

Zusammenfassung

Calcineurin, eine Ca^{2+} /Calmodulin abhängige Proteinphosphatase, ist an verschiedenen Signalübertragungskaskaden beteiligt, die die Entwicklung und Funktion von Immun-, Nerven-, Kardiovaskular- und Muskelskelettsystemen steuern. Auch in sozialen Amöben der Spezies *Dictyostelium discoideum* konnte ein Homolog des aus zwei Untereinheiten bestehenden Calcineurin A und B Holoenzym isoliert und biochemisch charakterisiert werden. Die Funktion des Enzyms in diesem Organismus war jedoch bisher noch nicht bekannt.

In dieser Arbeit wurde die Rolle der regulatorischen Untereinheit Calcineurin B (CNB) in *D. discoideum* untersucht. Im ersten Teil wird die Herstellung von RNAi-Zelllinien mit reduzierter CNB Konzentration und deren weitere Charakterisierung zur Aufklärung der Funktion von Calcineurin beschrieben. Der zweite Teil der Arbeit beschäftigt sich mit der Identifizierung einer entwicklungsregulierten Endonuklease, die für die unkonventionelle Prozessierung der Calcineurin B mRNA verantwortlich ist.

Zur Manipulation der Konzentration an intrazellulärem CNB wurde sowohl ein *Knockout*-Konstrukt als auch ein RNAi-Konstrukt zum *Silencing* durch RNA Interferenz hergestellt. Über das Einfügen einer Resistenzkassette konnte kein *Knockout* Klon selektioniert werden, was auf eine essentielle Rolle von CNB beim vegetativen Wachstum der haploiden Amöben hindeutet. Dagegen führte das Einbringen eines RNAi-Konstrukts gegen die mRNA für CNB (*cnbA*) zu mehreren unabhängigen Klonen mit unterschiedlicher Reduktion der CNB Konzentration. Der verminderte CNB Proteingehalt bestätigte sich bei der Analyse der mRNA. Auf Northern Blots von RNAi Klonen konnten das exprimierte RNAi Konstrukt und abgebaute endogene *cnbA* mRNA nachgewiesen werden. Bei Zelllinien mit reduzierter CNB Konzentration wurden die Phagozytose, das vegetatives Wachstum und die Differenzierung analysiert. Waren bei vegetativem Wachstum und Phagozytose keine signifikanten Unterschiede zum Wildtyp zu beobachten, zeigten Differenzierungstests, dass bei Zelllinien mit deutlich reduzierter CNB Konzentration die Entwicklung der Amöben verlangsamt war und die Fruchtkörper kürzere Stiele mit zusätzlichen Spitzen am Sporenkopf aufwiesen. Versuche mit GFP-markierten Chimären aus Wildtyp- und Mutantenzellen zeigten keine unregelmäßige Verteilung der Zellen im *slug*. Die Expression des stielspezifischen Entwicklungsmarkers *ecmB* war in RNAi Mutanten reduziert.

Die Ergebnisse stellen ein Spiegelbild der phänotypischen Defekte von *D.*

discoideum Glykogensynthasekinase 3 (GskA) und β -Catenin Nullmutanten dar. Es wird daher ein Modell vorgeschlagen, bei dem in Prästielzellen ein durch das Morphogen DIF (*differentiation-inducing factor*) induzierter Anstieg an freiem intrazellulärem Calcium Calcineurin aktiviert und Calcineurin dieses Signal durch Dephosphorylierung eines cytosolischen Transkriptionsfaktors weiterleitet. Der dephosphorylierte Faktor ist in der Lage, in den Kern einzuwandern und die Expression prästielspezifischer Gene zu induzieren.

In Vorarbeiten wurde bereits gezeigt, dass Calcineurin B durch einen neuen unkonventionellen Mechanismus auf mRNA Ebene prozessiert wird. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass eine entwicklungsregulierte Endonuklease für die Prozessierung verantwortlich ist. In dieser Arbeit wurde eine Screening-Methode für die Identifizierung der nukleolytischen Aktivität mit Hilfe eines genetischen Ansatzes etabliert.