

**Analyse der Genexpression von Calcineurin B in
*Dictyostelium discoideum***

Dissertation

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

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Katrina Böckeler

Mai 2005

Diese Arbeit entstand in der Zeit zwischen Februar 2002 und Mai 2005 in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Rupert Mutzel an der Freien Universität Berlin.

1. Gutachter: Prof. Dr. Rupert Mutzel
2. Gutachter: Prof. Dr. Tina Romeis

Tag der Disputation: 4. Juli 2005

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	DER ORGANISMUS <i>DICTYOSTELIUM DISCOIDEUM</i>	1
1.2	ZELLDIFFERENZIERUNG IN <i>DICTYOSTELIUM</i>	3
1.3	CALCIUM	6
1.4	CALCINEURIN	7
1.5	FUNKTIONEN VON CALCINEURIN	10
1.6	CALCINEURIN IN <i>DICTYOSTELIUM</i>	13
1.7	mRNA PROZESSIERUNG	15
1.8	RNA INTERFERENZ	16
1.9	ZIELE DIESER ARBEIT	17
2	MATERIAL UND METHODEN	19
2.1	MATERIAL	19
2.1.1	Chemikalien und sonstige Materialien	19
2.1.2	Antibiotika	20
2.1.3	Kits für die Molekularbiologie	20
2.1.4	Enzyme für die Molekularbiologie	21
2.1.5	Antikörper	21
2.1.6	Proteine	21
2.1.7	Standards für Agarose- und Proteingele	21
2.1.8	Organismen	22
	<i>Bakterienstämme</i>	22
	<i>D. discoideum</i> Zelllinien	22
	<i>S. cerevisiae</i> Stämme	22
2.1.9	cDNA Banken	23
2.1.10	Oligonukleotide („Primer“)	23
2.1.11	Plasmide und Konstrukte	24
2.1.12	Medien für <i>E. coli</i>	25
2.1.13	Medien und Puffer für <i>D. discoideum</i>	26
2.1.14	Medien für <i>S. cerevisiae</i>	26
2.1.15	Puffer für biochemische Methoden	27
2.1.16	Puffer für molekularbiologische Methoden	30
2.1.17	Medienzusätze	31

2.2	ZELLBIOLOGISCHE METHODEN	32
2.2.1	Anzucht von <i>E. coli</i>	32
2.2.2	Präparation elektrokompetenter <i>E. coli</i> Zellen	32
2.2.3	Anzucht von <i>D. discoideum</i> Wildtyp AX2 und Lagerung der Sporen	32
2.2.4	Anzucht von <i>D. discoideum</i> Transformanten	33
2.2.5	Differenzierung von <i>D. discoideum</i> Zellen	33
2.2.6	Differenzierung von Chimären	34
2.2.7	Plaque Assay mit <i>Dictyostelium</i> Transformanten	34
2.2.8	Analyse der Fruchtkörpergröße und der Sporen-Lebensfähigkeit	34
2.2.9	Messung von Stiellängen	34
2.2.10	Präparation der Schnitte für die Mikroskopie	35
2.2.11	Anzucht von <i>S. cerevisiae</i>	36
2.3	BIOCHEMISCHE METHODEN	36
2.3.1	Herstellung von Zellextrakten für die SDS-Polyacrylamid- Gelelektrophorese	36
	<i>D. discoideum</i> Zellextrakte	36
	<i>S. cerevisiae</i> Zellextrakte	36
2.3.2	Proteinbestimmungen	37
2.3.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	37
2.3.4	Coomassie Blue Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen	37
2.3.5	Western Blot	37
2.3.6	Immunfärbung von Western Blots	37
2.3.7	<i>Saccharomyces</i> Colony-Blot	38
2.3.8	Berechnung der CNB-Konzentration in einer Zelle	38
2.4	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	39
2.4.1	Standardmethoden	39
2.4.2	Polymerasekettenreaktion (PCR)	40
2.4.3	„Whole Cell“-PCR	40
2.4.4	Extraktion von DNA aus Agarosegelen	41
2.4.5	Quantifizierung und Reinheitsbestimmung von DNA und RNA	41
2.4.6	RNA-Isolierung aus <i>D. discoideum</i> Zellen	41
2.4.7	Herstellung von Digoxigenin-markierten DNA Sonden für Northern Blots	41
2.4.8	RNA Agarose Gelelektrophorese und Northern Blot	42
2.4.9	Transformation von <i>E. coli</i>	43

2.4.10	Transformation von <i>D. discoideum</i> Zellen	43
2.4.11	Präparation von genomischer <i>D. discoideum</i> DNA	44
2.4.12	Transformation von <i>S. cerevisiae</i>	44
2.4.13	Präparation von Plasmid-DNA aus <i>S. cerevisiae</i>	44
3	ERGEBNISSE	46
3.1	<i>KNOCKDOWN</i> VON CALCINEURIN B	46
3.1.1	Erzeugung des RNAi-Konstrukts gegen <i>cnbA</i>	46
3.1.2	Analyse der CNB Expression	47
3.1.3	Charakterisierung der <i>cnbA</i> RNAi Mutante 01-5	50
3.1.3.1	Analyse der <i>cnbA</i> mRNA Expression	50
3.1.3.2	Phänotypische Analyse	51
3.1.3.2.1	Vegetatives Wachstum	51
3.1.3.2.2	Unterschiede in der Entwicklung	51
3.1.3.2.3	Analyse der Zelltypdifferenzierung	54
3.1.3.2.4	Sporenkopf-Morphologie	55
3.1.4	Entwicklungsabhängige Expression des prästielspezifischen Gens <i>ecmB</i>	57
3.1.5	Zell-autonome und nicht Zell-autonome Effekte der RNAi Expression	58
3.2	SUCHE NACH DER CALCINEURIN B PROZESSIERENDEN NUKLEASE	61
3.2.1	Prozessierung der <i>cnbA</i> mRNA	61
3.2.2	Genetischer Ansatz zur Identifizierung der Nuklease in <i>S. cerevisiae</i>	63
3.2.2.1	Selektionsansatz: Stoppkodon im <i>cnbA</i> -Konstrukt	63
3.2.2.2	Selektionsansatz: in vitro Mutagenese von <i>trp1</i> zur Einführung eines Stoppkodons in der Tryptophan-Kassette	65
3.2.2.3	Screeningansatz	66
3.2.3	Etablierung und Optimierung der Screeningmethode	67
3.2.4	Untersuchung der Qualität und Kompatibilität der cDNA Bank	69
3.2.5	Screening	70
4	DISKUSSION	72
4.1	REDUKTION DER mRNA FÜR CALCINEURIN B	72
4.1.1	Die Calcineurin B Konzentration wird in <i>D. discoideum</i> durch RNAi reduziert	72
4.1.2	Ist Calcineurin essentiell für das vegetative Wachstum?	74

4.1.3	Calcineurin spielt eine wichtige Rolle bei der Stielzellentwicklung	75
4.1.4	Calcineurin B hat möglicherweise eine Funktion in der Wahrnehmung von Calcium-Signalen	77
4.1.5	Calcineurin spielt eine Rolle bei der späten Entwicklung	78
4.2	SUCHE NACH DER CALCINEURIN B mRNA-PROZESSIERENDEN NUKLEASE	80
4.2.1	Wie kann eine nukleolytische Aktivität identifiziert werden?	80
4.2.2	Genetischer Selektionsansatz zur Identifizierung der prozessierenden Aktivität	81
4.2.3	Screeningansatz zur Identifizierung der prozessierenden Aktivität	83
4.2.4	Ausblicke für die Identifizierung der prozessierenden Aktivität	84
5	LITERATURVERZEICHNIS	86
6	VERÖFFENTLICHUNGEN	98
7	DANKSAGUNG	99
8	LEBENS LAUF	100