

1 Einleitung

1.1 Der Organismus *Dictyostelium discoideum*

Soziale Amöben, die auch als zelluläre Schleimpilze bekannt sind, gehören ins Reich der Mycetozoen zu der Klasse der Acrasiomycetes. Sie sind vor allem in der obersten Bodenschicht und auf verrottendem Pflanzenmaterial zu finden. In ihrem Lebenszyklus schließen sich amöboide Zellen, die zunächst einzeln und unabhängig von einander leben, zu einem vielzelligen Organismus zusammen. Es entsteht ein Fruchtkörper, der aus einem Stiel und einem Sporenkopf zusammengesetzt ist. Für die Umstellung von Wachstum- zu Entwicklungsstadium sind zelluläre Prozesse wie Chemotaxis, Zellbewegung, Signaltransduktion und differentielle Genexpression erforderlich.

Die am besten untersuchte Spezies unter den sozialen Amöben ist *Dictyostelium discoideum*. Diese Art besitzt ein haploides, AT-reiches Genom von ca. 34 Megabasen, das auf 6 Chromosomen verteilt ist (Kay & Williams, 1999) und etwa 12 500 Gene kodiert (Eichinger et al., 2005).

Dictyostelium discoideum durchläuft einen bemerkenswerten Lebenszyklus (Abb. 1). In seiner vegetativen Phase bewegen sich die amöboid lebenden Zellen mit Pseudopodien fort und ernähren sich durch Phagozytose von Bakterien (axenische Laborstämme von *D. discoideum* ernähren sich durch Pinozytose). Dabei ist die von den Bakterien produzierte Folsäure das chemotaktische Signal (Loomis, 1975). Wenn die Nahrungsquellen erschöpft sind, stellen die Zellen Nahrungsaufnahme und Teilungswachstum ein und leiten die Entwicklung eines echten vielzelligen Organismus ein. Angelockt durch chemotaktisch wirksames cyclisches 3',5'-Adenosinmonophosphat (cAMP) strömen die Amöben in Aggregationszentren zusammen. Dazu wird vier bis fünf Stunden nach dem Einsetzen der Hungerphase beginnend von einigen Zellen pulsartig alle 5 – 6 min cAMP ausgeschüttet. Das extrazelluläre cAMP bindet an oberflächengebundene cAMP-Rezeptoren benachbarter Zellen, die sich dadurch zum Ort höherer cAMP-Konzentration bewegen und nun ihrerseits cAMP produzieren und ausschütten. Es bilden sich konzentrische cAMP-Wellen aus, das Signal wird verstärkt, und die Zellen beginnen chemotaktisch auf das Aggregationszentrum zuzuwandern (siehe Übersicht in Devreotes, 1982). Um die Relaxation dieses Sensorsystems zu gewährleisten, wird gebundenes cAMP

innerhalb kurzer Zeit von Zelloberflächengebundenen und sezernierten extrazellulären cAMP-Phosphodiesterasen abgebaut (Malchow et al., 1972). Nach ca. 6 - 10 Stunden entstehen Aggregate aus bis zu 100 000 Zellen (Loomis, 1975).

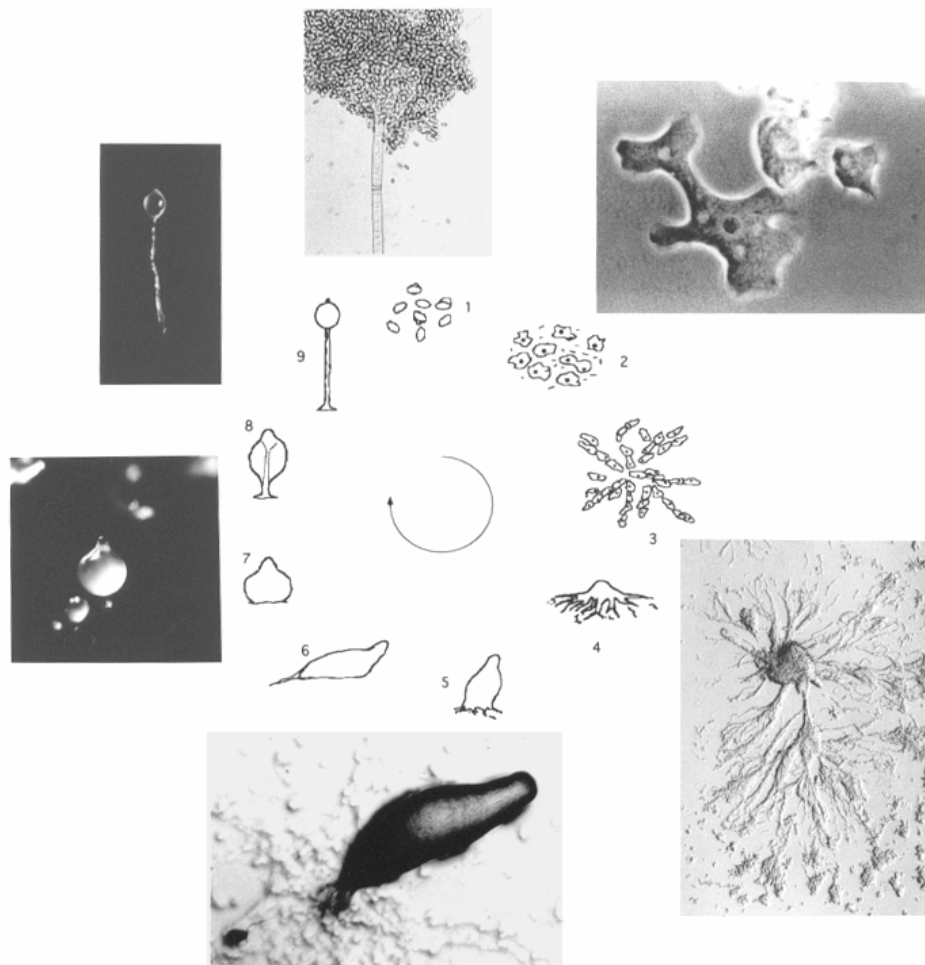


Abb. 1: Der Lebenszyklus von *Dictyostelium discoideum*. Sporen keimen aus (1) und vegetative Zellen wachsen (2), bis die Nahrungsquelle knapp wird. Nach chemotaktischer Aggregation (3) streckt sich die Zellmasse dieses Aggregats in die Länge (4), um einen „Finger“ (5) zu bilden. Entweder wandert das Zellaggregat als „slug“ über das Substrat (6), oder es beginnt, über das „mexican hat“ Stadium (7) zu einem Fruchtkörper zu kulminieren (8). Dieser Fruchtkörper (9) besteht aus toten Stielzellen und den Sporenzellen, die erneut eine Runde des Lebenszyklus beginnen können. Unter Laborbedingungen dauert der Lebenszyklus vom Beginn des Hungerns bis zum fertigen Fruchtkörper etwa 24 Stunden. Die Photos zeigen einige ausgewählte Stadien: oben rechts, eine Amöbe; unten rechts, ein Aggregat; unten, ein wandernder „slug“; links, ein „mexican hat“, der gerade zu kulminieren beginnt; oben links ein reifer Fruchtkörper; oben, Detail eines Fruchtkörpers, mit Stiel und reifen Sporen (Abbildung aus Mutzel, 1995).

Rund um die Zellmasse bildet sich eine extrazelluläre Matrix ("Schleimschicht") als Schutzhülle. Dieses so genannte Pseudoplasmodium wird aufgrund seiner Ähnlichkeit in Gestalt und Fortbewegung zu einer Nacktschnecke als "slug" bezeichnet (Raper & Fennell, 1952) und durch Zelladhäsionsmoleküle zusammengehalten. Im *slug* können die Zellen in zwei vordifferenzierte Hauptzelltypen unterschieden werden: die Prästielzellen im anterioren Bereich und die Präsporenzellen im posterioren Bereich (Raper, 1940). Der *slug* kann sich phototaktisch und thermotaktisch orientiert auf dem Untergrund bewegen (Bonner et al., 1950), um einen optimalen Standort für die Fruchtkörperbildung zu finden. Kommt die Migration zum Stillstand, beginnt die Kulmination, die Bildung des Fruchtkörpers über die Zwischenstufe des „mexican hats“. Dabei richtet sich die Spitze des *slugs* auf und die Prästielzellen strömen nach unten durch die Masse der Präsporenzellen. Dabei differenzieren die Prästielzellen durch Vakuolisierung und Zellwandbildung (aus Zellulose) und sterben ab. Die Präsporenzellen werden durch die Bildung des Stiels allmählich an die Spitze gehoben, wo sie einen runden Sporenkopf bilden. Die reifen Sporen können sehr lange in einem Ruhezustand überdauern und unter günstigen Umweltbedingungen auskeimen, um einen neuen Lebenszyklus zu beginnen.

Auf Grund der Charakteristika seines Lebenszyklus ist *Dictyostelium* ein hervorragender Modellorganismus für Untersuchung elementarer zell- und entwicklungsbiologischer Prozesse. Zu diesen Prozessen gehören Zytokinese, Zellbewegung, Phagozytose, Chemotaxis, Signaltransduktion sowie Zellumordnung, Musterbildung und Zelltypdifferenzierung. Dabei bietet er zusätzliche Vorteile: Wachstum und Entwicklung sind getrennt und sein kleines haploides Genom ist leicht molekularbiologisch zu manipulieren.

1.2 Zelldifferenzierung in *Dictyostelium*

Sind *Dictyostelium* Zellen aggregiert, bilden sie zunächst einen Zellhaufen, der "mound" genannt wird. In diesem kompakten Aggregat beginnt die Transkription von spezifischen Genen, durch die die Zellen in verschiedene Klassen von Prästiel- und Präsporenzellen differenzieren. Die größte Population an Prästielzellen kann durch die Expression von *ecmA* identifiziert werden. Diese Zellen heißen *pstA* Zellen und bilden den Stiel im Fruchtkörper. Bevor die *pstA*

Zellen als Stiel ausdifferenzieren, beginnen sie ein zweites Gen zu exprimieren, *ecmB*. Diese Zellen werden pstAB Zellen genannt. *ecmA* und *ecmB* sind Gene für extrazelluläre Matrixproteine. Bereits im mound existiert auch eine Prästielzellpopulation, die *ecmB* ohne *ecmA* exprimiert. Diese pstB Zellen bilden am Ende die Basalscheibe und den „lower cup“. Im Gegensatz zu Prästielzellen exprimieren Präsporezellen spezifisch zum Beispiel *pspA* (extrazelluläres Matrixprotein) und *cotA* und *cotB* (Sporenhüllenprotein).

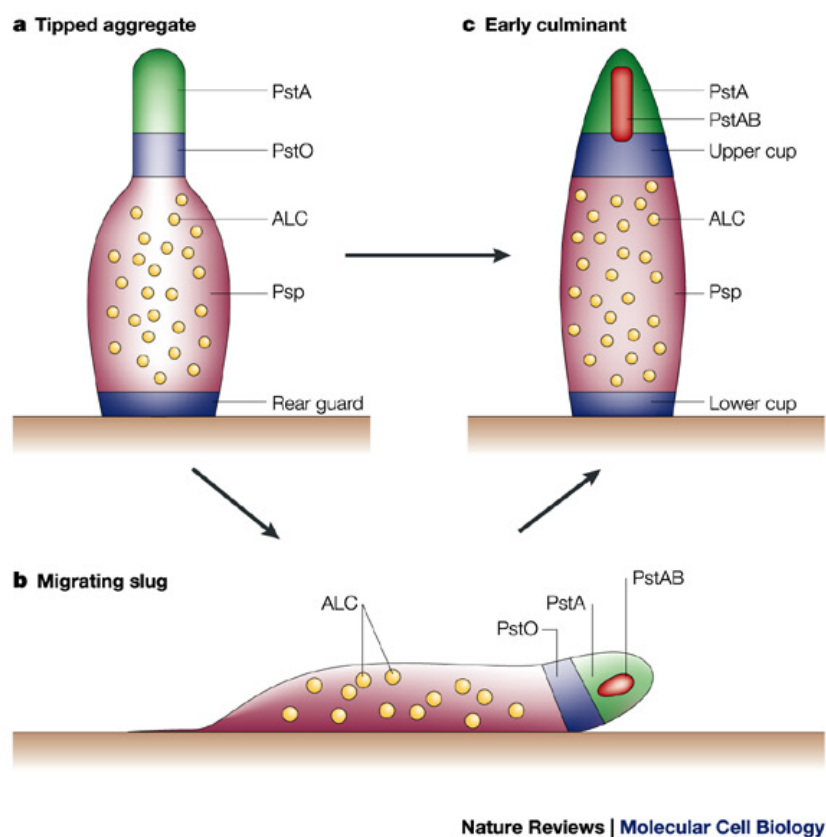


Abb. 2: Musterbildung im first finger, slug und bei der frühen Kulmination. Die Verlängerung der apikalen Spitze des mounds bildet einen first finger (a), der entweder zum migrierenden slug wird (b) oder direkt zur Kulmination übergeht (c). Die drei Stadien zeigen eine ähnliche anterior-posterior Musterbildung. PstA Zellen (grün) befinden sich an der vorderen Spitze aller Stadien. PstO Zellen (blau) liegen direkt unter oder hinter den pstA Zellen. Präsporezellen (pink) machen den Hauptanteil des Organismus aus. Anterior-like cells (ALCs, gelb) sind über die Präsporenregion verteilt. Der Boden des first fingers enthält eine weitere Prästielzellart, die rear guard Zellen (blau), die den lower cup und die Basalscheibe bilden. Zusätzlich zu den Zellpopulationen im first finger, gibt es den Prästielzelltyp pstAB (rot), der im slug einen Kern im Zentrum der apikalen Region formt. (Abbildung aus Chisholm & Firtel, 2004)

Eine Verlängerung der Spitze des mound führt zur Bildung des *slugs*, in dem die einzelnen Zellpopulationen sich entlang der anterior-posterior Achse anordnen (Dormann et al., 1998): die *pstA*, *pstO* (wenig exprimiertes *ecmA*) und *pstAB* Zellen befinden sich am vorderen Ende, die Präsporenzellen im hinteren Bereich des *slugs*. Eine Population Prästielzellen, die anterior-like cells genannt werden (ALC), ist über die Präsporenregion verteilt und auch am Ende des *slugs* zu finden.

Ob eine Zelle zur Prästiel- oder Präsporenzelle differenziert, hängt von mehreren Faktoren ab. So ist bereits die Zellzyklusphase, in der sich die Zelle zu Beginn des Hungerns befindet, für den späteren Zelltyp ausschlaggebend. Zellen in S oder G2 Phase differenzieren präferentiell in Prästielzellen, während Zellen in der späten G2 Phase eher zu Präsporenzellen werden (Wang et al., 1988; Gomer & Firtel, 1987; Weijer et al., 1984; MacWilliams et al., 2001).

Nach der Aggregation beeinflussen die zwei extrazellulären Signale cAMP und DIF-1 (*differentiation-inducing factor*) über eine komplexe Signalkaskade den Zelltyp. Prästieldifferenzierung wird durch DIF-1, ein chloriniertes Polyketid, induziert, das jedoch auch gleichzeitig die Präsporendifferenzierung hemmt (Thompson & Kay, 2000). In der Prästielregion ist die Konzentration an DIF nur halb so hoch wie in der Präsporenregion, da es in Prästielzellen von Dechlorinasen verstärkt abgebaut wird (Kay & Thompson, 2001). DIF induziert unter anderem den Transkriptionsfaktor STATc, der spezifisch in der *pstO* Region im *slug* aktiviert ist und für die Differenzierung von *pstO* Zellen benötigt wird. Innerhalb der *pstO* Population inhibiert DIF durch STATc die Expression des *pstA* Wegs, was die örtlich abgegrenzte Differenzierung von *pstA* und *pstO* Zellen ermöglicht (Araki et al., 1998; Thompson & Kay, 2000; Fukuzawa et al., 2001; Fukuzawa et al., 2003).

Präsporenzellen werden im Gegensatz dazu durch extrazelluläres cAMP über G-Protein gekoppelte cAMP-Rezeptoren (CARs) induziert (Schaap & Wang, 1986). cAMP aktiviert über CAR3 die Tyrosinkinase ZAK1 und ZAK2. Sie phosphorylieren und aktivieren damit die Glykogen-Synthase Kinase-A (GskA) (Kim et al., 1999; Kim et al., 2002). Aktivierte GskA bewirkt im Gegensatz zum Säuger-Homolog GSK3 eine Stabilisierung des Co-Transkriptionsfaktors β -Catenin, der nach Translokation in den Zellkern möglicherweise die Transkription bestimmter Präsporenspezifischer Gene induziert (Plyte et al., 1999; Kim et al., 2002; Coates et al., 2002). cAMP wirkt auch über den in Prästielzellen

angereicherten Rezeptor CAR4, um dort die Stielzelldifferenzierung durch Dephosphorylierung von ZAK 1/2 zu inhibieren.

1.3 Calcium

Calcium (Ca^{2+}) ist eines der physiologisch wichtigsten intrazellulären Signalmoleküle und ist in Eukaryoten für die Kontrolle vieler zellulärer Prozesse wie Kontraktion-Relaxation, Genexpression und Apoptose verantwortlich (Means 95; Groenendyke et al., 2004). Eine Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration von $0,01 \mu\text{M}$ zu $1 \mu\text{M}$ führt zur Aktivierung dieser Prozesse über eine Vielzahl an Signalübertragungsmechanismen, die sich in der Übertragungsgeschwindigkeit, Stärke und der örtlich-zeitlichen Ausbreitung unterscheiden (Berridge et al., 2000). Zellen erzeugen ihre Calciumsignale mittels interner und externer Calciumquellen. Die internen Speicher befinden sich im endoplasmatischen und sarcoplasmatischen (Muskelzellen) Reticulum, wo das Ion durch niederaffine, hochkapazitative Calcium-Bindeproteine wie z.B. Calreticulin gebunden ist (Gelebart et al., 2005). Freisetzung von Calcium aus diesen Speichern wird von verschiedenen Ca^{2+} -Kanälen und Ca^{2+} -Pumpen wie dem IP_3 (Inositoltriphosphat)-Rezeptor oder dem Ryanodinrezeptor kontrolliert.

Ein besonderes Calcium-Sensing wurde in neuronalen Zellen gefunden (Jeromin et al. 2004). Das dort exprimierte Protein NCS-1 besitzt neben Ca^{2+} bindenden EF-hand Motiven eine Myristoylierungsstelle. Ist NCS-1 myristoyliert, weist es drei zugängliche Ca^{2+} -Bindestellen auf. Ohne die angehängte Fettsäure kommt es zu einer Konformationsänderung und damit werden nur zwei Bindestellen zugänglich. Diesem „ Ca^{2+} -myristoyl-switch“ werden mögliche physiologische Funktionen zugeschrieben.

Calcium ist auch in *Dictyostelium* ein wichtiger Botenstoff, der in eine Reihe von Signalübertragungen involviert ist. Durch Binden von cAMP an cAMP-Rezeptoren beispielsweise erfolgt ein transienter, intrazellulärer Anstieg der Calcium-Konzentration (Schlatterer et al., 1994; Sonnemann et al., 1998; Yumura et al., 1996). Dieser Anstieg spielt sowohl bei der Chemotaxis als auch bei der Zelldifferenzierung eine Rolle. So ist Calcium für die Bewegung und Orientierung der Zellen erforderlich. Eine Verringerung der intrazellulären Calcium-Konzentration hemmt die Ausbildung von Pseudopodien und Filopodien

(Unterweger & Schlatterer, 1995). Außerdem wurden Calcium-abhängige Cytoskelettlagerungen gemessen (Europe-Finner et al., 1986).

Messungen von intrazellulärem Calcium zeigten eine Änderung der Konzentration innerhalb bestimmter Entwicklungsstadien. Während der Aggregation und Kulmination steigt $[Ca^{2+}]_i$ wohingegen es in der Slugphase $[Ca^{2+}]_i$ sinkt (Saran et al., 1994). Bei aggregierenden Zellen führen Pulse von cAMP zu einer Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$, was mit den oben genannten Ergebnissen über erhöhte $[Ca^{2+}]_i$ während der Aggregation übereinstimmt (Nebi & Fisher, 1997; Yumura et al., 1996). Innerhalb des *slugs* entsteht ein Gradient mit höherer $[Ca^{2+}]_i$ in Prästiel- als Präsporenzellen (Abe & Maeda, 1989; Cubitt et al. 1995; Saran, 1999). Auch die Verwendung von pharmakologischen Inhibitoren konnte zeigen, dass veränderte intrazelluläre Calciumkonzentrationen Einfluss auf die Chemotaxis der Zellen während der Aggregation haben oder die Genexpression in verschiedenen Zelltypen verändern (Europe-Finner et al., 1984; Horn & Gross, 1996; Unterweger & Schlatterer, 1995; Weissenmayer et al., 2005).

1.4 Calcineurin

Ca^{2+} -Ionen wirken im Cytosol meist über Vermittlermoleküle auf intrazelluläre Ziele. Bei den Vermittlermolekülen handelt es sich um Ca^{2+} -Bindeproteine. Durch Calcium-Bindung erfahren diese Proteine eine Konformationsänderung. Die daraus resultierende Aktivitätsänderung beeinflusst die Aktivität weiterer Enzyme. Eines dieser Enzyme ist die Ca^{2+} /Calmodulin abhängige Proteinphosphatase Calcineurin. Calcineurin wurde erstmals aus Rinderhirn isoliert, wo es ca. 0,5% des gesamten löslichen Proteins ausmacht. (Wang & Desai, 1977; Klee & Krinks, 1978). Calcineurin ist eine Proteinphosphatase vom Typ 2B und dephosphoryliert spezifisch Serin- und Threoninreste von Proteinsubstraten (Stewart et al., 1982). Das Säugerenzym besteht aus der katalytischen Untereinheit Calcineurin A (ca. 60 kDa) und der regulatorischen Untereinheit Calcineurin B (ca. 19 kDa). Die beiden Untereinheiten werden immer in einem stöchiometrischen Verhältnis von 1:1 vorgefunden und sind nur unter denaturierenden Bedingungen dissoziierbar (Klee et al., 1988).

Die katalytische Untereinheit Calcineurin A ist in mehrere Domänen

einteilbar. Am N-Terminus befindet sich die katalytische Domäne, die etwa 2/3 des Proteins ausmacht. In Richtung C-Terminus folgen die regulatorischen Domänen. Diese sind die Calcineurin B-Bindedomäne, die Calmodulin-Bindedomäne und die autoinhibitorische Domäne. Die Calcineurin B-Bindedomäne ist mit mindestens 90% Sequenzidentität zwischen Säugern, Pilzen und *Dictyostelium* sehr stark konserviert (Kincaid, 1993; Dammann et al., 1996). Die Calmodulin-Bindedomäne ist weniger gut konserviert (Kincaid, 1993). Wie Röntgenstrukturanalysen zeigen, liegt die autoinhibitorische Domäne in Abwesenheit von Ca^{2+} /Calmodulin über der katalytischen Domäne und unterbindet so die Substratbindung an das aktive Zentrum (Kissinger et al., 1995). Bindung von Ca^{2+} /Calmodulin an die Calmodulin-Bindestelle von Calcineurin A führt zu einer Konformationsänderung, in deren Folge sich die autoinhibitorische Domäne verlagert. Das Enzym wird somit aktiviert. Wird die autoinhibitorische Domäne durch Proteolyse abgespalten, so entsteht ein konstitutiv aktives Enzym, welches noch Ca^{2+} /Calmodulin binden kann, es aber nicht mehr für seine Aktivierung benötigt (Manalan & Klee, 1983; Kincaid et al., 1986). Je nach Organismus existieren mehrere Calcineurin A Isoformen (Guerini & Klee, 1989).

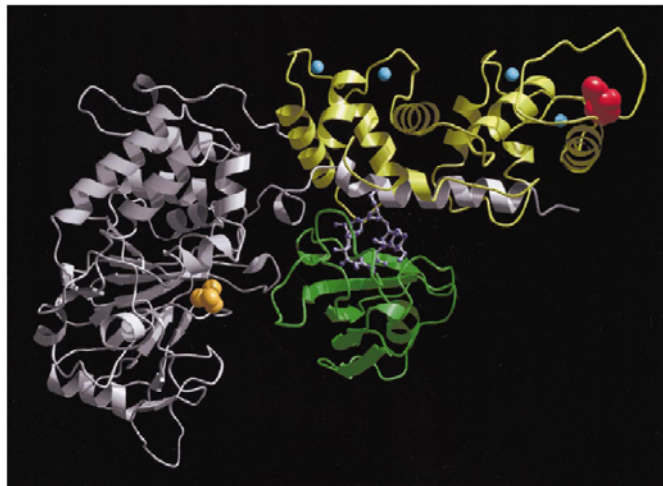


Abb. 3: Dreidimensionale Kristallstruktur von Calcineurin mit FK506 und FK506-Bindeprotein (FKBP). Die katalytische Untereinheit Calcineurin A ist in grau dargestellt, die Calcineurin B in gelb, FKBP in grün und die immunosuppressive Substanz FK506 ebenfalls in grau. Die vier Ca^{2+} Moleküle der B Untereinheit sind blau und die Myristoylgruppe ist gefärbt. Das Phosphatmolekül, dass am aktiven Zentrum von Calcineurin A bindet ist in orange dargestellt (aus Rusnak & Mertz, 2000).

Die regulatorische Untereinheit Calcineurin B gehört zur Familie der EF-Hand Calcium-Bindeproteine und bindet ebenso wie Calmodulin vier Ca^{2+} -Ionen. Die Affinitäten der Calcium-Bindedomänen für Ca^{2+} sind sehr hoch und liegen im mikromolaren Bereich. Säuger Calcineurin B hat 35% Sequenzidentität zu Calmodulin, wobei sich die Übereinstimmungen hauptsächlich auf die Calcium-Bindedomänen beschränken (Klee et al., 1983). Die EF-Hand Calcium-Bindedomänen von Calcineurin B sind laut Feng und Stemmer (1999) in zwei unterschiedliche Klassen einteilbar. Die beiden N-terminal gelegenen EF-Hand Domänen haben regulatorische Funktion und werden für die Enzymaktivität und Substraterkennung benötigt. Diese zwei Domänen weisen niedrigere Affinitäten für Ca^{2+} auf als die beiden C-terminal gelegenen Domänen. Die Affinitäten der beiden C-terminalen EF-Hand Calcium-Bindedomäne sind relativ hoch und weisen bei Ca^{2+} -Konzentrationen unter 100 nM bereits eine Sättigung auf. Im Gegensatz zu den N-terminal gelegenen Domänen, für die vermutet wird, dass die Ca^{2+} -Bindung *in vivo* mit der Ca^{2+} -Konzentration variiert, bleibt Ca^{2+} immer an die C-terminalen EF-Hand-Strukturen gebunden. Die gute Konservierung der C-terminalen Domänen impliziert, dass diese beiden EF-Hand Calcium-Bindedomänen vermutlich für die Struktur des Calcineurin Holoenzym wichtig sind (Feng & Stemmer, 1999).

Calcineurin B kann am N-Terminus durch Anfügen eines Myristoylrests posttranslational modifiziert werden (Aitken et al., 1982). Die hierfür erforderliche Konsensus-Sequenz lautet Met-Gly-X-X-X-Ser/Thr-. Ein Glycin an Position +2 ist unbedingt erforderlich. Ein Serin oder Threonin an Position 6 und ein Lysin oder Arginin an Position 8 werden außerdem bevorzugt (Resh, 1999). Die Myristoylierung scheint weder einen Einfluss auf die Ca^{2+} -Bindung oder Enzymaktivität noch auf die Assoziation von Calcineurin mit Membranen zu haben. Jedoch erhöht sie die Thermostabilität des Enzyms und verleiht ihm dadurch Strukturstabilität (Kennedy et al., 1996).

Wie für Calcineurin A sind auch im Fall von Calcineurin B mehrere Isoformen nachgewiesen worden, die z.T. durch sehr unterschiedliche Mechanismen entstehen. Zwei Calcineurin B Proteine mit identischer Größe und 98% Sequenzidentität sind in *Drosophila melanogaster* beschrieben worden. Diese Proteine stammen von zwei unabhängigen Calcineurin B Genen ab und werden ebenso wie die beiden zugehörigen Transkripte entwicklungsabhängig reguliert (Warren et al., 1996). In Rattengewebe existieren drei Calcineurin B

Isoformen (Chang et al., 1994; Mukai et al., 1991; Su et al., 1995). Die Calcineurin-Phosphataseaktivität ist in zweifacher Hinsicht von Ca^{2+} -Ionen abhängig: 1.) durch die Ca^{2+} -Bindung an Calcineurin B wird der K_M -Wert der Phosphatase erniedrigt und somit die Affinität für das Substrat erhöht, V_{\max} wird nicht verändert. 2.) Ca^{2+} /Calmodulin Bindung erhöht V_{\max} 5-10-fach, ohne jedoch den K_M -Wert zu beeinflussen (Perrino et al., 1992; Stemmer & Klee, 1994).

1.5 Funktionen von Calcineurin

Calcineurin ist an verschiedensten Signalübertragungskaskaden beteiligt, die die Entwicklung und Funktion von Immun-, Nerven-, Kardiovaskular- und Muskelskelettsystemen steuern.

Insbesondere die T-Zell Aktivierung über Calcineurin und den Transkriptionsfaktor NFAT („*nuclear factor of activated T-cells*“) ist sehr gut untersucht (Übersicht in Hogan et al., 2003). NFAT besteht aus den beiden Untereinheiten NFAT_c und NFAT_n. NFAT_c liegt im unstimulierten Zustand phosphoryliert im Cytoplasma vor. Nach Stimulation von Zelloberflächenrezeptoren kommt es zu einer Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration über die Phospholipase C. $[\text{Ca}^{2+}]_i$ aktiviert über Calmodulin Calcineurin, das daraufhin NFAT_c dephosphoryliert (Crabtree, 2001). NFAT_c wandert in den Kern, bindet dort an NFAT_n und andere Transkriptionsfaktoren wie das Aktivatorprotein 1 (AP-1) und die Expression von Interleukinen wird daraufhin induziert (McCaffrey et al., 1993). NF-AT_n stammt aus der Fos- und Jun-Proteinfamilie von Transkriptionsfaktoren und wird durch Ras/MapK und andere Signalübertragungswege reguliert. Calcineurin wird mit NFAT_c in den Kern transportiert, wo es die Dephosphorylierung und nukleare Lokalisierung des Transkriptionsfaktors aufrechterhält. Ohne Ca^{2+} -Signale oder bei Inhibierung der Calcineurin Aktivität wird NFAT_c durch Kinasen (z.B. GSK3) phosphoryliert und wandert wieder aus dem Kern. Durch die Abhängigkeit von der Ca^{2+} /Calcineurin Signalübertragung ist NFAT in der Lage auf unterschiedliche Ca^{2+} Oszillationen zu reagieren (Dolmetsch et al. 1997; Dolmetsch et al., 1998; Tomida et al., 2003).

Cyclosporin A (CsA) und FK506 zählen zu den wirksamsten Immunsuppressiva und werden bei Organtransplantationen und Autoimmunkrankheiten eingesetzt. Diese Substanzen binden intrazellulär an die

löslichen Rezeptormoleküle Cyclophilin bzw. FK506-Bindeprotein-12 (FKBP12). Sie sind fähig, die Translokation von NFAT_c in den Zellkern und somit die Aktivierung der Immunantwort zu hemmen. Dies geschieht, indem die Komplexe aus CsA/Cyclophilin und FK506/FKBP12 Ca²⁺-abhängig und mit hoher Affinität an Calcineurin binden und dessen Phosphataseaktivität hemmen (Liu et al., 1991). Auch dem polyphenolischen Aldehyd Gossypol wurde von Baumgrass und Mitarbeitern (Baumgrass et al., 2001) eine reversible inhibierende Wirkung zugeschrieben. Im Gegensatz zu CsA und FK506 bindet Gossypol direkt, das heißt ohne zelluläre Rezeptormoleküle, an Calcineurin.

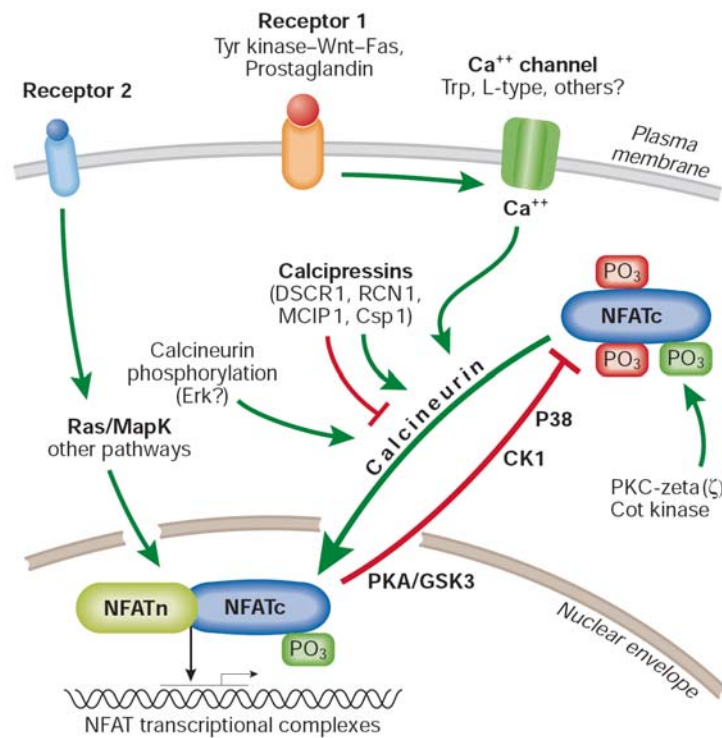


Abb. 4: Signalübertragungswege zur Aktivierung von NFAT. Mehrere vernetzte Signalübertragungswege führen im Kern zum Zusammenbau des NFAT Transkriptionskomplexes aus Calcineurin-abhängigem NFATc und nukleärem NFATn. CK1, Kaseinkinase 1; Csp1, Calcipressin 1; DSCR1, *Down syndrome critical region 1*; Erk, *extracellular-signal regulated kinase*; GSK3, *Glycogensynthasekinase 3*; MCIP1, *myocyte-enriched calcineurin interacting protein 1*; NFAT, *nuclear factor of activated T cells*; PKA, *Proteinkinase A*; PKC, *Proteinkinase C*; RCN1, *regulator of calcineurin 1* (aus Aramburu et al., 2004).

Neben diesen Substanzen gibt es eine Reihe natürlich in der Zelle vorkommender Inhibitoren, die die Calcineurin Aktivität negativ regulieren. Zu diesen Proteinen gehören Mitglieder der DCSR1/MCIP Familie (Rothermel et al., 2000), die an der Entstehung des Down Syndroms beteiligt sind (Fuentes et al., 2000). Andere Klassen der Calcineurin Inhibitoren sind Cabin/Cain Proteine (Sun et al., 1998; Lai et al., 1998) und das CHP Protein (Lin et al., 1999), deren physiologische Bedeutung noch unklar ist.

Auch bei Muskeldifferenzierung und –wachstum spielt Signalübertragung über Calcineurin und NFAT eine wichtige Rolle. Dabei werden sowohl die Skelett- als auch die Herzmuskelentwicklung (Guo et al., 2002; Gajewski et al., 2003; Parsons et al., 2003) reguliert. Über eine Aktivierung von Calcineurin werden zum Beispiel die Herzklappen gebildet (de la Pompa et al., 1998; Ranger et al., 1998). Hypertrophie beider Muskeltypen wird durch Signalwege analog zu denen in den T-Zellen induziert (Molkentin et al., 1998; Chin et al., 1998; Wu et al., 2000).

In Neuronen spielt Calcineurin bei der *axonal guidance* (Chang et al., 1995) und beim Lernen und Gedächtnis (Mansuy, 2003; Lin et al., 2003) eine Rolle. Gedächtnisprozesse werden durch Calcineurin negativ reguliert (Winder & Sweatt, 2001). Darüber hinaus konnten Hirnerkrankungen wie Epilepsie, Alzheimer (Hata et al., 2001; Ermak et al., 2001), und Depression (Wang et al., 2003) mit Calcineurin in Verbindung gebracht werden (Winder et al., 1998; Zhuo et al., 1999).

Auch bei Apoptose (Wang et al., 1999; Asai et al., 1999), Cytoskelettlagerungen (Wei et al., 2004) und Angiogenese (Graef et al., 2001) hat Calcineurin eine wichtige Funktion.

In *S. cerevisiae* und *S. pombe* aktivieren verschiedene Stressarten Calcineurin (Zusammenfassung in Cyert, 2003). Calcineurin dephosphoryliert daraufhin den Transkriptionsfaktor Crz1/Tcn1, ein Homolog von NFAT (Stathopoulos & Cyert, 1997). Die transkriptionale Antwort auf dieses Signal bewirkt eine Kontrolle der Ionenhomeostasis (Nakamura et al., 1993; Mendoza et al., 1994). Einen weiteren Einfluss übt Calcineurin bei der Hefe auf die Zellzykluskontrolle aus. Es ist sowohl an der Einleitung der Mitose (Mizunuma et al., 1998) als auch am *Mating* von Paarungstyp a und α beteiligt (Withee et al., 1997).

In den pathogenen Pilzen *Cryptococcus neoformans* und *Candida*

albicans begünstigt Calcineurin die Virulenz. In *C. neoformans* ist Calcineurin für das Wachstum bei 37°C (Fox et al., 2001), in *C. albicans* für das Überleben im Serum essentiell (Blankenship et al., 2003).

1.6 Calcineurin in *Dictyostelium*

Biochemisch ist Calcineurin aus *D. discoideum* seinen Homologen aus anderen Organismen sehr ähnlich (Hellstern et al., 1997; Aichem & Mutzel, 2001). Calcineurin A (CNA) wird von dem *single-copy* Gen *canA* kodiert und am stärksten in vegetativen Zellen und nach der Aggregation exprimiert (Dammann et al., 1996). Auch Calcineurin B (CNB) wird nur von einem Gen – *cnbA* - kodiert. Aichem und Mutzel (2001) zeigten, dass die kodierende mRNA für CNB durch einen unorthodoxen Mechanismus beginnend mit der frühen Entwicklung prozessiert wird. Dies führt zu einer kürzeren Isoform, die für ein CNB Protein mit einem verkürzten N-Terminus kodiert. Durch die Verkürzung fehlt die Konsensussequenz für eine N-Myristoylierung.

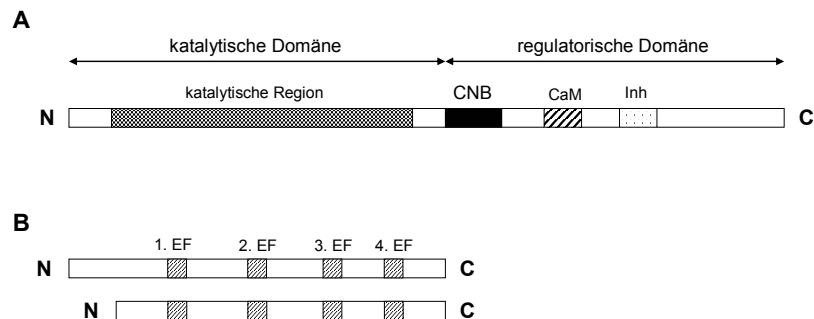


Abb. 5: Domänenstruktur der Calcineurin Untereinheiten Calcineurin A (A) und Calcineurin B (B) aus *Dictyostelium*. CNB, Calcineurin B Bindedomäne; CaM, Calmodulinbindedomäne; Inh, autoinhibitorische Domäne; EF, Calciumbindestelle

Bisher sind Versuche, das Gen für Calcineurin A "auszuknocken" oder die Expression mit antisense mRNA zu reduzieren gescheitert, was darauf hindeutet, dass Calcineurin essentiell für das Wachstum der Zellen ist (U. Kessen und R. Mutzel, unveröffentlichte Ergebnisse). Eine 50-fache Überexpression von CNA ergab dagegen keine detektierbaren phänotypischen Veränderungen,

wahrscheinlich weil intaktes Holoenzym CNA/CNB für die Bindung und Dephosphorylierung der Substrate notwendig ist (Hellstern et al., 1997). Eine 30-fache Überexpression von CNB führte zu einer leicht beschleunigten Entwicklung, wodurch die Morphogenese rekombinanter Populationen 2-3 Stunden früher als bei Wildtypzellen abgeschlossen wurde (F. Fouladi and B. Weissenmayer, unveröffentlichte Ergebnisse). Pharmakologische Inhibierung von CN mit Gossypol ergab Defekte beim Wachstum, der Signalübertragung und der Entwicklung (Weissenmayer et al., 2005).

Bisher war bei *D. discoideum* wenig über die Funktion von Calcineurin bekannt, aber ihm wurde eine wichtige Funktion bei der Aktivierung der Zelldifferenzierung und der Ca^{2+} -Signalübertragung zugeschrieben.

Horn und Gross (1996) beobachteten in in vitro Differenzierungstests bei Wildtypzellen eine Hemmung der Stielbildung durch die Calcineurin Inhibitoren CsA und FK506 während der frühen Entwicklung. Eine sporogene Mutante wurde durch diese Substanzen in der Sporenbildung gehemmt.

PAT1 ist eine PMCA-Typ Ca^{2+} -ATPase der kontraktilen Vakuole von *Dictyostelium*, die bei hohen extrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationen verstärkt exprimiert wird. Die Transkription des Gens für PAT1 wird unter Ca^{2+} Stress durch CsA und FK506 nicht hochreguliert (Moniakis et al., 1999). Dies legt für Calcineurin einen ähnlichen Signalweg wie bei der Aktivierung von NFAT nahe. Coukell und Mitarbeiter (Coukell et al., 2004) identifizierten eine neue, durch Ca^{2+} /Calcineurin regulierte *cup* Genfamilie, die an der Entwicklung beteiligt ist, wodurch CN eine Funktion als Aktivator der Differenzierung zukommt.

Kessen und Mitarbeiter (1999) stellten einen neuen Mechanismus der Calcineurin A Aktivierung vor. Langkettige, ungesättigte Fettsäuren wie Arachidonsäure, Linolsäure oder Ölsäure aktivierten die Calcineurin A Phosphataseaktivität gegenüber *p*-Nitrophenylphosphat (pNPP) und dem RII Phosphopeptid im gleichen Maß wie Ca^{2+} /Calmodulin. Die Aktivierung durch die Fettsäuren und durch Ca^{2+} /Calmodulin war nicht additiv. Es wird angenommen, dass die Fettsäuren mit Ca^{2+} /Calmodulin um die Calmodulin-Bindestelle auf Calcineurin A kompetieren.

Ein weiterer Regulationsmechanismus wurde von Bogumil und Mitarbeitern (Bogumil et al., 2000) beschrieben. Calcineurin kann *in vivo* durch Redoxprozesse reguliert werden. Phenylarsenoxid (PAO) wurde bisher als Hemmstoff für Tyrosinphosphatasen beschrieben. PAO quervernetzt

benachbarte Sulfhydrylgruppen eines Proteins und ahmt so die Bildung von Disulfidbrücken nach. Die dadurch resultierende Konformationsänderung in Calcineurin hemmte die Phosphataseaktivität. Reduzierende Substanzen wie z.B. DTT hatten wiederum einen stark stimulierenden Einfluss auf die Calcineurin Phosphataseaktivität, was sehr effizient durch PAO hemmbar war (Hellstern et al., 1997).

1.7 mRNA Prozessierung

Zur Reifung einer translationsfähigen mRNA sind in Eukaryoten verschiedene Prozessierungsschritte notwendig. Primärtranskripte erhalten am 5' Ende eine *cap*-Struktur, an ihrem 3' Ende einen Poly(A)-Schwanz und werden gespleißt.

Beim Spleißen werden Introns präzise aus mRNA-Vorläufern herausgeschnitten. Das Spleißmuster einiger Primärtranskripte wird durch alternatives Spleißen während der Entwicklung reguliert, um Variationen der Grundstruktur zu erzeugen. Auch bei *D. discoideum* gibt es alternatives Spleißen. Aus dem cAMP Bindeprotein CABP1 entstehen durch Entfernen eines kodierenden Exons zwei mRNA Isoformen (Grant et al., 1990) und damit Proteine unterschiedlicher Größe.

Spleißen wird in den meisten Fällen von Spleißosomen katalysiert. Es gibt jedoch auch autokatalytische RNAs, die in der Lage sind, sich selbst zu schneiden. Ein Beispiel dafür ist die L19-RNA, die aus einem rRNA Vorläufer im Ciliaten *Tetrahymena* entsteht (Zaug et al., 1986).

Reife tRNAs und rRNAs werden in Pro- und Eukaryoten auch durch Spaltung von Primärtranskripten gebildet. Die Spaltung wird von Endonukleasen wie z. B. der Ribonuklease P katalysiert, die in Bakterien, Eukaryoten und Archaeen gefunden wurde. Sie erzeugt das korrekte 5' Ende von tRNA-Molekülen und besteht aus einem katalytisch aktiven RNA-Molekül und mehreren Proteinuntereinheiten (Übersicht in Xiao et al., 2002). Ein zweites Beispiel ist die 3' tRNA prozessierende Endonuklease aus Säugern (Schurer et al., 2001). Sie entfernt 3' Enden von Prä-tRNAs und ist in der Lage mit Hilfe kleiner Leit-RNAs in vitro jede RNA überall zu schneiden (Nashimoto et al., 1998).

Die humane "Flap"-Endonuklease Fen1 ist an der Prozessierung der

Okazaki-Fragmente bei der DNA Replikation sowie an der DNA Reparatur beteiligt (Murante et al., 1995). Es konnte jedoch *in vitro* nachgewiesen werden, dass die Fen1 Nuklease auch RNA als Substrat erkennt. Voraussetzung ist, dass die RNA eine bestimmte Sekundärstruktur einnimmt und dass der 5' Bereich einzelsträngig ist (Stevens, 1998). Im Gegensatz zu humanem Fen 1 benötigt das homologe Enzym aus *Saccharomyces cerevisiae* RAD2 nicht unbedingt ein freies 5' Ende (Harrington & Lieber, 1994). Dieses Enzym bindet auch an einzelsträngige DNA in blasenförmigen Strukturen und schneidet ebenfalls am Anfang des Doppelstrangs (Habraken et al., 1995). Zudem wurde gezeigt, dass das Herpes Simplex Virus UL41 Genprodukt ("virion host shutoff protein", vhs), welches Homologie zu Fen1 aufweist, seine mRNA Substrate in einem Cluster, 3' von einer internen Ribosomen Eintrittsstelle (IRES), schneidet (Elgadi & Smiley, 1999).

Bei der β^0 -thalassämischen β -Globin mRNA Expression entstehen ausgehend von einer fehlerhaften mRNA drei kleinere mRNA Isoformen, die immer dieselbe Größe aufweisen, unabhängig von der Art und der Stelle der Mutation im Gen. Die Ausgangs-mRNA wird dabei immer um dieselben Sequenzlängen am 5' Ende verkürzt, so dass drei Klassen von mRNA Zwischenprodukten hervorkommen (Lim et al., 1989). Ein komplexer Mechanismus, der mRNA Sekundärstruktur und Enzyme wie z.B. strukturabhängige Endonukleasen oder 5' Exoribonukleasen einschließt, wird vermutet (Lim & Maquat, 1992).

1.8 RNA Interferenz

Endogene mRNA kann in Eukaryoten spezifisch durch homologe doppelsträngige RNA (dsRNA) abgebaut werden. Dieser posttranskriptionale Mechanismus wird RNA Interferenz (RNAi) genannt. Die Beobachtung, dass injizierte dsRNA ein Stilllegen von Genen verursacht, wurde als erstes in *C. elegans* gemacht (Fire et al., 1998). Es konnte jedoch bald eine Verbindung zu bereits länger bekannten *Silencing*phänomena wie PTGS in Pflanzen und *Quelling* in *Neurospora* hergestellt werden. Mittlerweile wurde der RNAi-Mechanismus in einer Vielzahl von Organismen gefunden wie zum Beispiel in *Drosophila*, *Trypanosoma*, *Hydra*, Zebrafisch, Frosch und Maus und scheint

daher ein alter, in der Evolution konservierter Mechanismus zu sein. Die Bedeutung von RNAi liegt höchstwahrscheinlich im Schutz vor Viren, Transposons und repetitiven Sequenzen, um die Genomstabilität zu gewährleisten. Neue genetische Analysen zeigen aber auch, dass RNAi eine wichtige Rolle bei der Genregulation spielt. dsRNA führt nicht nur auf der posttranskriptionellen Ebene zu einem Silencing Effekt, sondern kann dies durch DNA Methylierung auch auf der transkriptionellen Ebene bewirken (RDM = RNA mediated DNA Methylation). Im Labor ist RNAi zu einer wichtigen Technik für die gezielte Inaktivierung von Genen geworden, die bisher nicht durch *Knockout* oder Expression von Antisense mRNA ausgeschaltet werden konnten.

Der erste wichtige Schritt beim RNAi-Mechanismus ist die Prozessierung der eingebrachten dsRNA durch das Enzym *Dicer* in kleine Duplexe (21-23 nt), die *small interfering RNAs* (siRNAs) genannt werden. Dicer, eine dsRNA-spezifische RNase III ist konserviert in Pflanzen, *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster*, verschiedenen Pilzen und Säugern. Die Prozessierung beginnt am Ende der dsRNA und setzt sich in 21-23 nt Schritten fort. Die siRNA Fragmente können in einen Proteinkomplex (RISC) eingebaut werden. Der Komplex findet dann seine Ziel-RNA durch den antisense Strang der siRNA und schneidet die mRNA in der Mitte des Hybrids. In *Dictyostelium* wurde ein solcher Komplex in der Größe von 450 kD identifiziert (Novotny et al., 2001).

Zusätzlich amplifiziert eine RNA abhängige RNA-Polymerase (RdRP) das dsRNA Signal und führt zu einem lang andauernden Silencingeffekt auch in Abwesenheit der induzierenden dsRNA. Dabei dient der antisense Strang der siRNAs als Primer für die RdRP, die damit an der endogenen mRNA die Synthese weiterer dsRNA initiieren kann. Der resultierende, von RdRP synthetisierte Doppelstrang stellt wiederum ein Ziel für Dicer dar. In *Dictyostelium* wurden das RdRP-Homolog *rrpA* als Teil des RNAi-Mechanismus identifiziert (Martens et al., 2002).

1.9 Ziele dieser Arbeit

Obwohl beide Untereinheiten der Ca^{2+} /Calmodulin-abhängigen Proteinphosphatase Calcineurin in *Dictyostelium discoideum* bereits charakterisiert wurden (Dammann et al., 1996; Hellstern et al., 1997; Aichem &

Mutzel, 2001), ist die Funktion des Enzyms noch unklar. *Dictyostelium* Zellen, die Calcineurin A überproduzieren, zeigten weder im Wachstum noch in der Differenzierung einen veränderten Phänotyp (Hellstern et al., 1997). Auch die Herstellung eines *Knockouts* von Calcineurin A war nicht möglich. Deshalb wurde in dieser Arbeit speziell auf die Rolle von Calcineurin B eingegangen. Der Gehalt an intrazellulärem CNB sollte durch molekularbiologische Methoden manipuliert werden, zunächst über die Herstellung eines *Knockouts*, aber auch über RNA Interferenz. Bei erfolgreicher Reduktion von CNB sollten die Mutanten mit unterschiedlichen Untersuchungsmethoden auf ein verändertes Verhalten in Phagozytose, vegetativem Wachstum und Differenzierung analysiert werden.

Aichem und Mutzel (2001) zeigten, dass Calcineurin B durch einen neuen unkonventionellen Mechanismus auf mRNA Ebene prozessiert wird. Es wurde angenommen, dass eine entwicklungsregulierte Endonuklease für die Prozessierung verantwortlich ist. Ziel dieser Arbeit war es, die nukleolytische Aktivität mit Hilfe eines genetischen Ansatzes zu identifizieren.