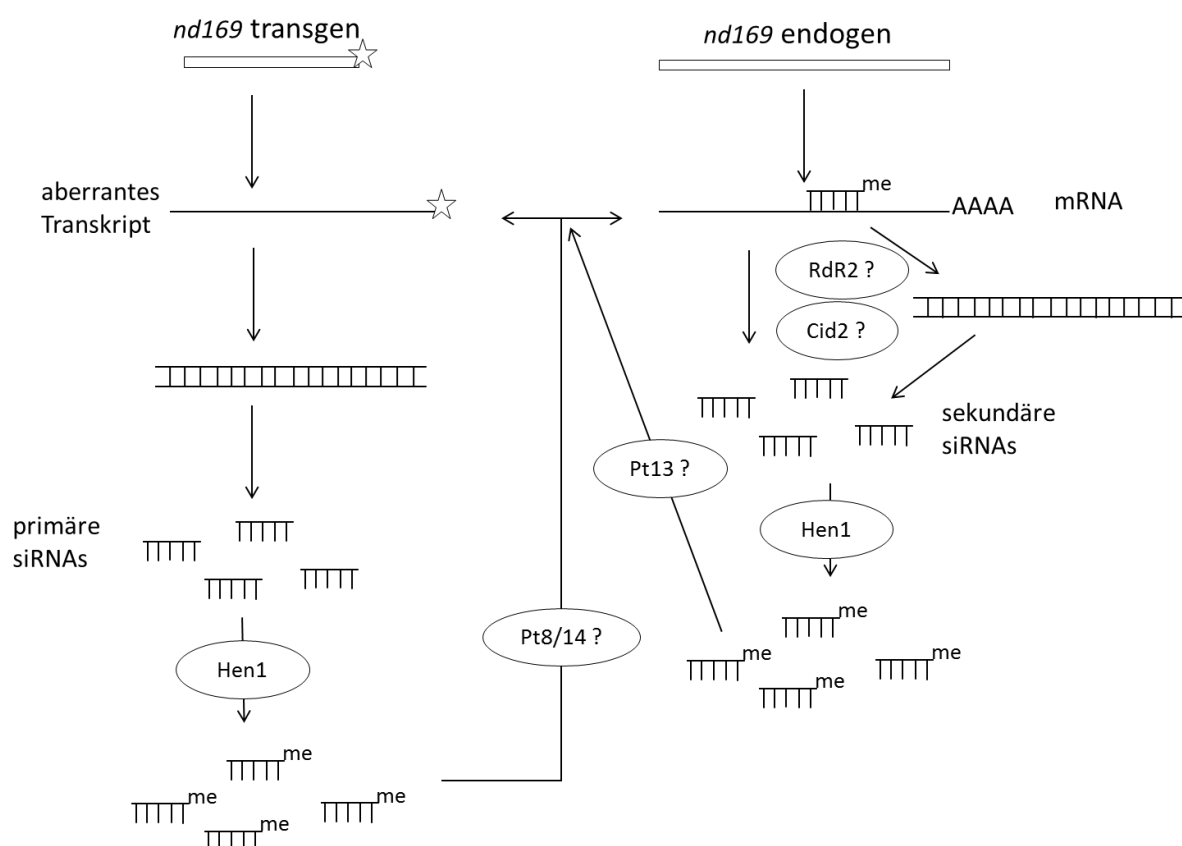


Abbildung 4.1: Schematische Darstellung des Transgen-induzierten RNAi-Mechanismus mit den in dieser Arbeit untersuchten Komponenten. Die verkürzte Version des *nd169*-Gens auf dem Transgen (Rechteck mit Stern) liefert ein aberrantes Transkript, welches zu einem Doppelstrang umgesetzt wird und dadurch zum Auslöser des RNAi-Mechanismus wird. Dieser Doppelstrang wird zu primären siRNAs prozessiert, welche von Hen1 methyliert werden. Diese primären siRNAs werden an eines der Ptiwis 8 oder 14 gebunden und vermitteln die Degradation des aberranten Transkriptes *in cis* und der homologen vom endogenen *nd169*-Gen transkribierten mRNA *in trans*. Die Markierung der mRNA rekrutiert Rdr2 und Cid2. Diese generieren die sekundären siRNAs entweder *de novo* von der mRNA oder synthetisieren zunächst einen Doppelstrang aus der mRNA, der dann zu sekundären siRNAs prozessiert wird. Die sekundären siRNAs werden im Anschluss ebenfalls von Hen1 methyliert an das Ptiwi 13 gebunden und erneut in den Kreislauf eingespeist.

5. Zusammenfassung

Für alle Organismen ist es wichtig, sich gegen das Eindringen exogener DNA bzw. RNA wie z.B. Viren oder transposablen Elementen zur Wehr zu setzen um die Integrität ihres eigenen Genoms zu bewahren. Zudem müssen innerhalb eines Organismus oft ganze Genfamilien reguliert werden. Die RNA-Interferenz stellt ein optimales Mittel sowohl für die Abwehr exogener Nukleinsäuren, als auch für die Regulierung endogener Gene dazu bereit. Das Herzstück der RNAi stellen kleine regulatorische siRNAs dar, die Homologie-abhängig Reaktionen in einer Zelle hervorrufen können, wie z.B. das transkriptionelle oder das posttranskriptionelle Silencing. Bei dem Mechanismus der RNAi sind zudem mehrere Komponenten beteiligt um diese siRNAs zu synthetisieren, zu stabilisieren und zu ihrem Zielort zu bringen um dort das Silencing zu vermitteln. Dabei spielen die Enzyme Dicer und RNA abhängige RNA-Polymerasen eine wichtige Rolle in der Synthese. Argonauten, bzw. eine Unterklasse von ihnen, die Piwi-Proteine sind für das eigentliche Silencing des Zielgens wichtig und spielen, wie auch die 2'-O-Methyltransferase Hen1, eine Rolle in der Stabilisierung der siRNAs.

In *Paramecium tetraurelia* weiß man, dass endogene Genfamilien, wie z.B. die Oberflächen-Antigene RNAi-vermittelt reguliert werden. Zudem ist bekannt, dass man RNAi-Mechanismen, die diesem endogenen Mechanismus ähneln, artifiziell durch das Einbringen einer doppelsträngigen RNA induzieren kann. Dies kann entweder durch das Verfüttern von Bakterien geschehen, die zur Synthese einer dsRNA in ihrem Inneren veranlasst werden und diese anreichern, oder durch die Injektion eines Transgens in den Makronukleus, dessen Transkript ebenfalls zu einer dsRNA umgesetzt wird.

Der Fokus dieser Arbeit lag auf dem exogenen, durch ein injiziertes Transgen induzierten RNAi-Mechanismus in *Paramecium tetraurelia* und dessen genauere Charakterisierung. Dabei konnte gezeigt werden, dass dieser RNAi-Mechanismus eine Temperaturabhängigkeit aufweist, wie es auch für RNAi-Mechanismen in anderen Organismen beschrieben wurde. Im Rahmen dieser Arbeit konnte jedoch die Ursache diese Temperaturabhängigkeit nicht aufgeklärt werden.

Dafür konnte gezeigt werden, dass zwei Klassen an siRNAs an diesem Mechanismus beteiligt sind. Es konnten neben den schon in der Literatur beschriebenen primären siRNAs auch sekundäre siRNAs nachgewiesen werden, deren Synthese von einer RdRP abhängig ist. Im Rahmen dieser Arbeit konnte der Schluss gezogen werden, dass diese RdRP, die für die Synthese der sekundären siRNAs verantwortlich ist, das Homolog Rdr2 ist. Weiter konnte gezeigt werden, dass diese sekundären siRNAs Transitivität induzieren. Dies beschreibt die Amplifikation der siRNAs über das Ausgangsmolekül hinaus. Es konnte dargestellt werden, dass die sekundären siRNAs nicht von dem ursprünglichen Transgen synthetisiert, sondern vielmehr von einem homologen endogenen Transkript, einer mRNA, entstammen und somit als transitiv angesehen werden können.

Ferner konnte gezeigt werden, dass die Nukleotidyltransferase Cid2 ebenfalls in die Akkumulation dieser sekundären siRNAs involviert ist. Es konnte der Schluss gezogen werden, dass dieses Cid2 in einem Komplex mit Rdr2 vorliegt und das Template zur Generierung der sekundären siRNAs stabilisiert und so für Rdr2 zugänglich macht.

Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit war die detailliertere Untersuchung der spezifischen Stabilisierung beider siRNA-Klassen. Dabei konnte gezeigt werden, dass mehrere Piwi-Proteine in den Transgen-induzierten Mechanismus involviert sind. Die *Paramecium* spezifischen Piwis Ptiwi 8, Ptiwi 13 und Ptiwi 14 spielen dabei eine Rolle. Im Rahmen der durchgeführten Analysen konnte gezeigt

werden, dass die Ptiwis 8 und 14 in die Akkumulation und damit in die Stabilisierung beider siRNA-Klassen involviert sind. Allerdings scheint dieser Effekt eher auf dem Ptiwi14 zu beruhen. Für das Ptiwi 13 konnte vermutet werden, dass dieses eher in die Akkumulation und spezifischen Stabilisierung der sekundären siRNAs involviert ist. Auch konnte aufgezeigt werden, dass beide Klassen an Transgen-induzierten siRNAs eine Methylgruppe an ihrem 3' Ende tragen, welche von der 2'-O-Methyltransferase Hen1 abhängig ist und ebenfalls der Stabilisierung der siRNAs dient. Zudem konnte vermutet werden, dass diese Methylierung bereits vor dem Binden der siRNAs an eines der Ptiwis stattfindet und davon unabhängig ist. Somit konnten Rückschlüsse auf den zeitlichen Verlauf des Transgen-induzierten RNAi-Mechanismus gezogen werden.

Über eine Lokalisation dieses Hen1-Proteins konnte ferner gezeigt werden, dass dieses Protein in bzw. an den mit der Keimbahn assoziierten Mikronuklei und dem vegetativen Makronukleus aufzufinden ist. Die Methylierung der siRNAs findet somit in den Kernen statt. Dies lässt den Schluss zu, dass der Transgen-induzierte RNAi-Mechanismus neben der posttranskriptionellen Regulation auch eine transkriptionelle Genregulation direkt am Chromatin vermitteln kann.

6. Abkürzungsverzeichnis

Ago	Argonauten-Protein
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxisulfat
BSA	bovine serum albumin
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
Dcr	Dicer
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dsRNA	Doppelstrang RNA
Eppi	Eppendorf Reaktionsgefäß
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
Kan	Kanamycin
MAC	Makronukleus
MCS	Multiple cloning site
MIC	Mikronukleus
miRNA	microRNA
mRNA	messenger RNA
OD	optische Dichte
ORF	Open reading frame
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerase-chain-reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PFA	Paraformaldehyd
piRNA	Piwi interacting RNA
PIS	Präimmunsereum
PIWI	Piwi-Protein
PTGS	post-transkriptionelles Gen silencing
RDRC	RNA dependant RNA-Polymerase complex
RdRP	RNA-abhängige RNA Polymerase
RISC	RNA induced silencing complex
RITS	RNA induced transcriptional silencing complex
RNAi	RNA-Interferenz
rpm	rounds per minute
SAg	surface antigen (Oberflächen Antigen)
SDS	Sodium-Dodecylsulfat
ssRNA	Einzelstrang RNA
siRNA	short interfering RNA
tasiRNA	Teomere associated short interfering RNAs
TBS	tris buffered saline
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tet	Tetracyclin
TGS	transkriptionelles Gen silencing
ÜN	über Nacht
UTR	Untranslated Region, Bereich der Signalsequenzen einer mRNA
WGD	whole genome duplication
WGP	wheat grass powder (Weizengras Pulver)

7. Literaturverzeichnis

Aoki K, Moriguchi H, Yoshioka T, Okawa K, Tabara H.: In vitro analyses of the production and activity of secondary small interfering RNAs in *C. elegans*. (EMBO J. 2007 Dec 12;26(24):5007-19.)

Aravin AA, Sachidanandam R, Bourc'his D, Schaefer C, Pezic D, Toth KF, Bestor T, Hannon GJ.: A piRNA pathway primed by individual transposons is linked to de novo DNA methylation in mice. (Mol Cell. 2008 Sep 26;31(6):785-99.)

Aury JM, Jaillon O, Duret L, Noel B, Jubin C, Porcel BM, Ségurens B, Daubin V, Anthouard V, Aiach N, Arnaiz O, Billaut A, Beisson J, Blanc I, Bouhouche K, Câmara F, Duharcourt S, Guigo R, Gogendeau D, Katinka M, Keller AM, Kissmehl R, Klotz C, Koll F, Le Mouël A, Lepère G, Malinsky S, Nowacki M, Nowak JK, Plattner H, Poulain J, Ruiz F, Serrano V, Zagulski M, Dessen P, Bétermier M, Weissenbach J, Scarpelli C, Schächter V, Sperling L, Meyer E, Cohen J, Wincker P.: Global trends of whole-genome duplications revealed by the ciliate *Paramecium tetraurelia*. (Nature. 2006 Nov 9;444(7116):171-8.)

Baulcombe DC.: Molecular biology. Amplified silencing. (Science. 2007 Jan 12;315(5809):199-200.)

Beale GH: The Genetics of *Paramecium aurelia*. (Cambridge university press 1954).

Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ.: Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. (Nature. 2001 Jan 18;409(6818):363-6.)

Billi AC, Alessi AF, Khivansara V, Han T, Freeberg M, Mitani S, Kim JK.: The *Caenorhabditis elegans* HEN1 ortholog, HENN-1, methylates and stabilizes select subclasses of germline small RNAs. (PLoS Genet. 2012;8(4):e1002617.)

Bouhouche K, Gout J.-F, Kapusta A, Bétermier M and Meyer E.: Functional specialization of Piwi proteins in *Paramecium tetraurelia* from post-transcriptional gene silencing to genome remodeling. (Nucl. Acids Res. (2011) 39 (10): 4249-4264.)

Brennecke J, Aravin A., Stark A., Dus M., Kellis M., Sachidanandam R., Hannon G.: Discrete Small RNA-Generating Loci as Master Regulators of Transposon Activity in *Drosophila*. (Cell. 2007 Jan;043; 10.1016)

Buck AH, Blaxter M.: Functional diversification of Argonautes in nematodes: an expanding universe. (Biochem Soc Trans. 2013 Aug;41(4):881-6.)

Bühler M, Verdel A, Moazed D.: Tethering RITS to a nascent transcript initiates RNAi- and heterochromatin-dependent gene silencing. (Cell. 2006 Jun 2;125(5):873-86.)

Carradec Q, Götz U, Arnaiz O, Pouch J, Simon M, Meyer E, Marker S: Primary and secondary siRNA synthesis triggered by RNAs from food bacteria in the ciliate *Paramecium tetraurelia*. (Nucleic Acids Res. 2015 Feb 18;43(3):1818-33)

Chellappan P, Vanitharani R, Ogbe F, Fauquet CM.: Effect of temperature on geminivirus-induced RNA silencing in plants. (Plant Physiol. 2005 Aug;138(4):1828-41.)

Chen X, Liu J, Cheng Y, Jia D.: HEN1 functions pleiotropically in *Arabidopsis* development and acts in C function in the flower. (Development. 2002 Mar;129(5):1085-94.)

Chen X.: A microRNA as a translational repressor of APETALA2 in *Arabidopsis* flower development. (Science. 2004 Mar 26;303(5666):2022-5.)

Chen CC, Simard MJ, Tabara H, Brownell DR, McCollough JA, Mello CC.: A member of the polymerase beta nucleotidyltransferase superfamily is required for RNA interference in *C. elegans*. (Curr Biol. 2005 Feb 22;15(4):378-83.)

Chen HM, Chen LT, Patel K, Li YH, Baulcombe DC, Wu SH.: 22-Nucleotide RNAs trigger secondary siRNA biogenesis in plants. (Proc Natl Acad Sci U S A. 2010 Aug 24;107(34):15269-74.)

Cho YB, Jones SI, Vodkin L.: The transition from primary siRNAs to amplified secondary siRNAs that regulate chalcone synthase during development of *Glycine max* seed coats. (PLoS One. 2013 Oct 21;8(10):e76954.)

Cossins A.R., Bowler K.: Temperature Biology of Animals. (Chapman & Hall 1987, New York)

Cuperus JT, Carbonell A, Fahlgren N, Garcia-Ruiz H, Burke RT, Takeda A, Sullivan CM, Gilbert SD, Montgomery TA, Carrington JC.: Unique functionality of 22-nt miRNAs in triggering RDR6-dependent siRNA biogenesis from target transcripts in *Arabidopsis*. (Nat Struct Mol Biol. 2010 Aug;17(8):997-1003.)

Couvillion MT, Lee SR, Hogstad B, Malone CD, Tonkin LA, Sachidanandam R, Hannon GJ, Collins K.: Sequence, biogenesis, and function of diverse small RNA classes bound to the Piwi family proteins of *Tetrahymena thermophila*. (Genes Dev. 2009 Sep 1;23(17):2016-32.)

Dalmay T, Hamilton A, Rudd S, Angell S, Baulcombe DC.: An RNA-dependent RNA polymerase gene in *Arabidopsis* is required for posttranscriptional gene silencing mediated by a transgene but not by a virus. (Cell. 2000 May 26;101(5):543-53.)

Dillies MA, Rau A, Aubert J, Hennequet-Antier C, Jeanmougin M, Servant N, Keime C, Marot G, Castel D, Estelle J, Guernec G, Jagla B, Jouneau L, Laloë D, Le Gall C, Schaëffer B, Le Crom S, Guedj M, Jaffrézic F; French StatOmique Consortium: A comprehensive evaluation of normalization methods for Illumina high-throughput RNA sequencing data analysis. (Brief Bioinform. 2013 Nov;14(6):671-83.)

Doench JG, Sharp PA.: Specificity of microRNA target selection in translational repression. (Genes Dev. 2004 Mar 1;18(5):504-11.)

Dunoyer P, Schott G, Himber C, Meyer D, Takeda A, Carrington JC, Voinnet O.: Small RNA duplexes function as mobile silencing signals between plant cells. (Science. 2010 May 14;328(5980):912-6.)

Elbashir SM, Lendeckel W, Tuschl T.: RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. (Genes Dev. 2001 Jan 15;15(2):188-200.)

Elgin SC, Grewal SI.: Heterochromatin: silence is golden. (Curr Biol. 2003 Dec 2;13(23):R895-8.)

- Faehnle Christopher R. and Leemor Joshua-Tor: Argonautes confront new small RNAs. (Curr Opin Chem Biol. 2007 October; 11(5): 569–577.)
- Feinberg EH, Hunter CP.: Transport of dsRNA into cells by the transmembrane protein SID-1. (Science. 2003 Sep 12;301(5639):1545-7.)
- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC.: Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. (Nature. 1998 Feb 19;391(6669):806-11)
- Fortier E, Belote JM. : Temperature-dependent gene silencing by an expressed inverted repeat in *Drosophila*. (Genesis. 2000 Apr;26(4):240-4.)
- Finn Robert D., Bateman Alex, Clements Jody, Coggill Penelope, Eberhardt Ruth Y., Eddy Sean R., Heger Andreas, Hetherington Kirstie, Holm Liisa, Mistry Jaina, Sonnhammer Erik L. L., Tate John and Punta Marco.: Pfam: the protein families database (Nucl. Acids Res. (1 January 2014) 42 (D1): D222-D230.)
- Forney JD, Blackburn EH.: Developmentally controlled telomere addition in wild-type and mutant paramecia. (Mol Cell Biol. 1988 Jan;8(1):251-8.)
- Froissard M, Keller AM, Dedieu JC, Cohen J.: Novel secretory vesicle proteins essential for membrane fusion display extracellular-matrix domains. (Traffic. 2004 Jul;5(7):493-502.)
- Fukagawa T, Nogami M, Yoshikawa M, Ikeno M, Okazaki T, Takami Y, Nakayama T, Oshimura M.: Dicer is essential for formation of the heterochromatin structure in vertebrate cells. (Nat Cell Biol. 2004 Aug;6(8):784-91. Epub 2004 Jul 11.)
- Galvani A, Sperling L.: Transgene-mediated post-transcriptional gene silencing is inhibited by 3' non-coding sequences in *Paramecium*. (Nucleic Acids Res. 2001 Nov 1;29(21):4387-94.)
- Galvani A, Sperling L.: RNA interference by feeding in *Paramecium*. (Trends Genet. 2002 Jan;18(1):11-2.)
- Garnier O, Serrano V, Duharcourt S, Meyer E.: RNA-mediated programming of developmental genome rearrangements in *Paramecium tetraurelia*. (Mol Cell Biol. 2004 Sep;24(17):7370-9.)
- Gilley D, Preer J R, Jr, Aufderheide K J, and Polisky B: Autonomous replication and addition of telomere-like sequences to DNA microinjected into *Paramecium tetraurelia* macronuclei. (Mol Cell Biol. Nov 1988; 8(11): 4765–4772.)
- Girard A, Hannon GJ.: Conserved themes in small-RNA-mediated transposon control. (Trends Cell Biol. 2008 Mar;18(3):136-48.)
- Godiska R, Aufderheide KJ, Gilley D, Hendrie P, Fitzwater T, Preer LB, Polisky B, Preer JR Jr.: Transformation of *Paramecium* by microinjection of a cloned serotype gene. (Proc Natl Acad Sci U S A. 1987 Nov;84(21):7590-4.)
- Griesbach R J., Beck R M., Hammond J.: Gene Expression in the Star Mutation of *Petunia hybrida* Vilm. (J. AMER. SOC. HORT. SCI. 132(5):680–690. 2007.)

Guang S, Bochner AF, Pavelec DM, Burkhart KB, Harding S, Lachowiec J, Kennedy S.: An Argonaute transports siRNAs from the cytoplasm to the nucleus. (Science. 2008 Jul 25;321(5888):537-41.)

Gunawardane LS, Saito K, Nishida KM, Miyoshi K, Kawamura Y, Nagami T, Siomi H, Siomi MC.: A slicer-mediated mechanism for repeat-associated siRNA 5' end formation in *Drosophila*. (Science. 2007 Mar 16;315(5818):1587-90.)

Hall TA: BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT/XP/Vista/7 (version 7.2.5, Nucl. Acids. Symp., 1999.)

Hall IM, Shankaranarayana GD, Noma K, Ayoub N, Cohen A, Grewal SI.: Establishment and maintenance of a heterochromatin domain. (Science. 2002 Sep 27;297(5590):2232-7.)

Horwich MD, Li C, Matranga C, Vagin V, Farley G, Wang P, Zamore PD.: The *Drosophila* RNA methyltransferase, DmHen1, modifies germline piRNAs and single-stranded siRNAs in RISC. (Curr Biol. 2007 Jul 17;17(14):1265-72.)

Höck Julia and Meister Gunter: The Argonaute protein family (Genome Biol. 2008; 9(2): 210)

Huang Y, Ji L, Huang Q, Vassilyev DG, Chen X, Ma JB.: Structural insights into mechanisms of the small RNA methyltransferase HEN1. (Nature. 2009 Oct 8;461(7265):823-7.)

Huang RH.: Unique 2'-O-methylation by Hen1 in eukaryotic RNA interference and bacterial RNA repair. (Biochemistry. 2012 May 22;51(20):4087-95.)

Hunter C, Sun H, Poethig RS.: The *Arabidopsis* heterochronic gene ZIPPY is an ARGONAUTE family member. (Curr Biol. 2003 Sep 30;13(19):1734-9.)

Ji L, Chen X.: Regulation of small RNA stability: methylation and beyond. (Cell Res. 2012 Apr;22(4):624-36.)

Kamath RS, Martinez-Campos M, Zipperlen P, Fraser AG, Ahringer J.: Effectiveness of specific RNA-mediated interference through ingested double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. (Genome Biol. 2001;2(1))

Kameda T, Ikegami K, Liu Y, Terada K, Sugiyama T.: A hypothermic-temperature-sensitive gene silencing by the mammalian RNAi. (Biochem Biophys Res Commun. 2004 Mar 12;315(3):599-602.)

Kasai A, Ohnishi S, Yamazaki H, Funatsuki H, Kurauchi T, Matsumoto T, Yumoto S, Senda M.: Molecular mechanism of seed coat discoloration induced by low temperature in yellow soybean. (Plant Cell Physiol. 2009 Jun;50(6):1090-8.)

Kawamata T, Tomari Y.: Making RISC. (Trends Biochem Sci. 2010 Jul;35(7):368-76.)

Käfer V.: Epigenetische Regulierung der Antigenvariation in *Paramecium tetraurelia*. (2012. Masterarbeit Fachbereich Biologie, technische Universität Kaiserslautern)

Kennerdell JR, Carthew RW.: Heritable gene silencing in *Drosophila* using double-stranded RNA. (Nat Biotechnol. 2000 Aug;18(8):896-8.)

Khvorova A, Reynolds A, Jayasena SD.: Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. (Cell. 2003 Oct 17;115(2):209-16.)

Kirino Y, Mourelatos Z. (a): The mouse homolog of HEN1 is a potential methylase for Piwi-interacting RNAs. (RNA. 2007 Sep;13(9):1397-401.)

Kirino Y, Mourelatos Z. (b): 2'-O-methyl modification in mouse piRNAs and its methylase. (Nucleic Acids Symp Ser (Oxf). 2007;(51):417-8.)

Kirino Y, Mourelatos Z. (c): Mouse Piwi-interacting RNAs are 2'-O-methylated at their 3' termini. (Nat Struct Mol Biol. 2007 Apr;14(4):347-8.)

Knoll G, Haacke-Bell B, Plattner H.: Local trichocyst exocytosis provides an efficient escape mechanism for *Paramecium* cells. (Eur J Protistol. 1991 Nov 29;27(4):381-5.)

Kouzarides T.: Chromatin modifications and their function. (Cell. 2007 Feb 23;128(4):693-705.)

Kuramochi-Miyagawa S, Watanabe T, Gotoh K, Totoki Y, Toyoda A, Ikawa M, Asada N, Kojima K, Yamaguchi Y, Ijiri TW, Hata K, Li E, Matsuda Y, Kimura T, Okabe M, Sakaki Y, Sasaki H, Nakano T.: DNA methylation of retrotransposon genes is regulated by Piwi family members MILI and MIWI2 in murine fetal testes. (Genes Dev. 2008 Apr 1;22(7):908-17.)

Kurth HM, Mochizuki K.: 2'-O-methylation stabilizes Piwi-associated small RNAs and ensures DNA elimination in *Tetrahymena*. (RNA. 2009 Apr;15(4):675-85.)

Langmead B, Salzberg SL. :Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. (Nat Methods. 2012 Mar 4;9(4):357-9.)

Lauenstein C.: Einfluss der Dicer-Homologe auf die Regulation der Expression der Oberflächenantigene in *Paramecium tetraurelia*. (2012. Masterarbeit Fachbereich Biologie, technische Universität Kaiserslautern)

Lee SR, Talsky KB, Collins K.: A single RNA-dependent RNA polymerase assembles with mutually exclusive nucleotidyl transferase subunits to direct different pathways of small RNA biogenesis. (RNA. 2009 Jul;15(7):1363-74.)

Lepère G, Nowacki M, Serrano V, Gout JF, Guglielmi G, Duharcourt S, Meyer E.: Silencing-associated and meiosis-specific small RNA pathways in *Paramecium tetraurelia*. (Nucleic Acids Res. 2009 Feb;37(3):903-15.)

Le Thomas A, Rogers AK, Webster A, Marinov GK, Liao SE, Perkins EM, Hur JK, Aravin AA, Tóth KF.: Piwi induces piRNA-guided transcriptional silencing and establishment of a repressive chromatin state. (Genes Dev. 2013 Feb 15;27(4):390-9.)

Li J, Yang Z, Yu B, Liu J, Chen X.: Methylation protects miRNAs and siRNAs from a 3'-end uridylation activity in *Arabidopsis*. (Curr Biol. 2005 Aug 23;15(16):1501-7)

Liang D, White RG, Waterhouse PM.: Gene silencing in *Arabidopsis* spreads from the root to the shoot, through a gating barrier, by template-dependent, nonvascular, cell-to-cell movement. (Plant Physiol. 2012 Jul;159(3):984-1000.)

- Liu Y, Taverna SD, Muratore TL, Shabanowitz J, Hunt DF, Allis CD.: RNAi-dependent H3K27 methylation is required for heterochromatin formation and DNA elimination in *Tetrahymena*. (Genes Dev. 2007 Jun 15;21(12):1530-45.)
- Llave C, Xie Z, Kasschau KD, Carrington JC.: Cleavage of Scarecrow-like mRNA targets directed by a class of *Arabidopsis* miRNA. (Science. 2002 Sep 20;297(5589):2053-6.)
- Manavella PA, Koenig D, Weigel D.: Plant secondary siRNA production determined by microRNA-duplex structure. (Proc Natl Acad Sci U S A. 2012 Feb 14;109(7):2461-6.)
- Marker S.: Molekulare Charakterisierung von exogen und endogen getriggerten RNAi-Mechanismen und deren Involvierung in die endogene Genexpression bei *Paramecium tetraurelia* (2009. Dissertation Fachbereich Biologie, technische Universität Kaiserslautern)
- Marker S, Le Mouël A, Meyer E, Simon M.: Distinct RNA-dependent RNA polymerases are required for RNAi triggered by double-stranded RNA versus truncated transgenes in *Paramecium tetraurelia*. (Nucleic Acids Res. 2010 Jul;38(12):4092-107.)
- Marker S, Carradec Q, Tanty V, Arnaiz O, Meyer E.: A forward genetic screen reveals essential and non-essential RNAi factors in *Paramecium tetraurelia*. (Nucleic Acids Res. 2014 May 23.pii: gku223)
- Meister G, Tuschl T.: Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. (Nature. 2004 Sep 16;431(7006):343-9.)
- Mello CC, Conte D Jr.: Revealing the world of RNA interference. (Nature. 2004 Sep 16;431(7006):338-42.)
- Mochizuki K, Fine NA, Fujisawa T, Gorovsky MA.: Analysis of a piwi-related gene implicates small RNAs in genome rearrangement in *Tetrahymena*. (Cell. 2002 Sep 20;110(6):689-99.)
- Mochizuki K, Kurth HM.: Loading and pre-loading processes generate a distinct siRNA population in *Tetrahymena*. (Biochem Biophys Res Commun. 2013 Jul 5;436(3):497-502.)
- Moissiard G, Parizotto EA, Humber C, Voinnet O.: Transitivity in *Arabidopsis* can be primed, requires the redundant action of the antiviral Dicer-like 4 and Dicer-like 2, and is compromised by viral-encoded suppressor proteins. (RNA. 2007 Aug;13(8):1268-78.)
- Molnar A, Melnyk CW, Bassett A, Hardcastle TJ, Dunn R, Baulcombe DC.: Small silencing RNAs in plants are mobile and direct epigenetic modification in recipient cells. (Science. 2010 May 14;328(5980):872-5.)
- Montgomery TA, Rim YS, Zhang C, Downen RH, Phillips CM, Fischer SE, Ruvkun G.: PIWI associated siRNAs and piRNAs specifically require the *Caenorhabditis elegans* HEN1 ortholog henn-1. (PLoS Genet. 2012;8(4):e1002616.)
- Motamedi MR, Verdel A, Colmenares SU, Gerber SA, Gygi SP, Moazed D.: Two RNAi complexes, RITS and RDRC, physically interact and localize to noncoding centromeric RNAs. (Cell. 2004 Dec 17;119(6):789-802.)

Mui Chan C, Zhou C, Brunzelle JS, Huang RH.: Structural and biochemical insights into 2'-O-methylation at the 3'-terminal nucleotide of RNA by Hen1. (Proc Natl Acad Sci USA. 2009 Oct 20;106(42):17699-704.)

Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H.: Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. (Cold Spring Harb Symp Quant Biol. 1986;51 Pt 1:263-73.)

Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R.: Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. (Plant Cell. 1990 Apr;2(4):279-289)

Naqvi AR, Islam MN, Choudhury NR, Haq QM.: The fascinating world of RNA interference. (Int J Biol Sci. 2009;5(2):97-117.)

NCBI Resource Coordinators: Abigail Acland, Richa Agarwala, Tanya Barrett, Jeff Beck, Dennis A. Benson, Colleen Bollin, Evan Bolton, Stephen H. Bryant, Kathi Canese, Deanna M. Church, Karen Clark, Michael DiCuccio, Ilya Dondoshansky, Scott Federhen, Michael Feolo, Lewis Y. Geer, Viatcheslav Gorelenkov, Marilu Hoepfner, Mark Johnson, Christopher Kelly, Viatcheslav Khotomlianski, Avi Kimchi, Michael Kimelman, Paul Kitts, Sergey Krasnov, Anatoliy Kuznetsov, David Landsman, David J. Lipman, Zhiyong Lu, Thomas L. Madden, Tom Madej, Donna R. Maglott, Aron Marchler-Bauer, Ilene Karsch-Mizrachi, Terence Murphy, James Ostell, Christopher O'Sullivan, Anna Panchenko, Lon Phan, Don Preuss, Kim D. Pruitt, Wendy Rubinstein, Eric W. Sayers, Valerie Schneider, Gregory D. Schuler, Edwin Sequeira, Stephen T. Sherry, Martin Shumway, Karl Sirotkin, Karanjit Siyan, Douglas Slotta, Alexandra Soboleva, Vladimir Sousof, Grigory Starchenko, Tatiana A. Tatusova, Bart W. Trawick, Denis Vakarov, Yanli Wang, Minghong Ward, W. John Wilbur, Eugene Yaschenko, Kerry Zbiec: Database resources of the National Center for Biotechnology Information (Nucleic Acids Res. 2014 January; 42(D1): D7–D17.)

Noto T, Kurth HM, Kataoka K, Aronica L, DeSouza LV, Siu KW, Pearlman RE, Gorovsky MA, Mochizuki K.: The *Tetrahymena* argonaute-binding protein Giw1p directs a mature argonaute-siRNA complex to the nucleus. (Cell. 2010 Mar 5;140(5):692-703.)

Olsen PH, Ambros V.: The lin-4 regulatory RNA controls developmental timing in *Caenorhabditis elegans* by blocking LIN-14 protein synthesis after the initiation of translation. (Dev Biol. 1999 Dec 15;216(2):671-80.)

Orij H, Mochii M, Watanabe K.: A simple "soaking method" for RNA interference in the planarian *Dugesia japonica*. (Dev Genes Evol. 2003 Apr;213(3):138-41. Epub 2003 Mar 12.)

Paddison PJ, Caudy AA, Bernstein E, Hannon GJ, Conklin DS.: Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells. (Genes Dev. 2002 Apr 15;16(8):948-58.)

Pfaffl MW.: A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. (Nucleic Acids Res. 2001 May 1;29(9))

Prescott DM.: The DNA of ciliated protozoa. (Microbiol Rev. 1994 Jun;58(2):233-67.)

Romon M., Soustre-Gacougnolle I., Schmitt C., Perrin M., Burdloff Y., Chevalier E., Mutterer J., Himber C., Zervudacki J., Montavon T., Zimmermann A., Elmayan T., Vaucheret H., Dunoyer P., and

Masson Jean E.: RNA Silencing Is Resistant to Low-Temperature in Grapevine. (PLoS One. 2013; 8(12): e82652.)

Rozhkov NV, Hammell M, Hannon GJ.: Multiple roles for Piwi in silencing *Drosophila* transposons. (Genes Dev. 2013 Feb 15;27(4):400-12.)

Ruiz F, Vayssié L, Klotz C, Sperling L, Madeddu L.: Homology-dependent gene silencing in *Paramecium*. (Mol Biol Cell. 1998 Apr;9(4):931-43.)

Saito K, Sakaguchi Y, Suzuki T, Suzuki T, Siomi H, Siomi MC.: Pimet, the *Drosophila* homolog of HEN1, mediates 2'-O-methylation of Piwi- interacting RNAs at their 3' ends. (Genes Dev. 2007 Jul 1;21(13):1603-8.)

Saito K.: The epigenetic regulation of transposable elements by PIWI-interacting RNAs in *Drosophila*. (Genes Genet Syst. 2013;88(1):9-17.)

Sasaki T, Shiohama A, Minoshima S, Shimizu N.: Identification of eight members of the Argonaute family in the human genome small star, filled. (Genomics. 2003 Sep;82(3):323-30.)

Schwarz DS, Hutvagner G, Du T, Xu Z, Aronin N, Zamore PD.: Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex.(Cell. 2003 Oct 17;115(2):199-208)

Shen B, Goodman HM.: Uridine addition after microRNA-directed cleavage. (Science. 2004 Nov 5;306(5698):997.)

Sigova A, Rhind N, Zamore PD.: A single Argonaute protein mediates both transcriptional and posttranscriptional silencing in *Schizosaccharomyces pombe*. (Genes Dev. 2004 Oct 1;18(19):2359-67)

Sijen T, Fleenor J, Simmer F, Thijssen KL, Parrish S, Timmons L, Plasterk RH, Fire A.: On the role of RNA amplification in dsRNA-triggered gene silencing. (Cell. 2001 Nov 16;107(4):465-76.)

Simmer F, Buscaino A, Kos-Braun IC, Kagansky A, Boukaba A, Urano T, Kerr AR, Allshire RC.: Hairpin RNA induces secondary small interfering RNA synthesis and silencing in trans in fission yeast. (EMBO Rep. 2010 Feb;11(2):112-8.)

Sonneborn TM, LeSuer A.: Antigenic characters in *Paramecium aurelia*, variety 4; determination, inheritance and induced mutations. (Am Nat. 1948 Jan-Feb;82(802):69-78.)

Sontheimer EJ.: Assembly and function of RNA silencing complexes. (Nat Rev Mol Cell Biol. 2005 Feb;6(2):127-38.)

Sultan M, Schulz MH, Richard H, Magen A, Klingenhoff A, Scherf M, Seifert M, Borodina T, Soldatov A, Parkhomchuk D, Schmidt D, O'Keeffe S, Haas S, Vingron M, Lehrach H, Yaspo ML. : A global view of gene activity and alternative splicing by deep sequencing of the human transcriptome. (Science. 2008 Aug 15;321(5891):956-60.)

Szittyá G, Silhavy D, Molnár A, Havelda Z, Lovas A, Lakatos L, Bánfalvi Z, Burgyán J.: Low temperature inhibits RNA silencing-mediated defence by the control of siRNA generation. (EMBO J. 2003 Feb 3;22(3):633-40.)

- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S.: MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. (Mol Biol Evol. 2007 Aug;24(8):1596-9.)
- Tang Y, Ou Z, Qiu J, Mi Z.: Putative signal peptides of two BURP proteins can direct proteins to their destinations in tobacco cell system. (Biotechnol Lett. 2014 Nov;36(11):2343-9.)
- Tavernarakis N, Wang SL, Dorovkov M, Ryazanov A, Driscoll M.: Heritable and inducible genetic interference by double-stranded RNA encoded by transgenes. (Nat Genet. 2000 Feb;24(2):180-3.)
- Terpe K.: Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. (Appl Microbiol Biotechnol. 2003 Jan;60(5):523-33.)
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ.: CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. (Nucleic Acids Res. 1994 Nov 11;22(22):4673-80.)
- Timmons L, Fire A.: Specific interference by ingested dsRNA. (Nature. 1998 Oct 29;395(6705):854.)
- Timmons L, Court DL, Fire A.: Ingestion of bacterially expressed dsRNAs can produce specific and potent genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. (Gene. 2001 Jan 24;263(1-2):103-12.)
- Tomari Y, Matranga C, Haley B, Martinez N, Zamore PD.: A protein sensor for siRNA asymmetry. (Science. 2004 Nov 19;306(5700):1377-80.)
- Tomari Y, Zamore PD.: Perspective: machines for RNAi. (Genes Dev. 2005 Mar 1;19(5):517-29.)
- Vaucheret H, Mallory AC, Bartel DP.: AGO1 homeostasis entails coexpression of MIR168 and AGO1 and preferential stabilization of miR168 by AGO1. (Mol Cell. 2006 Apr 7;22(1):129-36.)
- Vazquez F, Hohn T.: Biogenesis and Biological Activity of Secondary siRNAs in Plants. (Scientifica (Cairo). 2013;2013:783253.)
- Verdel A, Jia S, Gerber S, Sugiyama T, Gygi S, Grewal SI, Moazed D: RNAi-mediated targeting of heterochromatin by the RITS complex. (Science. 2004 Jan 30;303(5658):672-6.)
- Verdel A, Moazed D.: RNAi-directed assembly of heterochromatin in fission yeast. (FEBS Lett. 2005 Oct 31;579(26):5872-8.)
- Verdel A, Vavasseur A, Le Gorrec M, Touat-Todeschini L.: Common themes in siRNA-mediated epigenetic silencing pathways. (Int J Dev Biol. 2009;53(2-3):245-57.)
- Vermeersch L, De Winne N, Depicker A.: Introns reduce transitivity proportionally to their length, suggesting that silencing spreads along the pre-mRNA. (Plant J. 2010 Nov;64(3):392-401.)
- Vilkaitis Giedrius, Plotnikova Alexandra, and Klimašauskas Saulius.: Kinetic and functional analysis of the small RNA methyltransferase HEN1: The catalytic domain is essential for preferential modification of duplex RNA. (RNA. Oct 2010; 16(10): 1935–1942.)
- Voinnet O.: RNA silencing as a plant immune system against viruses. (Trends Genet. 2001 Aug;17(8):449-59.)

- Voinnet O.: Use, tolerance and avoidance of amplified RNA silencing by plants. (Trends Plant Sci. 2008 Jul;13(7):317-28.)
- Volpe TA, Kidner C, Hall IM, Teng G, Grewal SI, Martienssen RA.: Regulation of heterochromatic silencing and histone H3 lysine-9 methylation by RNAi. (Science. 2002 Sep 13;297(5588):1833-7)
- Wassenegger M, Krczal G.: Nomenclature and functions of RNA-directed RNA polymerases. (Trends Plant Sci. 2006 Mar;11(3):142-51. Epub 2006 Feb 13.)
- Williams RW, Rubin GM.: ARGONAUTE1 is required for efficient RNA interference in *Drosophila* embryos. (Proc Natl Acad Sci U S A. 2002 May 14;99(10):6889-94.)
- Winter J, Diederichs S.: Argonaute proteins regulate microRNA stability: Increased microRNA abundance by Argonaute proteins is due to microRNA stabilization. (RNA Biol. 2011 Nov-Dec;8(6):1149-57.)
- Xie Z., Kasschau KD., Carrington JC.: Negative feedback regulation of Dicer-Like1 in *Arabidopsis* by microRNA-guided mRNA degradation. (Curr Biol. 2003 Apr 29;13(9):784-9.)
- Yekta S, Shih IH, Bartel DP.: MicroRNA-directed cleavage of HOXB8 mRNA. (Science. 2004 Apr 23;304(5670):594-6.)
- Yoshikawa M, Peragine A, Park MY, Poethig RS.: A pathway for the biogenesis of trans-acting siRNAs in *Arabidopsis*. (Genes Dev. 2005 Sep 15;19(18):2164-75.)
- Yoshikawa M.: Biogenesis of trans-acting siRNAs, endogenous secondary siRNAs in plants. (Genes Genet Syst. 2013;88(2):77-84.)
- Yu B, Yang Z, Li J, Minakhina S, Yang M, Padgett RW, Steward R, Chen X.: Methylation as a crucial step in plant microRNA biogenesis. (Science. 2005 Feb 11;307(5711):932-5.)
- Zabel P, Weenen-Swaans H, van Kammen A.: In vitro replication of cowpea mosaic virus RNA: I. Isolation and properties of the membrane-bound replicase. (J Virol. 1974 Nov;14(5):1049-55.)
- Zhang C, Ng DW, Lu J, Chen ZJ.: Roles of target site location and sequence complementarity in trans-acting siRNA formation in *Arabidopsis*. (Plant J. 2012 Jan;69(2):217-26.)
- Zeng Y., Cullen BR.: Sequence requirements for micro RNA processing and function in human cells. (RNA. 2003 Jan;9(1):112-23.)

8. Anhang

8.1 Sequenz des Hen1-Antigens (5'→3')

CTCGAGAAAGAACGCACGCTGGACATCGGCTGTAACGACGGCAAATTCATTCAACGCCTGGCACACTCTCTGG
 ACTTCAACTTCATCGCTGGTCTGGATATCGACCTGGAAGTCCTGAAAGAAGCGTGCGATAACATCGTGTATGAT
 CAGATTCAAGACTGCCTGCGTAGCAATCGCAAATCTGAATGTTGGATCAAACCTGTTCCATGGCAACGCCCTGA
 AAAAATACAAACAGCTGAAACAAATGAACTTCGAACTGATCACCCCTGATTGAAAGTGGTTGAACACCTGCAGCT
 GGAACAACCTGGATGACCTGTGTGAAAACGTTTTTGGTTATCTGAATCCGCAGCGTATTATCATTACCACGCCGA
 ACAGTGATTTTAATGTCTACTTCAAACAACCTGAACCCGAAATTCGTGCTGCGTCACCCGGACCATAAATTTGAA
 TTCTCCAATAGAAGCTT

8.2 Hen1-Homologe aus anderen Organismen

Tabelle 8.1: Hen1-Homologe und deren Bezeichnung aus verschiedenen Organismen. Aufgelistet sind die Homologe aus *Mus musculus*, *Tetrahymena thermophila*, *Drosophila melanogaster*, *Arabidopsis thaliana* und *Paramecium tetraurelia* samt deren Accession-Nummern und der Datenbank, aus denen sie gezogen wurden.

Organismus	Bezeichnung	Accession Number	Datenbank
<i>Mus musculus</i>	Henmt1	NP_001072114	NCBI
<i>Tetrahymena thermophila</i>	Hen1p	CAQ86608	NCBI
<i>Drosophila melanogaster</i>	Pimet	NP_610732	NCBI
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Hen1	ALL05056	NCBI
<i>Paramecium tetraurelia</i>	PtHen1	GSPAT00036636001	<i>ParameciumDB</i>

8.3 verwendete Software

Bioedit (Hall, 1999)

MEGA4 (Tamura *et al.*, 2004)

Pfam (Finn *et al.*, 2014)

ClustalW (Thompson *et al.*, 1994)

NCBI (NCBI Resource Coordinators, 2014)

8.4 Expressionsprofile der untersuchten Gene während der Autogamie

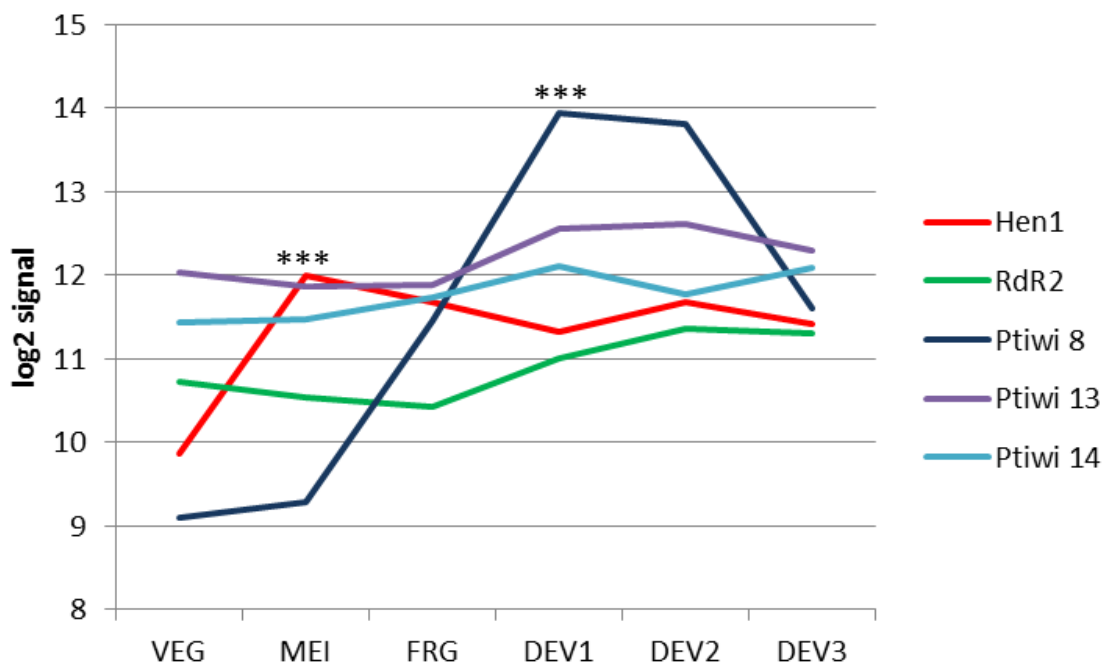


Abbildung 8.1: Expressionsprofile der getesteten Gene während der Autogamie. Aufgetragen sind die gemessenen Expressionslevel gegen verschiedene Phasen des Zellzyklus. VEG steht für das vegetative Zellwachstum. MEI steht für die beginnende Fragmentierung des alten MAC und der meiotischen Teilung des MIC. FRG entspricht dem Stadium, in dem mind. 50% der Zellen einen fragmentierten MAC haben. Bei DEV1 sind die Anlagen des neuen MAC in ersten Zügen zu erkennen. Bei DEV2 sind die Anlagen des neuen MAC in allen Zellen zu erkennen. DEV3 entspricht dem Zellstadium 10 h nach DEV2.

Hen1 und Ptiwi 8 sind während der frühen Autogamie-Phase signifikant aufreguliert. Ptiwi 13 und Ptiwi 14 weisen keine Änderung ihres Expressionslevels während der Autogamie auf. Zu Cid2 sind keine entsprechenden Daten unter ParameciumDB verfügbar.

8.5 Nachweis der sekundären Transgen-induzierten siRNAs mittels Northernblot

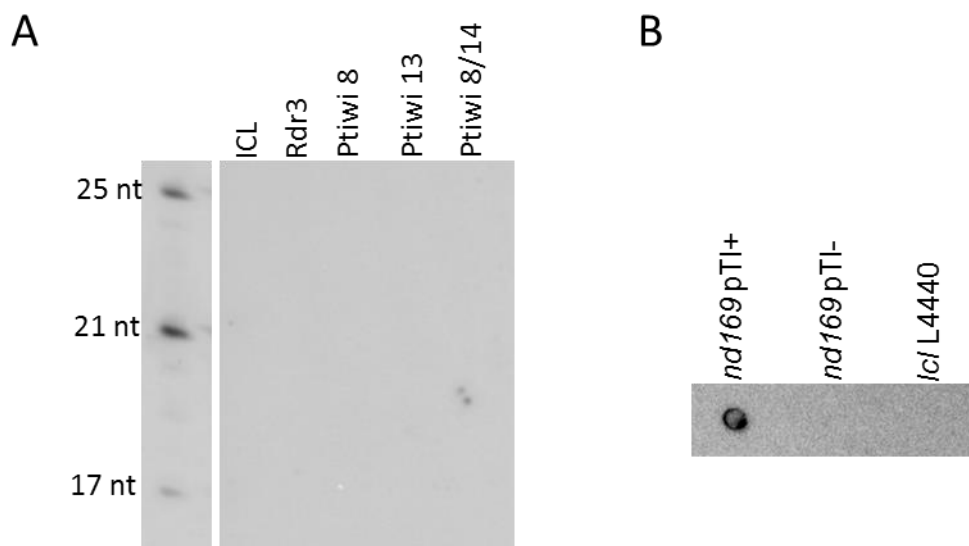


Abbildung 8.2: Northernblot zum Nachweis sekundärer *nd169* spezifischer siRNAs. A) Dargestellt ist beispielhaft ein Northernblot, der mit einer Sonde hybridisiert wurde, die den 3' deletierten Bereich der *nd169*-Gensequenz des Transgens pTI- abdeckt. Aufgetragen sind jeweils 15 µg der aus den jeweiligen Feeding-Kulturen isolierten RNA. Die Aufliegezeit des Screens betrug 3 Wochen. B) zeigt einen Dotblot, der als Kontrolle der Sonde dient. Aufgetragen sind je 1 fmol der isolierten RNA aus Kulturen, die mit dem pTI+ Transgen als Positivkontrolle, dem pTI- Transgen als Negativkontrolle und einem Vektor, der kein *nd169*-Konstrukt enthält (ICL L4440) ebenfalls als Negativkontrolle, transformiert wurden.

Aus Abbildung 8.2 geht deutlich hervor, dass die Detektion *nd169* spezifischer siRNAs mittels Northernblot-Analyse nicht durchführbar ist. Die Methode ist nicht sensitiv genug um die sekundären siRNAs, die vom endogenen *nd169*-Transkript synthetisiert werden, nachzuweisen. Man sieht in Abbildung 8.2 A, dass keine Banden im Northernblot zu detektieren sind. Abbildung 8.2 B zeigt jedoch, dass die radioaktive Markierung der Sonde funktioniert hat. Hier lässt sich ein Signal in der Spur detektieren, die RNA der Zellen enthält, die das pTI+ Konstrukt tragen. Dieses Konstrukt liegt in großer Kopienzahl in den Zellen vor und enthält den Bereich des *nd169*-Gens, den die Sonde abdeckt. Somit kann festgehalten werden, dass die Markierung der Sonde funktioniert hat, die Menge an sekundären endogenen *nd169*-spezifischen siRNAs, die durch das pTI- Konstrukt induziert werden, jedoch zu gering sind um sie an Hand von Northernblot-Analysen zu detektieren.

8.6 p-Werte der Berechnung des Signifikanzniveaus mittels T-Test der qPCR-Daten

Tabelle 8.2 : p-Werte der Berechnung des Signifikanzniveaus mittels T-Test der qPCR-Daten. Berechnet wurde das Signifikanzniveau der Temperaturen 32°C und 26°C jeweils zu 18° innerhalb der Analyse einer RNAi-Komponente mittels T-Test. Die Niveaus wurden mit *p <0,05; **p<0,01; ***p<0,001 angelegt.

	18°C	26°C	32°C
Rdr3	-	0,8394771	0,0131262
Rdr2	-	0,76089681	0,07570198
Dcr1	-	0,99687018	0,3883563
Hen1	-	0,1858117	0,60735167
GAPDH	-	0,89750269	0,9361609

8.7 Verteilung der Reads der einzelnen Libraries

Tabelle 8.3: Verteilung der Reads der einzelnen Libraries. Aufgelistet sind die Gesamtreadzahlen; die Anzahl der Reads, die auf die Kontaminationssequenzen mappen; Die Summe *T*, die Anzahl der Reads, die nach Abzug der Kontaminationssequenz-mappenden Reads auf das Genom von *Paramecium* mappen; die Summe *K*, die die Anzahl der dsRNA-Feeding assoziierten Reads darstellt und die normalisierte Anzahl *R'* der Reads in der jeweiligen Zielregion des *nd169*-Gens.

Library	Gesamtreadzahlen	Anzahl der Reads, die auf die Kontaminationssequenzen mappen	Anzahl <i>T</i>	Anzahl <i>K</i>	Anzahl <i>R'</i> 5' Bereich <i>nd169</i> -Gen	Anzahl <i>R'</i> 3' Bereich <i>nd169</i> -Gen	Anzahl <i>R'</i> Genkörper <i>nd169</i> -Gen
pTI- ICL	8679846	5849533	2830313	1700886	-	364	257269
pTI- Hen1	8563794	5869314	2694480	1790803	-	294	221402
pTI- 8/14	10597689	6540630	4057059	3036738	-	118	134385
pTI- ICL Me	9464603	5419122	4045481	2446991	-	547	236132
pTI- Hen1 Me	3230416	2644923	585493	345457	-	360	16209
pTI- 8/14 Me	9030584	4478643	4551941	3523059	-	233	120066
pTI-/- ICL	18695851	13299524	5396327	3238147	5118	297	224818
pTI-/- 13	14003351	10015438	3987913	2251029	1034	39	99739
pTI-/- Rdr2	12302816	10491988	1810828	656010	419	19	46170
pTI-/- Cid2	21911056	19689311	2221745	835230	1374	33	84737

8.8 Liste der Kontaminationssequenzen

Tabelle 8.4: Liste der Kontaminationssequenzen. Aufgelistet sind die analysierten Sequenzen verschiedener Organismen, die bei einer Sequenzierung als Kontamination auftreten könnten. Meist wurden die kompletten Genome analysiert, teilweise auch nur spezifische Sequenzen.

Art	Stamm	analysierte Sequenz ** (** wenn nichts eingetragen ist, wurde das komplette Genom analysiert)
<i>Pseudomonas sp.</i>	UW4 R81 R62	
<i>Pseudomonas putida</i>	F1 KT2440 W619 GB-1 DSM 3601 ND6 S16 BIRD-1 HB3267 DOT-T1E	pyridine-2,6-bis(monothiocarboxyli Säure) Biosynthese Gen-Locus
<i>Pseudomonas entomophila</i>	L48	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	LESB58 PA7 PAO1 NCGM2.S1 M18 UCBPP-PA14 DK2 39016 NCMG1179 C3719 2192	
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Pf-5 SS101 A506 SBW25 Q2-87 R124 F113 Q8r1-96 WH6 Pf0-1 NCIMB 11764	
<i>Pseudomonas syringae</i>	B64 DC3000 B728a 1448A	
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	DSM 10701	

	DSM 4166 A1501	
<i>Pseudomonas mendocina</i>	NK-01 ymp	
<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	30-84 O6	
<i>Pseudomonas fragi</i>	B25	
<i>Pseudomonas fulva</i>		12-X Chromosom
<i>Pseudomonas brassicacearum</i>	NFM421	
<i>Pseudomonas synxantha</i>	BG33R	
<i>Pseudomonas protegens</i>	Pf-5	
<i>Escherichia coli</i>	DH1 BL21(DE3) BW2952 O55:H7 str. CB9615 042 536 O111:H- str. 11128 KO11FL	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NTUH-K2044 MGH 78578 342 1084 HS11286 KCTC 2242 WGLW2 NTUH-K2044 MGH 78578 WGLW3 Ecl8 WGLW1 KpQ3	
<i>Klebsiella variicola</i>	At-22	
<i>Klebsiella oxytoca</i>	E718 KCTC 1686 10-5246 10-5250 10-5245 10-5243	
<i>Shigella flexneri</i>	2002017	
<i>Acidovorax sp.</i>	JS42	
<i>Enterobacter aerogenes</i>	EA1509E KCTC 2190	
<i>Enterobacter cloacae</i>	SCF1 ENHKU01 SDM ATCC 13047	

<i>Enterobacteriaceae bacterium</i>	FGI 57	
<i>Azotobacter vinelandii</i>	DJ	
<i>Photobacterium profundum</i>	SS9	
<i>Paramecium aurelia</i>		Mitochondriales Genom 25S große Untereinheit rDNA große Untereinheit rDNA Gen makronukleares X -Gen
<i>Paramecium aurelia</i>		snoRNA-Loci snRNA-Loci ncRNA-Loci

8.9 Alignment der Sequenzen der in den Northernblot-Analysen verwendeten Vektor-Sonde mit den Vektoren pTI- und L4400

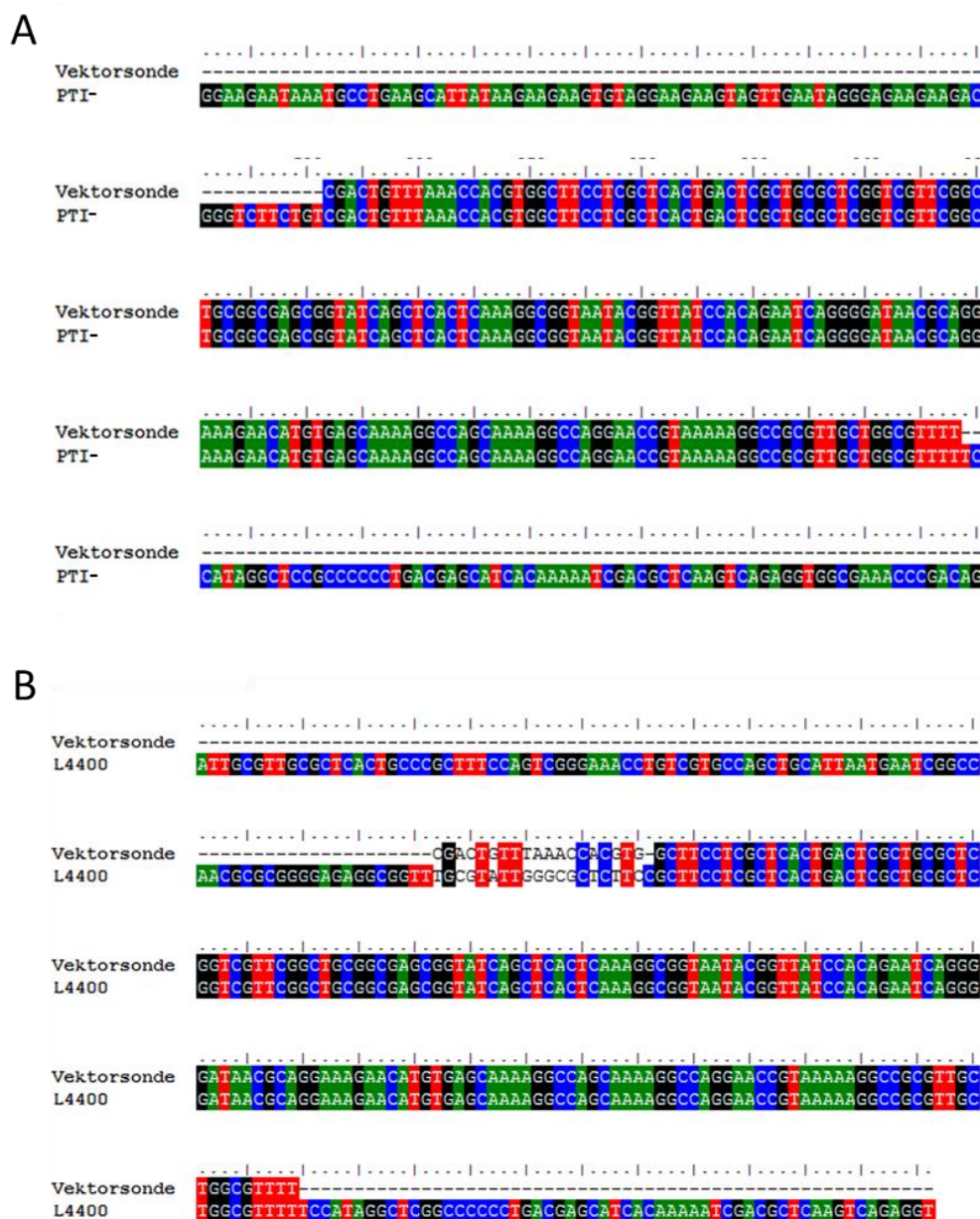


Abbildung 8.3: Auszug aus den Alignments der Sequenz der Vektor-Sonde mit der Sequenz im Vektorbereich des Transgens pTI- (A) und dem dsRNA-Feeding-Vektor L4400 (B).

In Abbildung 8.3 ist zu erkennen, dass die in dieser Arbeit für die Northernblot-Analysen verwendete Vektor-Sonde zu dem Vektorbereich des Transgens pTI- homolog ist, der sich an die verkürzte *nd169*-Sequenz auf dem Transgen anschließt (vgl. Abb. 8.3 A). Zudem ist zu sehen, dass die Vektor-Sonde auch zu einem Bereich des L4400-Vektors, der für das dsRNA-Feeding verwendet wurde, homolog ist.

8.10 Analyse des letzten Nukleotids am 3' Ende der Transgen-induzierten siRNAs

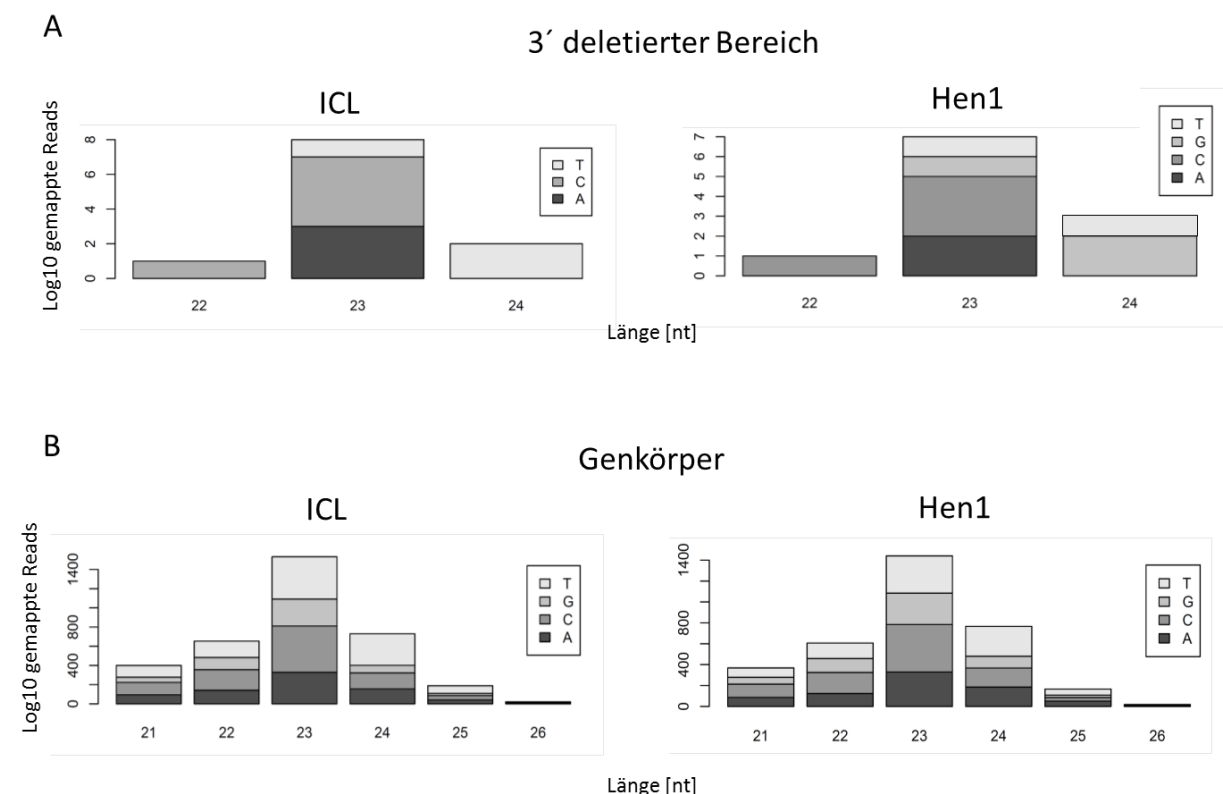


Abbildung 8.4: Analyse des 3' Endes der siRNAs in den Sequenzierungen der pTI-*icl*-Library (ICL) sowie der pTI-*hen1*-Library (Hen1). Es wurden die mappenden Reads im 3' deletierten Bereich des *nd169*-Gens (A) sowie die Reads, die auf den Genkörper des *nd169*-Gens mappen (B), analysiert. Dargestellt ist die logarithmisch aufgetragene Anzahl an Reads (\log_{10}), die in dem analysierten Bereich mappen, gegen die Readlänge in Nukleotiden [nt]. Analysiert wurden je das letzte Nukleotid. Da die Sequenzierungen auf der cDNA der siRNAs basieren, wurde hier Thymin statt Uracil detektiert.

In Abbildung 8.4 ist zu sehen, dass in der pTI-*icl*-Library bei der 23 nt Fraktion der Reads im Genkörper alle vier Nukleotide annähernd gleich stark vertreten sind (vgl. Abb. 8.4 B, ICL). Auch im 3' deletierten Bereich sind drei Nukleotide vertreten. Hier lässt sich beobachten, dass Cytosin und Adenin öfters als letztes Nukleotid vorkommen als Thymin (vgl. Abb. 8.4 A, ICL). Betrachtet man beide analysierten Bereiche zusammen, so kann man jedoch sagen, dass *Paramecium* keine Präferenz für ein letztes Nukleotid bei der funktionellen Größe der siRNAs von 23 nt hat. Zudem ist zu erkennen, dass durch ein Wegfallen der Methylgruppe keine Präferenz für das Anhängen eines Nukleotid-Schwanzes besteht. Bei der Stilllegung von Hen1 konnte in keinem der analysierten Bereiche in der pTI-*hen1*-Library eine solche Präferenz verzeichnet werden (vgl. Abb. 8.4 A und B, Hen1).

9. Danksagung

Ich danke der TU Kaiserslautern und der Deutschen Forschungsgesellschaft für die Unterstützung und der Ermöglichung dieser Doktorarbeit. Vor allem danke ich meinem Betreuer Juniorprof. Dr. Martin Simon für die stets gute Zusammenarbeit und die vielen Anregungen, die diese Arbeit erst komplett gemacht haben. Weiterhin danke ich ihm für die Übernahme des Gutachtens.

Prof. Dr. Dr. Helmut Schmidt danke ich für die langjährige Unterstützung und für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes. Ebenso gilt mein Dank Prof. Dr. John Cullum für die Übernahme der Position des Doktorvaters und des Gutachters.

Miriam Cheaib, Simone Marker und Emanuel Staudt bin ich vor allem für das kollegiale Arbeitsklima und die Unterstützung dankbar. Ohne euch hätte ich die Promotion wohl nicht abgeschlossen. Es waren viele schöne Momente in den letzten Jahren, die ich mit euch geteilt habe.

Dr. Marcel Schulz und seinen Mitarbeitern danke ich für die bioinformatische Auswertung der Daten der Sequenzierungen und die stets freundliche offene Art. Ebenso danke ich der Universität des Saarlandes und der Abteilung der Genetik unter der Leitung von Prof. Dr. Jörn Walter für die tolle Eingliederung und Aufnahme und die Ermöglichung eines routinierten Tagesablaufes. Ich danke der ganzen Arbeitsgruppe für eine gute Zusammenarbeit.

Ich danke Katja Kraushaar, Viktoria Käfer, Lisa Jakobi und Claudia Lauenstein für die tatkräftige Unterstützung und Generierung einiger Daten während ihrer Abschlussarbeiten und Praktika.

Ein großes Dankeschön geht an meine Familie für die stets tolle Unterstützung und an meinen Mann, der sich mit mir durch die Jahre der Doktorarbeit gekämpft hat und mich zum durchhalten motiviert hat.

10. Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Ulrike Götz, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur mit erlaubten Hilfsmitteln erstellt habe. Alle verwendeten Hilfsmittel und Quellen sind kenntlich gemacht und angegeben.

Kaiserslautern, den 13.3.2015



(Ulrike Götz)

11. Curriculum vitae

Ulrike Götz (geb. Günzler)

Fachbereich Biologie

Abteilung Genetik (TU Kaiserslautern) und AG Molekulare Zelldynamik (Universität des Saarlandes, Saarbrücken)

Berufserfahrung:

- | | |
|-------------------|---|
| 12/2010 – 5/2014 | wissenschaftliche Mitarbeiterin im Fachbereich Biologie der TU Kaiserslautern im Rahmen der Promotion |
| 12/2010 - 12/2012 | Stipendiatin der TU Kaiserslautern und hilfswissenschaftliche Mitarbeiterin (HIWI) an der TU Kaiserslautern |
| 1/2013 – 5/2014 | Anstellung als wissenschaftliche Mitarbeiterin an der TU Kaiserslautern |
| Seit 2002 | Mitarbeiterin im Bereich Service/Theke in der Gartenlaube Heilbronn an den Wochenenden |

Bildungsweg:

- | | |
|-------------------|---|
| 12/2010 – 12/2014 | Promotion in der Abteilung für Genetik der TU Kaiserslautern in Kooperation mit der Abteilung für molekulare Zelldynamik der Universität des Saarlandes in Saarbrücken. Titel der Arbeit: „molekulargenetische Untersuchung der Synthese und Stabilisierung Transgen-induzierter siRNAs in <i>Paramecium tetraurelia</i> .“ |
| 4/2005 – 10/2010 | Studium der Biologie an der TU Kaiserslautern mit Abschluss Diplom in der Fachrichtung Mikrobiologie. (Note 1,3) Titel der Arbeit: „Die Genregulation durch den Regulator CiaR in Abwesenheit der Kinase CiaH in <i>Streptococcus pneumoniae</i> .“
Nebenfächer: Zoologie und Landschafts- und Grünordnungsplanung |
| 6/1995 – 6/2004 | Theodor-Heuss-Gymnasium mit Abschluss Abitur (Note 2,3) |

Publikationen:

- „Activity of the Two-Component Regulatory System CiaRH in *Streptococcus pneumoniae* R6.“ Halfmann A, Schnorpfeil A, Müller M, Marx P, Günzler U, Hakenbeck R, Brückner R (J Mol Microbiol Biotechnol 2011;20:96–104)
- „Primary and secondary siRNA synthesis triggered by RNAs from food bacteria in the ciliate *Paramecium tetraurelia*.“ Carradec Q, Götz U, Arnaiz O, Pouch J, Simon M, Meyer E, Marker S (Nucleic Acids Res. 2014 *accepted*)

Vorträge:

(DGP: Deutsche Gesellschaft für Protozoologie; ECOP: European Community of Protozoology)

- Tagung der DGP in Wuppertal (2012): „Analysis of endogenous regulatory short RNAs involved in the mutual exclusive gene expression“ Ulrike Günzler, Viktoria Käfer, Miriam Cheaib and Martin Simon
- Tagung der DGP in Zürich, Schweiz (2013): „Molecular analysis of trans acting siRNAs in *Paramecium tetraurelia*“ Ulrike Günzler, Katja Kraushaar and Martin Simon
- Tagung der DGP in Essen (2014): „Trans-acting siRNAs and their characteristics as a model for endogenous gene regulation“ Ulrike Götz, Vidya Oruganti, Marcel Schulz and Martin Simon

Poster:

- Tagung der DGP/ECOP in Berlin (2011): „The surface antigen multigene family of *Paramecium tetraurelia*“ Ulrike Günzler, Miriam Cheaib, Timo Oppermann, Helmut Schmidt and Martin Simon

Lehre und administrative Tätigkeiten:

Betreuung von Masterarbeiten und Praktika

- Masterarbeit Viktoria Käfer: „Epigenetische Regulierung der Antigenvariation in *Paramecium tetraurelia*“
- Vertiefungspraktikum Lisa Jakobi: „Einfluss der Ptiwi-Proteine auf die Antigenvariation in *Paramecium tetraurelia*“
- Vertiefungspraktikum Katja Kraushaar: „Temperaturabhängigkeit des Transgen-induzierten RNAi-Mechanismus in *Paramecium tetraurelia*“
- Praktikum des Mastermoduls HSG der Abteilung molekulare Zelldynamik an der Universität des Saarlandes in Saarbrücken
- Betreuung und Mitorganisation eines Workshops zur Weiterbildung von Lehrkräften in Rheinland-Pfalz