

3 Ergebnisse

3.1 Knockdown von Calcineurin B

3.1.1 Erzeugung des RNAi-Konstrukts gegen *cnbA*

cnbA ist ein *single-copy* Gen, das bei *Dictyostelium* auf Chromosom 1 lokalisiert ist. Um die Funktion von Calcineurin B in *Dictyostelium* zu untersuchen, wurde zunächst der Versuch unternommen, durch homologe Rekombination mit einem Insertionskonstrukt *cnbA* auszuschalten. Dafür wurde in die genomische DNA von *cnbA* mit zusätzlichen *Bpil* Schnittstellen in pDrive kloniert, um keinerlei störende Fremdsequenzen bei der Rekombination zu haben. Mit *Bam*HI wurde eine Blasticidinkassette aus dem Plasmid pBsR479 ausgeschnitten und in entgegengesetzter Richtung in den mit *Bcl*I verdauten Vektor pBW116 ligiert (pKB19). Die Fusions-DNA wurde daraufhin mit *Bpil* aus pKB19 ausgeschnitten und *D. discoideum* Wildtypzellen damit transfiziert. Auf Blasticidinresistenz selektionierte Klone wurden mit „whole cell PCR“ nach Integration der Blasticidinkassette untersucht. Transformierte Zellen wurden dazu wie in Kapitel 2.2.4 beschrieben angezogen. Aus den kleinen Petrischalen wurde für jeden Klon Zellsuspension entnommen und mit Lysepuffer gemischt. 2 µl wurden entnommen und für eine PCR mit den Oligonukleotiden oFUM107 und oFUM108, die 5' bzw. 3' in *cnbA* binden, weiterverwendet. Unter ca. 70 untersuchten Klonen aus unterschiedlichen Transformationen konnte keine *cnbA* Knockout Zelllinie identifiziert werden. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass Calcineurin für *D. discoideum* essentiell und ein Ausschalten des Gens letal ist.

Um dennoch eine Reduzierung der intrazellulären CNB Konzentration zu erhalten, sollten die Zellen über RNA Interferenz manipuliert werden. Dazu wurde ein Plasmid konstruiert, von dem eine gegen *cnbA* gerichtete mRNA transkribiert wird, die sich in Haarnadelstruktur faltet (Abb. 6).

Ausgangspunkt für die Konstruktion war die cDNA von *cnbA*, kloniert in pDrive (pBW104). Von diesem Plasmid wurde mit PCR ein 437 bp langes Fragment mit den Primern oFUM211 und oFUM212 amplifiziert und in *sense* Orientierung in mit *Bam*HI und *Sal*I verdauten pUC18 kloniert, was zu Plasmid pKB05 führte. Im zweiten Schritt wurde pKB06 erzeugt, indem ein längeres *cnbA* Fragment (538 bp), amplifiziert durch oFUM213 und oFUM214, in reverser

Orientierung in mit *Pst*I und *Sa*II verdauten pKB05 ligiert wurde. Beide Fragmente beginnen bei Nukleotid +20 und unterscheiden sich in ihrer Länge um 100 bp, die die Schleife der Haarnadelstruktur bilden. Zuletzt wurden die fusionierten Fragmente in einen mit *Pst*I und *Ba*mHI verdauten pDNeoll Vektor unter die Kontrolle des Actin-6-Promotors subkloniert. Dieses Plasmid - pKB07 - wurde für die Transformation von *Dictyostelium* WT Zellen verwendet.

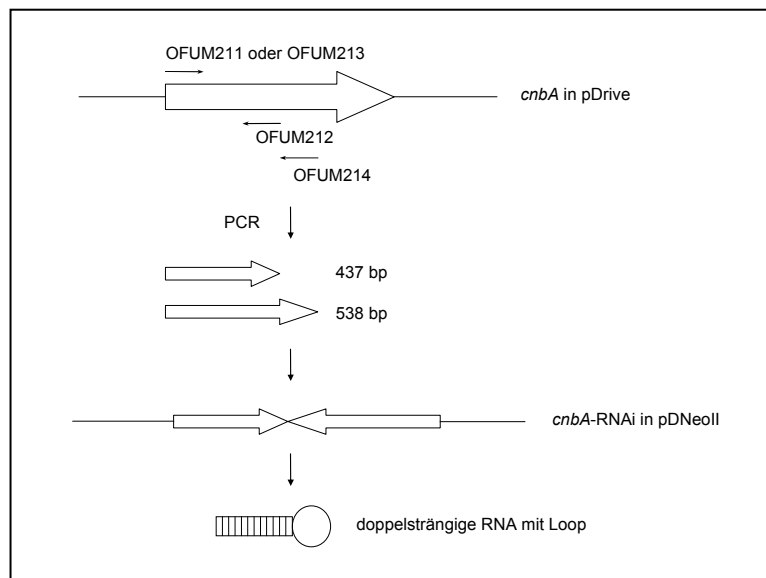


Abb. 6: RNAi Konstrukt gegen *cnbA*. Fragmente von *cnbA* wurden durch PCR unter Verwendung unterschiedlicher Primer mit geeigneten Schnittstellen erzeugt. Das kurze Fragment wurde mit den Primern oFUM211 und oFUM212, das lange mit oFUM213 und oFUM214 amplifiziert. Beide Fragmente wurden dann in entgegengesetzter Richtung in pDNeoll kloniert.

3.1.2 Analyse der CNB Expression

Um zu testen, ob die Expression des RNAi-Konstrukts zu einer Reduzierung der CNB Konzentration führt, wurde die Expression des Proteins in vegetativen Zellen unabhängiger rekombinanter Klone analysiert.

Proteinextrakte wurden elektrophoretisch auf 15% SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt. Nach dem Proteintransfer auf eine Nitrocellulose-Membran wurde CNB mit spezifischen Antikörpern gegen *D. discoideum* CNB detektiert. Western Blots zeigten bei gleicher aufgetragener

Gesamtproteinmenge teilweise deutliche Unterschiede zwischen der CNB Konzentration von Wildtyp- und individuellen Mutantenzelllinien (Abb. 7). In einer Reihe von Zelllinien wie zum Beispiel 01-2 und 01-5 war CNB stark reduziert, in anderen Zelllinien wie 0-14 jedoch nur leicht reduziert.

Zelllinien mit leicht reduzierter CNB Expression zeigten keine oder nur schwache phänotypische Defekte. Phänotypische Veränderungen wurden bei deutlicher Abnahme der CNB Expression stärker. Um die Auswirkungen des *cnbA* mRNA *Silencing* zu charakterisieren, wurden 10 unabhängige Transformanten mit drastisch reduzierter CNB Expression weiter untersucht. Die Phänotypen all dieser Transformanten waren sehr ähnlich zu Zelllinie 01-5, die im Weiteren ausführlicher beschrieben wird.

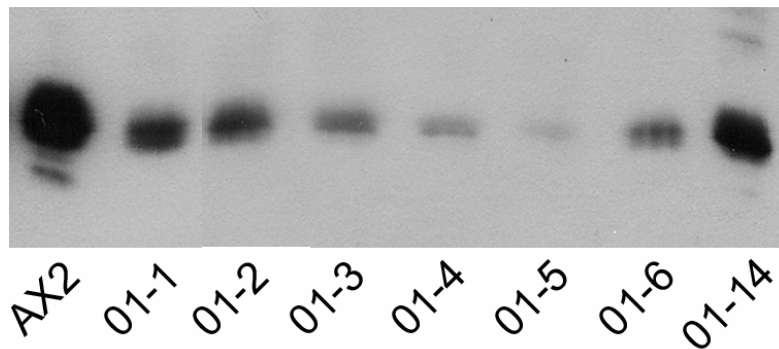


Abb. 7: Expression von CNB in Wildtypzellen und *cnbA* RNAi Mutanten. Gesamtprotein von 5×10^5 vegetativen Zellen wurde auf 15%Polyacrylamid/0.1% SDS Gelen aufgetrennt, auf Nitrocellulose gebロットet, und die Membran dann mit 1:5000 verdünnten CNB-spezifischen Antikörper behandelt.

Das Calcineurin Holoenzym ist ein Dimer aus einer katalytischen (A) und der regulatorischen B-Untereinheit. Während Calcineurin A das katalytische Zentrum der Phosphatase enthält, ist Calcineurin B für die Substratbindung erforderlich. Um die Frage zu klären, ob verminderte CNB Konzentrationen überhaupt einen Einfluss auf den Gehalt an Holoenzym in der Zelle hat, muss das stöchiometrische Verhältnis beider Untereinheiten bekannt sein. In anderen Organismen liegen die beiden Untereinheiten in einem stöchiometrischen Verhältnis von 1:1 (Rusnak 2000) vor. Bei *Dictyostelium* war bisher nur die

intrazelluläre Konzentration von Calcineurin A bekannt, die $0,1 \mu\text{M}$ beträgt (Hellstern, 1997). Für die Bestimmung der CNB-Konzentration wurde eine CNB Verdünnungsreihe und Gesamtprotein aus 5×10^5 Zellen auf Nitrocellulose geblottet. Nach Detektion mit Antikörpern gegen *Dictyostelium* CNB wurde über den Vergleich der CNB Banden des Zellextrakts mit den Banden der bekannten CNB Konzentrationen die Konzentration im aufgetragenen Extrakt ermittelt. Daraus wurde die CNB Konzentration in einer *Dictyostelium*zelle berechnet (siehe 2.3.8). Sie beträgt ca. $0,1 \mu\text{M}$. Calcineurin A und Calcineurin B liegen damit etwa im Verhältnis 1:1 vor.

Ein besonderes Merkmal von CNB ist die Prozessierung einer 206 bp kürzeren mRNA- und 2kDa kürzeren Protein-Isoform während der Entwicklung. Abbildung 8 zeigt im Vergleich CNB aus Wildtyp- und Mutantenzellen zu den Zeitpunkten t0 (vegetative Zellen) und 13 Stunden nach Einleiten der Entwicklung (t13). Auch in den *cnbA* RNAi Mutanten lagen bei t13 beide CNB Protein-Isoformen vor, was darauf hindeutet, dass die Prozessierung der reduzierten *cnbA* mRNA nicht durch den RNAi Mechanismus beeinträchtigt wird.

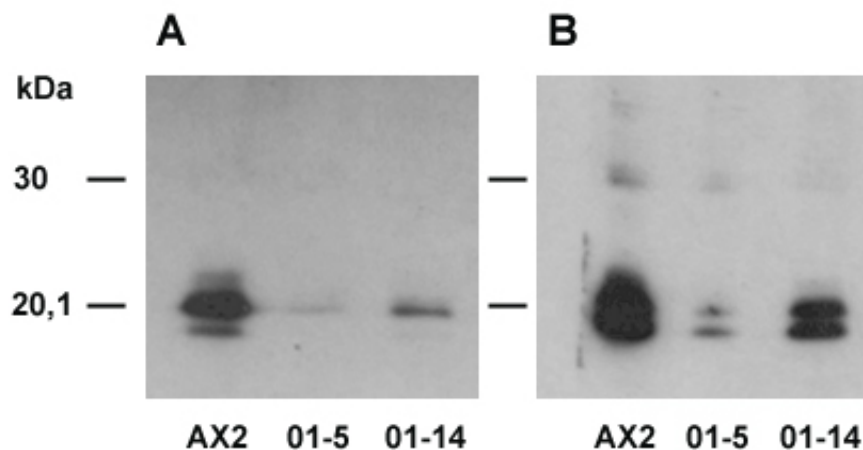


Abb. 8: Entwicklungsabhängige Expression der Calcineurin B Isoformen bei Wildtyp und RNAi Mutanten. Gesamtprotein wurde auf 15%Polyacrylamid/0.1% SDS Gelen aufgetrennt, auf Nitrocellulose geblottet, und die Membran dann mit 1:5000 verdünnten CNB-spezifischen Antikörper behandelt. A: Protein von vegetativen Zellen (t0), B: Protein von Zellen, die bis t13 auf HABP Filtern entwickelt wurden.

3.1.3 Charakterisierung der *cnbA* RNAi Mutante 01-5

3.1.3.1 Analyse der *cnbA* mRNA Expression

Zunächst wurde die Expression von *cnbA* mRNA in Zelllinie 01-5 und AX2 Zellen mit Northern Blotting verglichen. Die Gesamt-RNA stammte aus Zellen, die 8 h auf HABP Filtern entwickelt wurden. Sie wurde auf einem 0.9% Agarose/6.6% Formaldehyd-Gel aufgetrennt, auf Nylonmembran geblottet und mit DIG-markierter *cnbA* Sonde hybridisiert. Abbildung 9 A zeigt, dass bei der rekombinanten Zelllinie nur noch drastisch reduzierte Mengen an endogener *cnbA* mRNA detektiert werden konnte. Ein starkes Signal, das der Größe des RNAi Konstrukts entspricht, weist auf starke Expression des transfizierten Gens hin. Der Abbau sowohl von RNAi als auch von endogener *cnbA* mRNA wird durch den Schmier deutlich, der bei mRNA aus 01-5 Zellen detektiert wird. Bei Northern Blots von anderen auf Proteinebene drastisch gesilenceten Zelllinien (Abb. 9 B) konnten die gleichen Beobachtungen gemacht werden. Allerdings ist es auf Grund der schwachen Signale nicht möglich, mit den graduell unterschiedlichen Proteingehalten gleichermaßen graduell unterschiedliche mRNA Gehalte zu korrelieren.

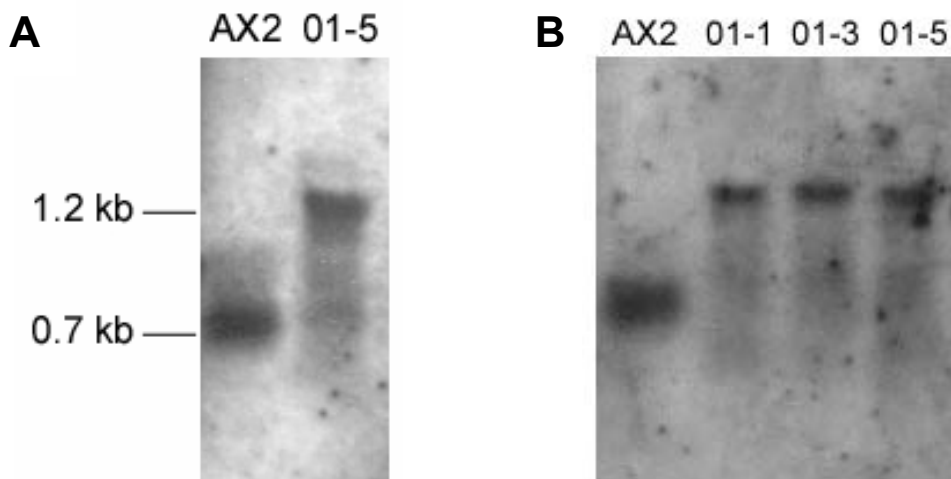


Abb. 9: Expression von *cnbA* mRNA in AX2 und *cnbA* RNAi Mutanten Zellen. Gesamt-RNA wurde aus Zellen isoliert, die 8 h auf HABP Filtern entwickelt wurden. Sie wurde auf einem 0.9% Agarose/6.6 % Formaldehyd-Gel aufgetrennt, auf Nylonmembran geblottet und mit DIG-markierter *cnbA* Sonde hybridisiert. A: Auf der linken Seite sind die Größen der endogen prozessierten *cnbA* mRNA in AX2 und des RNAi Produktes in 01-5 angegeben. B: Expression der mRNA von den *cnbA* RNAi Mutanten 01-1, 01-3 und 01-5.

3.1.3.2 Phänotypische Analyse

3.1.3.2.1 Vegetatives Wachstum

Für Calcineurin wird in *Dictyostelium* eine Beteiligung am Wachstum der Zellen, an der Morphogenese und an der Zelldifferenzierung vermutet (Horn & Gross, 1996; Weissenmayer et al., 2005). Für die Untersuchung des Einflusses von CN auf das vegetative Wachstum wurden Wachstumskurven des Wildtyps und der Mutanten 01-2, 01-5 und 01-14 in AX Medium erstellt. Zwischen den Mutantenzelllinien und dem Wildtyp konnte kein signifikanter Unterschied im vegetativen Wachstum beobachtet werden. Die Verdopplungszeit betrug bei allen Zelllinien ungefähr 9h.

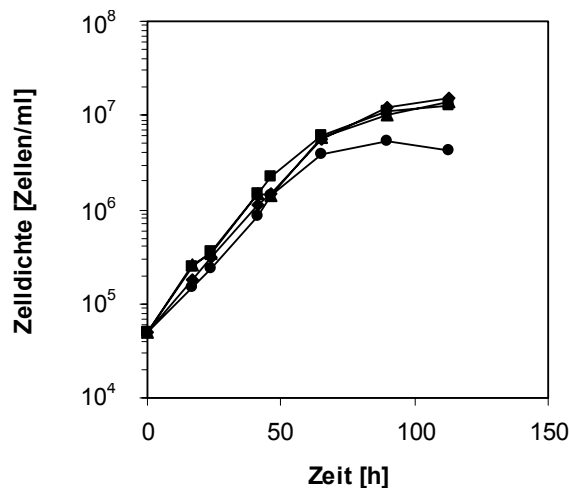


Abb. 10: Wachstum von Wildtyp und *cnbA* RNAi Mutanten in Abhängigkeit der Zeit. Wildtyp AX2 (■) und *cnbA* RNAi Zelllinien 01-2 (◆), 01-5 (●) und 01-14 (▲) wurden in 100 ml AX Medium kultiviert. Alle 16 bzw. 8h wurde die Zellzahl in der Neubauerkammer ermittelt.

3.1.3.2.2 Unterschiede in der Entwicklung

Aggregation

Für die Analyse eines möglichen Entwicklungsdefekts bei *cnbA* RNAi Zelllinien wurde die Entwicklung der Zellen zu Fruchtkörpern durch Entfernen des Nährmediums eingeleitet. Kulturen wurden in SP-Puffer gewaschen und mit einer Zelldichte von 2×10^7 Zellen/ml homogen auf SP-Agar oder einem HABP-Filter verteilt (siehe 2.2.5). Die Aggregation der Mutanten war im Vergleich zum Wildtyp um ca. 3 Stunden verzögert. Viele Amöben fanden nicht in die

Aggregationsströme und blieben auf dem Substrat liegen. Außerdem waren die Aggregationsströme zum Teil unterbrochen (Abb. 11). Diese Beobachtungen deuten auf einen Defekt bei der Chemotaxis hin, was durch Ergebnisse aus Lichtstreuungsversuchen unterstützt wird, die eine verzögerte Reaktion auf cAMP Signale und Ausfall von spike-förmigen Oszillationen ergaben (Daten nicht gezeigt).

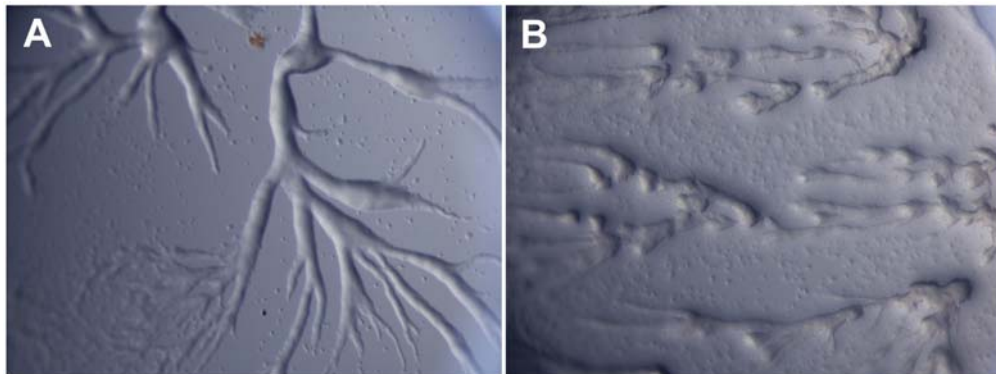


Abb. 11: Aggregationsströme von Wildtyp (A) und Zelllinie 01-5 (B). Zellen wurden gewaschen und in Mikrotiterplatten auf SP-Agar entwickelt. Dokumentation mit Nikon SMZ8000 Mikroskop und Nikon DN100 Digitalkamera.

Slugstadium

Während des Slugstadiums zeigte die Mutante im Vergleich zum Wildtyp längere und dünnere *slugs*. In Filmen, die den Verlauf der Entwicklung dokumentieren, konnte außerdem beobachtet werden, dass die *slugs* anders als der Wildtyp häufig ineinander liefen. Zunächst schienen sie miteinander zu fusionieren, doch dann trennte sich der vermeintlich fusionierte Zellhaufen wieder in zwei selbständige *slugs*.

Fruchtkörperbildung

Bei der Fruchtkörperbildung wurden deutliche Defekte sichtbar. Die Stiele der Fruchtkörper waren signifikant kürzer als bei Wildtyp Fruchtkörpern (Abb. 12). Der mikroskopische Vergleich der Stiele von Wildtyp- und Mutantenfruchtkörpern ergab keinen Unterschied in der Größe einzelner reifer Stielzellen. Auch der Vergleich von Sporenköpfen zeigte keine deutlichen Unterschiede in der Größe.

Um zu untersuchen, ob sich RNAi gegen *cnbA* tatsächlich in erster Linie auf die Stielgröße auswirkt, wurde die Anzahl der Fruchtkörper verglichen, die sich in mit SP-Agar gefüllten Mikrotiterplatten aus 4×10^5 Zellen bildeten (siehe 2.2.8). Die Sporen der entstandenen Fruchtkörper wurden daraufhin eingefroren, nach einem Tag wieder aufgetaut und auf Agar mit *Klebsiella planticola* ausgebracht (durch Einfrieren/Auftauen werden alle Zellen, die sich nicht zu Sporen differenziert haben, abgetötet). Nach drei Tagen Inkubation bei 22°C wurde die Anzahl der Plaques gezählt und damit die Anzahl der keimfähigen Sporen bestimmt. Mutante 01-5 bildete 46 ± 20 Fruchtkörper (n=20). Von den Sporen dieser Fruchtkörper konnten $3,1 \times 10^3 \pm 7 \times 10^2$ (n=5) Klone auf Bakterienrasen wieder auskeimen. Wildtyp AX2 Zellen bildeten 61 ± 36 Fruchtkörper (n=20). Von den Sporen dieser Fruchtkörper konnten $3,1 \times 10^3 \pm 10^3$ (n=5) Klone auf Bakterienrasen wieder auskeimen. Damit wurde durch niedrige CNB Konzentration weder die Anzahl der Fruchtkörperbildung noch die Keimfähigkeit der Sporen beeinflusst.

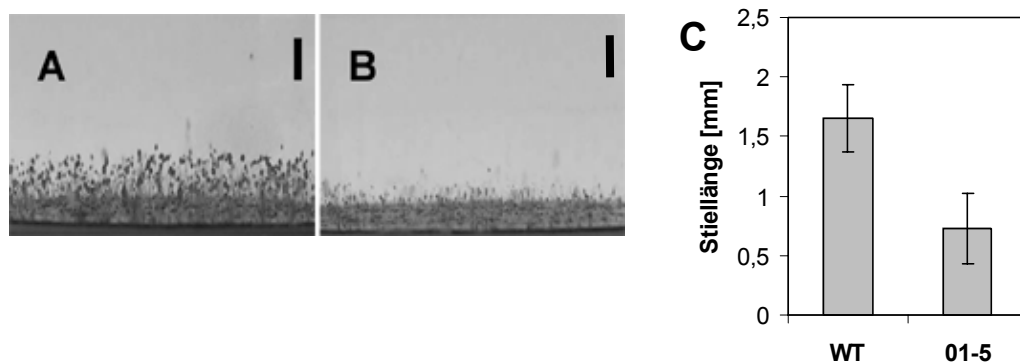


Abb. 12: Vergleich der Stiellängen bei AX2 (A) und Zelllinie 01-5 (B). Zellen wurden zwei Mal mit SP-Puffer gewaschen, 2×10^7 Zellen auf HABP Filtern ausgebracht und bis zur vollständigen Morphogenese inkubiert. Es ist eine Seitenansicht reifer Fruchtkörper gezeigt. Balken, 1 mm. **(C)** Es wurden die Stiellängen von ausdifferenzierten Wildtyp- und Mutantenfruchtkörpern gemessen (siehe 2.2.9). Die mittlere Stiellänge betrug bei Fruchtkörpern von Wildtyp (n=30) $1,65 \pm 0,28$ mm und von Mutante: 01-5 (n=46) $0,73 \pm 0,3$ mm.

3.1.3.2.3 Analyse der Zelltypdifferenzierung

In einem weiteren Experiment sollte untersucht werden, ob die kürzeren Stiele auf eine falsche Verteilung der Prästiel- und Präsporencellen zurückzuführen ist. Dafür wurden Chimären aus Wildtyp- und Mutantenzellen hergestellt. Mit dem GFP exprimierenden Plasmid pDEX-GFP transformierte Wildtypzellen wurden in unterschiedlichen Verhältnissen mit Zellen der Zelllinie 01-5 gemischt. Die Zellgemische wurden auf mit SP-Agar überschichteten Objektgläsern bis zum *slug* Stadium entwickelt und dann mit 25-facher Vergrößerung fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Abbildung 13 A zeigt einen *slug* aus 100% GFP markierten Wildtypzellen. Die Fluoreszenz war so stark, dass keine einzelnen Zellen mehr sichtbar waren. Die Negativkontrolle aus 100% Mutantenzellen (B) wies zwar eine leichte Autofluoreszenz auf, die bei der Auswertung allerdings zu vernachlässigen war. *Slugs* mit 20% (C) bzw. 10% (D) markierten Wildtypzellen zeigten eine gleichmäßige Verteilung der Zellen über die Länge des *slugs*. Damit konnte eine präferenzielle Anordnung der Mutanten in Präsporenregion als Ursache für die kurzen Stiele ausgeschlossen werden.

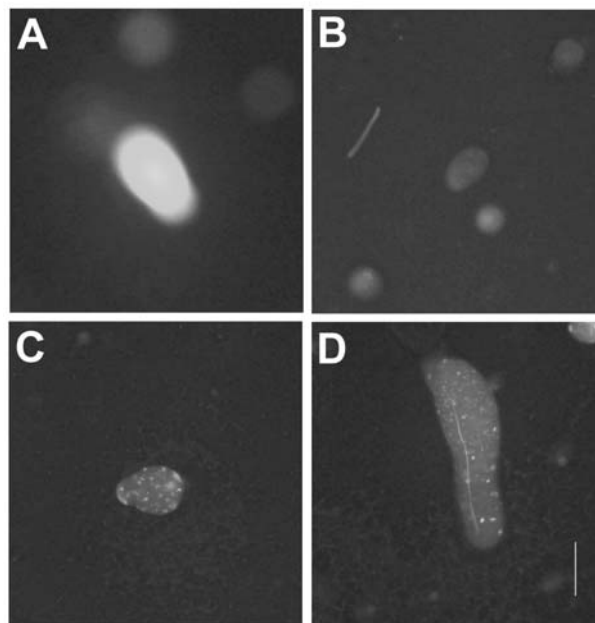


Abb. 13: Chimären aus WT und *cnbA* RNAi Mutante 01-5. GFP markierte Wildtypzellen und unmarkierte Mutantenzellen wurden in unterschiedlichen Verhältnissen gemischt und auf mit SP-Agar überschichteten Objektgläsern bis zum *slug* Stadium entwickelt. Die *slugs* wurden dann mit einem Fluoreszenzmikroskop untersucht. (A) 100% WT Zellen, (B) 100% Mutantenzellen, (C) 20% Mutantenzellen, (D) 10% Mutantenzellen

3.1.3.2.4 Sporenkopf-Morphologie

Neben der bereits mit bloßem Auge zu beobachtenden Bildung kurzer Stiele zeigten viele Fruchtkörper der Zelllinie 01-5 bei genauerer mikroskopischer Untersuchung mit einer Nikon Stereolupe (Nikon SMZ8000) eine oder mehrere zusätzliche, unregelmäßig angeordnete Spitzen, die aus dem Sporenkopf herausragen. Diese „ectopic tips“ wurden in früheren Stadien der Entwicklung wie z. B. *first finger* oder nicht beobachtet, sondern wurden erst während der Kulmination sichtbar. Einige dieser zusätzlichen Spitzen erinnern an den dickeren Teil von Stielen nahe der Basalplatte (z.B. Abb. 14 D, H), andere sind eher der ursprünglichen Spitze ähnlich (z.B. Abb. 14 C). Die Spitze fungiert als Organisatorregion (Kessin, 2001) und inhibiert wirkungsvoll die Bildung zusätzlicher Spitzen. Offensichtlich ist die Spitzendominanz in der RNAi Mutante sehr viel schwächer als im Wildtyp. Die Struktur und Herkunft der zusätzlichen Spitze im Sporenkopf konnte durch Mikroskopieren nicht genauer geklärt werden. Auch Versuche, die Spitzen zu präparieren, um den enthaltenen Zelltyp zu charakterisieren schlugen fehl, da die sehr viskosen Sporenköpfe sich sofort an das Präparationswerkzeug ansaugten.

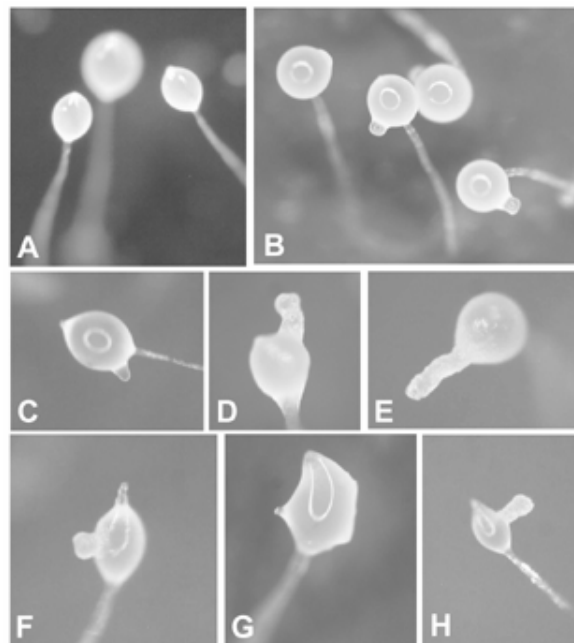


Abb. 14: Bildung ectopischer Spitzen in kulminierenden Fruchtkörpern der Zelllinie 01-5. Zellen wurden auf SP-Agarplatten entwickelt und die Sporenköpfe mit einem Nikon SMZ8000 Mikroskop und einer Nikon DN100 Digitalkamera fotografiert. A: Wildtyp AX2 Fruchtkörper, B-H: Fruchtkörper der Mutante

Die Untersuchung von Schnitten durch die Fruchtkörper sollte näheren Aufschluss über die Herkunft und Beschaffenheit der ektopischen Spitzen geben. Schnitte und lichtmikroskopische Aufnahmen wurden freundlicherweise von Dr. G. Tischendorf und F. Kaulbars angefertigt. Filter wurden mit Glutaraldehyd (GA) getränkt und 3d bei RT inkubiert. Durch Aufsetzen von Tropfen einer 3%igen wässrigen und 40°C warmen low melting-Agarose wurden die noch immer senkrecht stehenden „Stiele mit Fruchtkörpern“ unter Binokular-Beobachtung mit gelierender Agarose umwallt und schließlich vollständig mit dieser benetzt. Die einhüllende Agarose wurde bei 0°C weiter verfestigt. Agaroseblöckchen mit ausgewählten Präparaten wurden mit einem feinen Spatel von der Kulturschale abgehoben und mit 2% Paraformaldehyd, 2,5% GA und 0.2% Tannin für 2.5h bei RT nachfixiert. Nach Auswaschen des Fixativs wurden die Präparate 12h bei RT nachträglich mit Osmium und anschließend mit PB50 pH7.0 mehrfach gewaschen. Zur Einbettung in Kunstharz wurden sie zunächst dehydratisiert und nach Einwirkung von Propylenoxyd (2h) und 50%igem Epoxid-Harz (ERL) in Propylenoxyd (12h) in reines ERL überführt. Die Polymerisation des ERL erfolgte bei 60°C für 2d. Mit dem Ultramikrotom erzeugte 1µm dicke Serien-Semidünnschnitte der Präparate wurden mit einer Azur II und Methylenblau enthaltenden Farblösung für 2 min bei 60°C gefärbt. Die Schnitte wurden mit einem Leitz Ortholux II- Mikroskop (mit Gelbgrünfilter u. Blaufilter CB 16.5 im Strahlengang) unter Verwendung einer Nikon Digital-Kamera Cool PIX 990 fotografiert.

In Abbildung 15 ist der Schnitt durch einen Wildtypfruchtkörper (A) einem Schnitt durch einen Fruchtkörper der Zelllinie 01-5 (B) gegenübergestellt. Man kann sehr gut die Sporen- von den Stielzellen unterscheiden. Die dunkel eingefärbten Sporenzellen sind klein und kondensiert. Stielzellen sind dagegen ungefärbt und durch die Vakuolisierung größer. Der Unterschied zwischen Wildtyp und Mutante besteht in der Form der Stielzellen, die bei der Mutante abgerundeter erscheinen. Außerdem ist im Sporenkopf der Mutante ein Kanal zu erkennen (siehe Pfeil). Dieser Kanal könnte bei der Bildung einer zusätzlichen Spitze eine Rolle spielen.

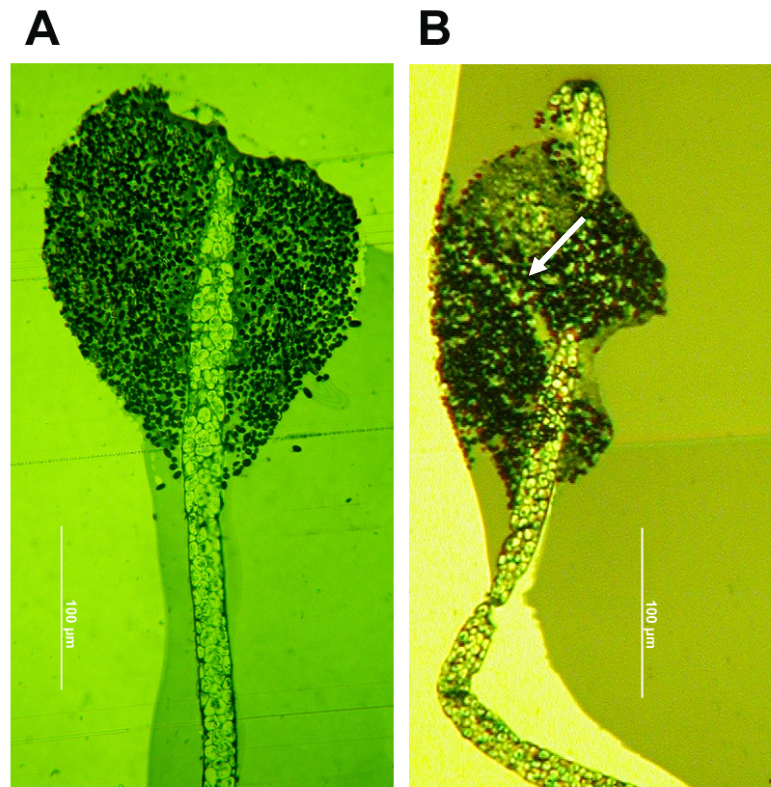


Abb. 15: Schnitt durch Fruchtkörper von Wildtyp (A) und *cnbA* RNAi Mutante (B). Schnitte wurden von mit fixierten ausdifferenzierten Fruchtkörpern hergestellt (Präparation der Schnitte siehe 2.2.10).

3.1.4 Entwicklungsabhängige Expression des prästielspezifischen Gens *ecmB*

Die Expression des prästielspezifischen Entwicklungsmarkers *ecmB* hängt von einem Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration ab (Schaap et al., 1996). Dadurch ist dieses Gen ein Kandidat für die transkriptionale Regulation via Calcineurin.

Für einen Vergleich der *ecmB* Expression über den Verlauf der Entwicklung bei Wildtyp- und Mutantenzellen wurde zu verschiedenen Zeiten (t_x) Gesamt-RNA aus auf HABP Filter entwickelten Zellen isoliert, auf einem 0.9% Agarose/6.6 % Formaldehyd-Gel aufgetrennt und auf Nylonmembran geblottet. Die Detektion erfolgte mit DIG-markierter *ecmB* Sonde. Als Ladekontrolle wurde eine Actin15 Sonde benutzt (siehe 2.4.7).

Die Untersuchung der *ecmB* Expression in AX2 und 01-5 Zellen zeigte eine starke Reduktion der *ecmB* Transkription während der Entwicklung in der

RNAi Mutante (Abb. 16). Im Gegensatz zu Wildtypzellen, bei denen nach 24 Stunden eine deutliche Hochregulation der *ecmB* Transkription zu beobachten ist, erhöht sich der *ecmB* mRNA Gehalt bei 01-5 Zellen über die Entwicklung nur leicht. Damit scheint die Signalübertragung für die Regulation der *ecmB* Expression durch eine verminderte Calcineurin Konzentration beeinflusst zu sein. Die Abnahme der *actin15* Expression in *Dictyostelium* während der Entwicklung ist für die Anwendung als Ladekontrolle nicht ideal. In weiteren Experimenten wurde daher Histon3 als Kontrolle verwendet.

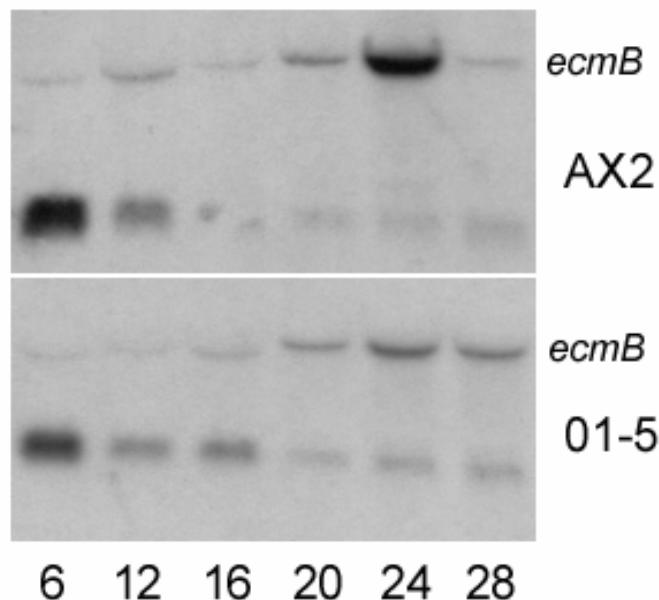


Abb. 16: Expression von *ecmB* in AX2 and 01-5 Zellen. Gesamt-RNA wurde aus Zellen isoliert, die auf HABP Filter die angegebene Zeit (in Stunden) entwickelt wurden. Die RNA wurde auf 0.9% Agarose/6.6 % Formaldehyd Gelen aufgetrennt, auf Nylonmembran geblottet und mit DIG-markierten *ecmB* Sonde hybridisiert. Als Ladekontrolle wurde eine *actin15* Sonde benutzt.

3.1.5 Zell-autonome und nicht Zell-autonome Effekte der RNAi Expression

Zell-autonome Defekte können im Gegensatz zu nicht-autonomen Defekten durch den Wildtyp nicht "kuriert" werden und scheinen daher keine extrazellulären Morphogene zu betreffen. Um zu prüfen, ob es sich bei der Bildung kurzer Stiele und zusätzlicher ektopischer Spitzen um Zell-autonome

oder nicht Zell-autonome Defekte handelt, wurden Wildtyp- und *cnbA* RNAi Mutantenzellen in verschiedenen Verhältnissen gemischt und auf HABP Filtern entwickelt. Die HABP Filter wurden mit einer Canon Digitalkamera seitlich fotografiert (Abb. 17 A). Durch Aneinanderreihung der Bilder lässt sich sehr deutlich erkennen, dass die Stielgröße proportional zum zunehmenden Gehalt an Mutantenzellen abnimmt. Diese Abnahme der Stiellänge mit graduelltem Verlauf deutet daraufhin, dass die Bildung kurzer Stiele ein Zell-autonomer Defekt ist, da ein geringer prozentualer Anteil an Wildtypzellen nicht in der Lage ist, die Wildtyp-Stiellänge wieder herzustellen.

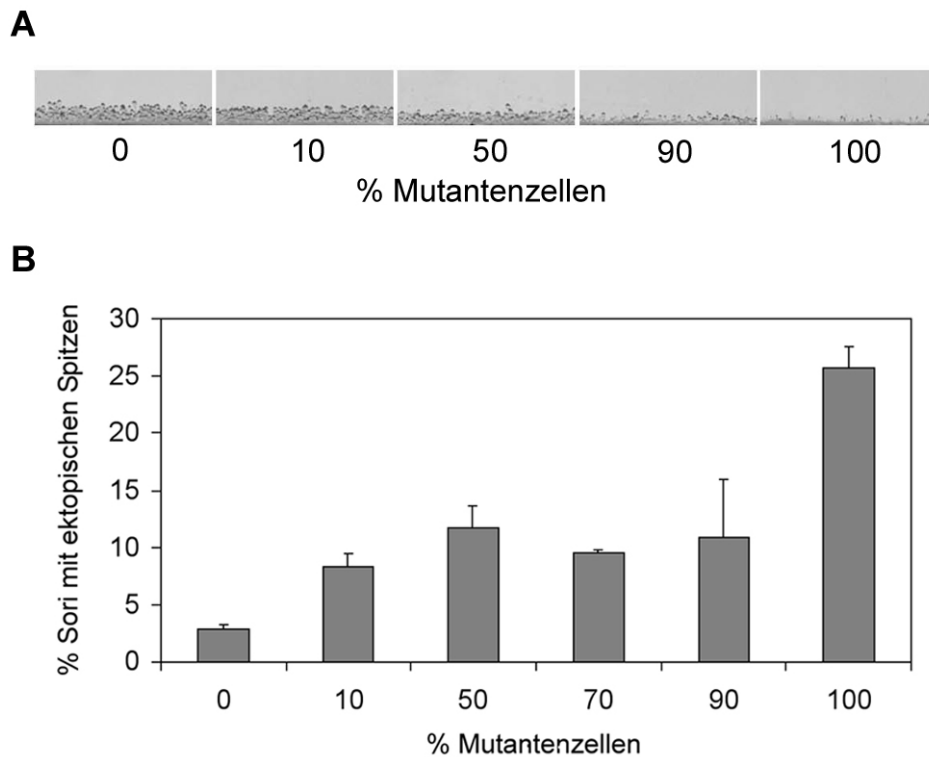


Abb. 17: Analyse von Chimären aus Gemischen von AX2 und 01-5 Zellen. Zelllinien wurden in den angegebenen Verhältnissen gemischt und auf HABP Filtern entwickelt. A: Graduelle Abnahme der Stielgröße in Chimären mit zunehmendem Gehalt an Mutantenzellen. Balken, 1 mm. B: Bildung ectopischer Spitzen in Chimären mit zunehmendem Gehalt an Mutantenzellen. Die Anzahl der Fruchtkörper mit ectopischen Spitzen auf einem ganzen HABP Filter wurden blind gezählt. Es werden Durchschnittswerte \pm SEM aus zwei unabhängigen Versuchen gezeigt.

Im Gegensatz dazu scheint die Bildung zusätzlicher Spitzen auf den sich entwickelnden Sporenköpfen nicht Zell-autonom zu sein. Die Anzahl der Fruchtkörper mit ektopischen Spitzen auf einem ganzen HABP Filter wurden in zwei unabhängigen Versuchen blind gezählt. Nur reine Mutantenpopulationen zeigten in hoher Frequenz zusätzliche Spitzen. Sogar 10% Wildtypzellen konnten wirkungsvoll annähernd normale Spitzenbildung hervorrufen.

3.2 Suche nach der Calcineurin B prozessierenden Nuklease

3.2.1 Prozessierung der *cnbA* mRNA

Von Calcineurin B gibt es in *Dictyostelium* zwei Isoformen. Die kurze Isoform (CNB_S) ist im Gegensatz zum vollständigen Protein (CNB_L) am N-Terminus verkürzt und wird ab der frühen Entwicklung (t6 – t8) exprimiert (Aichem & Mutzel, 2001). Für beide Proteinisoformen konnten in der Größe entsprechende mRNAs nachgewiesen werden, die sich nur in der Länge am 5' Ende unterscheiden. Es wurde daraufhin gezeigt, dass die kodierende mRNA für Calcineurin B durch einen unorthodoxen Mechanismus prozessiert wird. Das Startkodon der *cnbA_S* mRNA ist das zweite ATG der kodierenden Sequenz des *cnbA* Gens und kann nur als Start genutzt werden, wenn das erste ATG durch die Prozessierung entfernt worden ist.

Als Mechanismus für die Prozessierung der mRNA wurde die Verwendung alternativer Promotoren, interne Reinitiation, alternatives Spleißen und ein herkömmlicher mRNA Degradationsmechanismus auf Grund der erzielten Ergebnisse ausgeschlossen. Für die Entstehung der *cnbA_S* mRNA muss ein gezielter, partieller Abbau der *cnbA_L* mRNA stattfinden, aus dem eine funktionelle, verkürzte mRNA hervorgeht. Dieser Mechanismus muss zudem entwicklungsabhängig reguliert sein. Damit liegt eine Prozessierung durch eine entwicklungsregulierte Endonuklease wie zum Beispiel beim β^0 -thalassämischen b-Globin mRNA nahe.

Um die postulierte endonukleolytische Aktivität zu identifizieren, wurde eine genetische Strategie in *Saccharomyces cerevisiae* ausgearbeitet. Für die Identifizierung wurden Hefezellen benutzt, da *E. coli* Zellen infolge translationaler Reinitiation an internen ATG Kodons mehrere rekombinante CNB Proteine bildeten (Aichem). Zunächst sollte geklärt werden, ob in *Saccharomyces cerevisiae* eine ähnliche prozessierende Aktivität wie in *Dictyostelium* existiert. Würde die Expression von rekombinanter *Dictyostelium cnbA* mRNA in der Hefe zu einer Entstehung beider Proteinisoformen führen, könnte die Prozessierungsaktivität durch ein Screening von Hefemutanten mit Deletionen in möglichen RNA-prozessierenden Enzymen identifiziert werden.

Hefezellen, die mit einem Vektor transformiert wurden, der die gesamte *cnbA* mRNA enthält, exprimierten jedoch nur die große Isoform von *Dictyostelium*

CNB. Abbildung 18 A zeigt einen mit Antikörpern gegen *Dictyostelium* CNB behandelten Western Blot. In Spur 1 wurde Zellextrakt aus Zelllinie INVSc1.pKB03 aufgetragen. Als Kontrollen dienten Zellextrakt aus Zelllinie INVSc1.pYES2 (2) und *Dictyostelium* WT Extrakt (3). In Spur 1 wird eine Bande detektiert, die der Größe von CNB_L entspricht (20 kDa). Bei der sehr schwachen, tiefer laufenden Bande, die bei beiden Hefezelllinien zu beobachten ist, handelt es sich sehr wahrscheinlich um CNB aus der Hefe, das auf Grund seiner Homologie mit dem *Dictyostelium* Antikörper kreuzreagiert. Zum Vergleich ist in Abbildung 18 B ein Western Blot zu sehen, auf dem Hefe CNB mit Antikörpern gegen CNB vom Kalb detektiert wurde. Die Größe des nachgewiesenen Proteins von 18 kDa entspricht der Größe der schwachen Bande in Abbildung A.

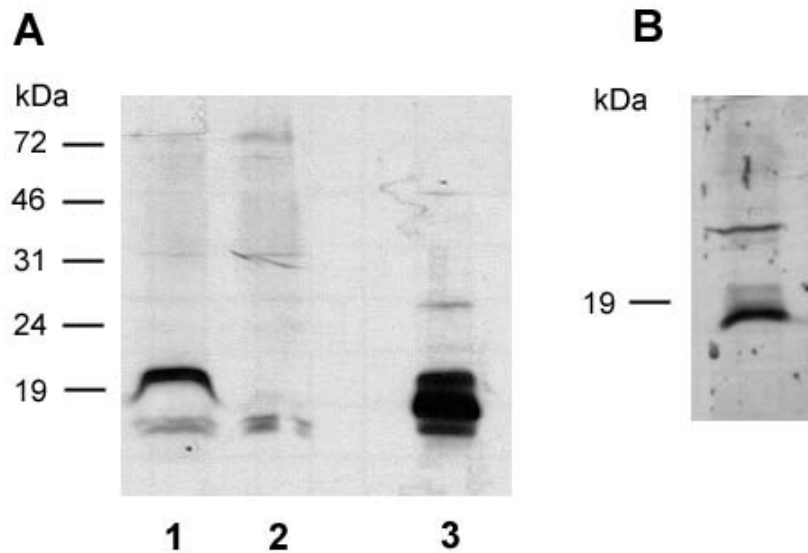


Abb. 18: Expression von CNB in *Dictyostelium* und *S. cerevisiae*. Gesamtprotein wurde auf 15%Polyacrylamid/0.1% SDS Gelen aufgetrennt, auf Nitrocellulose gebロットet. A: *Dictyostelium* CNB aus Hefezellen transformiert mit pYES2.cnbA (1), aus Hefezellen transformiert mit leerem pYES2 und *Dictyostelium* Wildtypzellen detektiert mit 1:5000 verdünntem Antikörper gegen *Dictyostelium* CNB. B: *S. cerevisiae* CNB aus Hefezellen detektiert mit 1:7500 verdünntem Antikörper gegen CNB vom Kalb.

3.2.2 Genetischer Ansatz zur Identifizierung der Nuklease in *S. cerevisiae*

3.2.2.1 Selektionsansatz: Stoppkodon im *cnbA*-Konstrukt

Die Abwesenheit eines prozessierenden Enzyms in der Hefe ermöglichte es, einen genetischen Selektionsansatz zur Identifizierung der prozessierenden Aktivität zu entwickeln. Ausgangspunkt für den Ansatz war ein *Dictyostelium cnbA* cDNA Derivat, bei dem an Position 222 bp zwischen dem erstem und dem zweitem ATG durch Punktmutation ein Tyrosin (TTA)-Kodon durch ein TAA Stoppkodon ersetzt war. Hefezellen, die dieses rekombinante *cnbA* Konstrukt tragen, wurden dann mit einer *D. discoideum* cDNA Bank transformiert. Wenn die *cnbA* mRNA nicht prozessiert wird, wird die am ersten ATG begonnene Translation abgebrochen und kein Protein exprimiert. Wenn durch eine von einer cDNA kodierte Nuklease das erste ATG jedoch abgespalten wird, kann die Translation am zweiten ATG beginnen und das Protein wird exprimiert.

cnbA mit dem Stoppkodon zwischen erstem und zweitem ATG wurde aus pDNeoll-cnb800-27/TAA mit oFUM101 und CNB-3'revBamHI amplifiziert und mit HindIII und BamHI in pYES2 kloniert, was zu pKB04 führte. pYES2 ist ein Expressionsvektor für Hefe und hat einen *gal1* Promotor, der durch Galaktose induziert werden kann und eine Uracil-Markerkassette zur Selektion besitzt. Zusätzlich wurde als Kontrollplasmid pKB03 kloniert, welches die ursprüngliche *cnbA* cDNA enthält und mit den Oligonukleotiden oFUM101 und CNB-3'revBamHI aus pBW108 amplifiziert wurde.

Um Zellen mit prozessierter *cnbA* mRNA selektionieren zu können, wurde in die Mitte der *cnbA* cDNA ein selektierbares Markergen kloniert (Abb. 19). Das Gen kodiert für die 24,1 kDa große Phosphoribosylantranilatisomerase, die den dritten Schritt in der Tryptophanbiosynthese katalysiert und damit die Auxotrophie des verwendeten Hefestamm INVSc1 komplementiert. Rekombinante Hefeklone, die mit einer *Dictyostelium* cDNA Bank transformiert wurden, sollten auf Medium ohne Tryptophan nur wachsen können, wenn die *cnbA* mRNA prozessiert wird. Die *trp1* Kassette wurde mit oFUM208 und oFUM209 aus dem Vektor pAS2 amplifiziert, in pDrive zwischenkloniert und daraus mit BclI in pKB03 und pKB04 kloniert. Hieraus entstanden die Plasmide pKB11 und pKB14.

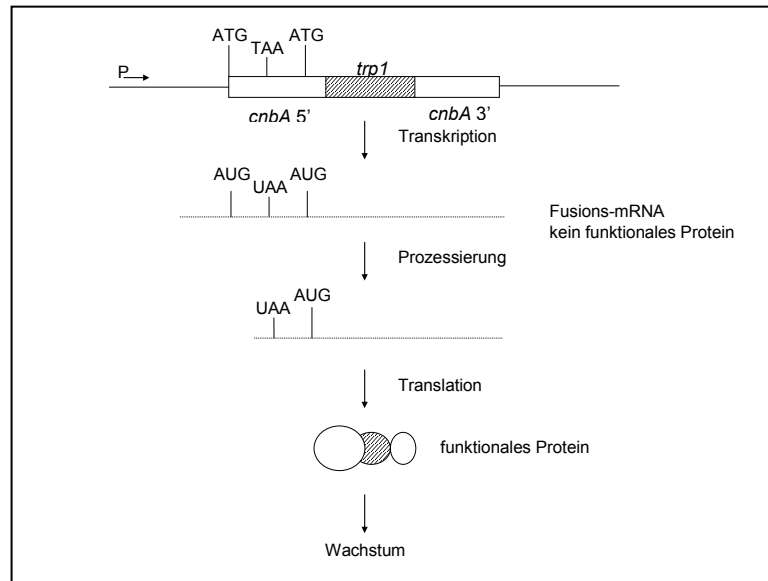


Abb. 19: Selektionsansatz. Das *S. cerevisiae trp1* Gen wurde in die kodierende Region von *cnbA* kloniert und das entstandene Konstrukt in den *S. cerevisiae* Stamm INVSc1 eingebracht. Zellen des rekombinanten Stamms wurden daraufhin mit cDNA Klonen einer *D. discoideum* Expressionsbank transformiert. Eine cDNA-kodierte mRNA-prozessierende Aktivität, die das *cnbA* nichtkodierende 5' Ende und das erste ATG Kodon entfernt, würde eine Translation vom zweiten ATG Kodon ermöglichen und das exprimierte Fusionsprotein könnte den *trp* Defekt komplementieren.

Überraschenderweise konnte der mit pKB14 transformierte *S. cerevisiae* Stamm INVSc1 den translationalen Stopp supprimieren und auf Medium ohne Tryptophan wachsen. Eine Analyse der Proteinexpression mittels Western Blots bestätigte diese Beobachtung. In Abbildung 20 ist ein Western Blot von Zellextrakten der rekombinanten Zelllinien vor und nach Induktion mit 2% Galaktose gezeigt. Wie erwartet exprimierte die Zelllinie INVSc1.pKB03 ein rekombinantes CNB, allerdings bereits ohne Induktion durch Galaktose. Gleichermäßen erwartungsgemäß verhielt sich die Zelllinie INVSc1.pKB11. Nicht induziert ist kein Protein detektierbar, aber nach Induktion kam es zu einer sehr starken Expression des Fusionsproteins aus CNB und TRP1 mit einer Größe von ca.45 kDa. Die extrem starke Expression führte einerseits offenbar zur Bildung von stabilen Dimeren, was die Bande in Größe von ca. 90 kDa erklärt. Zum anderen fand ein verstärkter Proteinabbau statt. Im Gegensatz zu den Kontrollplasmiden schien das Konstrukt mit dem Stoppkodon die Expression zu

verhindern: Die Zelllinie INVSc1.pKB04 exprimierte kein CNB. Allerdings sah das Ergebnis von Zelllinie INVSc1.pKB14 ganz anders aus. Vor Induktion war zwar noch kein Protein nachzuweisen, doch induziert wird trotz Stoppkodon das Fusionsprotein exprimiert, obwohl es in mindestens 50-fach geringerer Menge vorlag als das Protein, das vom nicht mutierten Fusionskonstrukt exprimiert wurde.

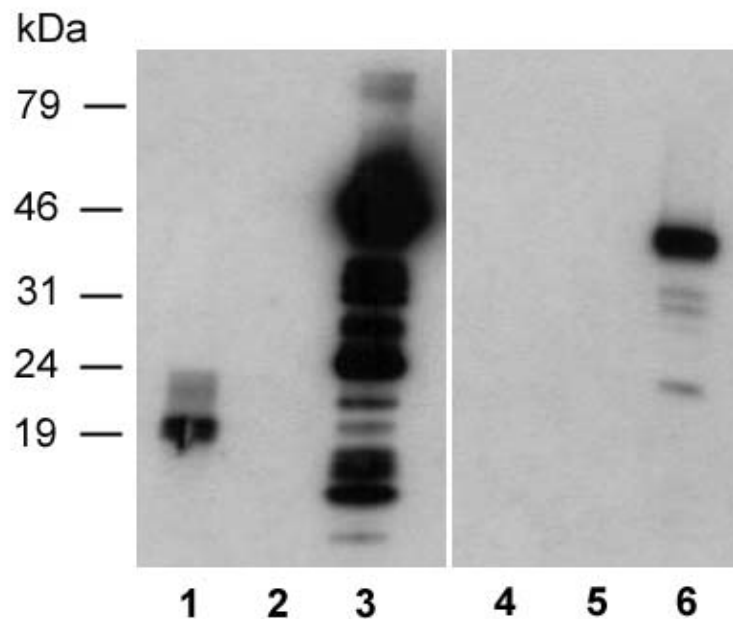


Abb. 20: Expression der *cnbA* Konstrukte in *S. cerevisiae*. Gesamtprotein rekombinanter Hefezellen wurde auf 15%Polyacrylamid/0.1% SDS Gelen aufgetrennt, auf Nitrocellulose geblottet, und die Membran dann mit 1:5000 verdünnten CNB-spezifischen Antikörper behandelt. (1) *cnbA*, (2) *cnbA::trp1*, (3) *cnbA::trp1* induziert, (4) *cnbA/TAA* induziert, (5) *cnbA/TAA::trp1*, (6) *cnbA/TAA::trp1* induziert

3.2.2.2 Selektionsansatz: *in vitro* Mutagenese von *trp1* zur Einführung eines Stoppkodons in der Tryptophan-Kassette

Um den translationalen Suppressionseffekt zu reduzieren, wurde ein zweites TAA Stoppkodon eingefügt, dieses Mal in das Markergen *trp1*. Dafür wurde mit dem neuen 5' Primer oFUM231 an Position 16 bzw. 17 ein T und ein C jeweils durch A ausgetauscht (Abb. 21). Diese veränderte TRP1-Kassette wurde dann wie bereits bei pKB11 und pKB14 beschrieben in pKB03 und pKB04

kloniert, was zu pKB16 und pKB17 führte. Verblüffenderweise konnten immer noch 50% der mit diesem Konstrukt transformierten Hefeklonen wachsen. Wegen der erstaunlichen Fähigkeit von Hefezellen, translationale Stopp-Signale zu supprimieren, wurde der Selektionsansatz nicht weiter verfolgt.

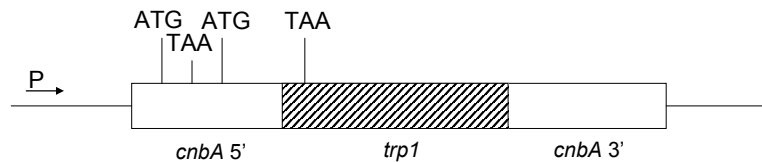


Abb. 21: Selektionskonstrukt mit zwei Stoppkodons. Ein zweites TAA Stoppkodon wurde in das Markergen *trp1* eingefügt. dieses Mal. Mit einer PCR wurde an Position 16 bzw. 17 ein T und ein C jeweils durch A ausgetauscht. Diese veränderte TRP1-Kassette wurde dann wie bereits bei pKB11 und pKB14 beschrieben in pKB03 und pKB04 kloniert.

3.2.2.3 Screeningansatz

Wegen der Fähigkeit von *S. cerevisiae* zwei translationale Stopps innerhalb desselben Fusionskonstruktes zu supprimieren, wurde eine neue Strategie zur Identifizierung der *cnbA* mRNA entwickelt. Western Blots hatten gezeigt, dass die Kreuzreaktion des *Dictyostelium* Antikörpers mit CNB aus *S. cerevisiae* relativ gering und das Signal von rekombinantem CNB um ein vielfaches stärker war (siehe Abb. 20). Ferner führt die translationale Suppression zwar zu einer Expression von CNB, sie ist jedoch sehr viel geringer als die der Kontrollzelllinie ohne Stoppkodon. Auf diesen Ergebnissen aufbauend, wurde ein Screeningansatz entwickelt, bei dem die prozessierende Aktivität durch Screenen für CNB Expression auf "Colony Blots" identifiziert werden sollte. Hefezellen, die das *cnbA* Expressionskonstrukt pKB04 mit einem TAA Stoppkodon zwischen erstem und zweitem ATG Kodon tragen, sollten mit einer *D. discoideum* cDNA Bank transformiert werden. Prozessierung des 5' Endes von *cnbA* durch eine in der Bank kodierte prozessierende Aktivität würde zur Expression von großen Mengen an CNB führen, das durch Colony Blots mit Antikörpern gegen *Dictyostelium* CNB detektiert werden kann.

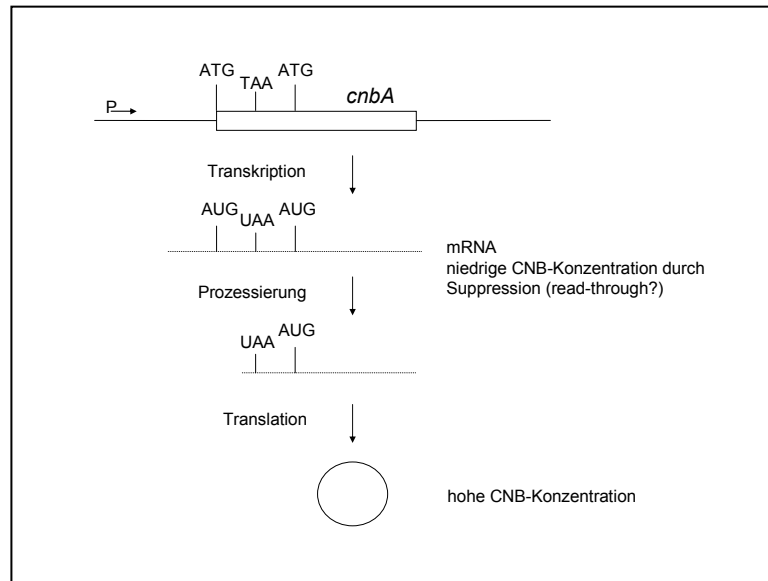


Abb. 22: Screeningansatz. Hefezellen, die ein *cnbA* Expressionskonstrukt mit einem TAA Stoppkodon zwischen erstem und zweitem ATG Kodon trugen, wurden mit einer *Dictyostelium* cDNA Bank transformiert. Prozessierung des 5' Endes von *cnbA* sollte zu einer Expression von großen Mengen an CNB führen, was durch Colony Blots mit Antikörpern gegen *Dictyostelium* CNB detektiert werden kann.

3.2.3 Etablierung und Optimierung der Screeningmethode

Mit pKB03 oder pKB04 transformierte Zellen wurden auf Minimalmedium-Agarplatten ohne Uracil ausplattiert. Dem Medium wurde zur Induktion des pYES2 Promotors statt Glukose 2% Galaktose zugegeben. Die Platten wurden mindestens 4 Tage bei 28°C inkubiert. Wenn die Kolonien groß genug waren, wurde eine Nitrocellulosemembran auf die Agarplatten gedrückt, so dass die Kolonien Abdrücke auf der Membran hinterließen (siehe 2.3.7). Von der Membran wurden mit TBS Puffer Zelldebris abgewaschen und mit den Membranen wurde dann weiter verfahren wie bei klassischem Western Blotting (siehe 2.3.6). Einzelkolonien der Zelllinie INVSc1.pKB04 ergaben mit Antikörpern gegen *Dictyostelium* CNB kein Signal und wurden bei den Screenings als Negativkontrolle verwendet. Bei der Positivkontrolle INVSc1.pKB03 dagegen waren die Kolonien auf den Blots als schwarze Punkte zu erkennen (Abb. 23 A). In Mischungsexperimenten mit den Zelllinien INVSc1.pYES2, INVSc1.pKB03 und INVSc1.pKB04 wurde dies bestätigt. Zellen wurden in unterschiedlichen Verhältnissen gemischt und ihre CNB Expression auf Colony Blots untersucht.

Das Verhältnis von auf einem Colony Blot detektierten Kolonien zu der Gesamtzahl an Kolonien auf der zugehörigen Agarplatte war gleich dem Mischungsverhältnis der Zellen (Abb. 23 B). Damit konnte der Screeningansatz über Colony Blotting für die Identifizierung einer nukleolytischen Aktivität eingesetzt werden.

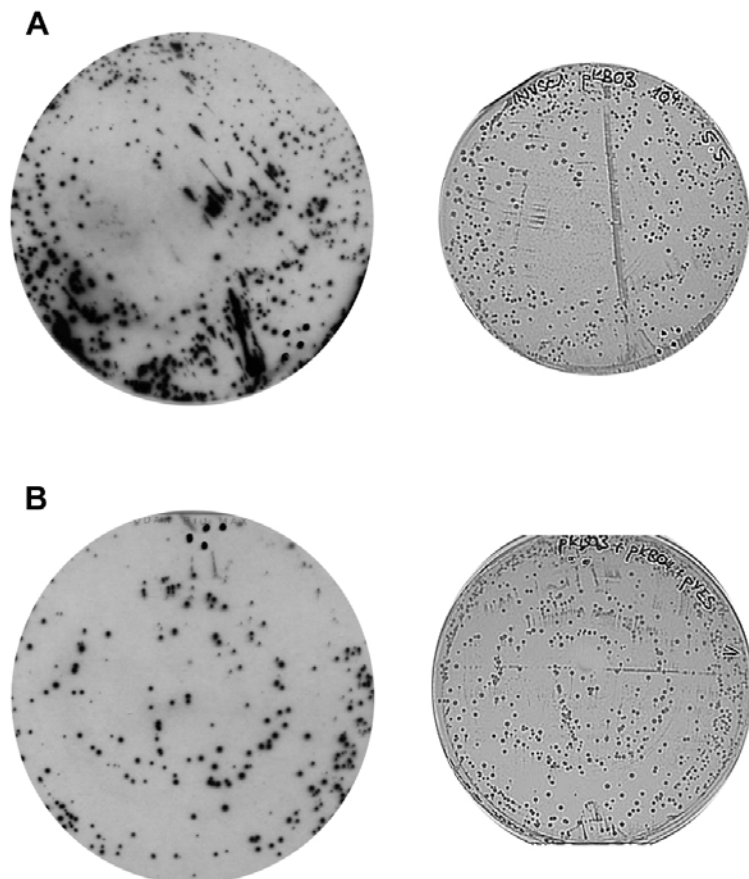


Abb. 23: Colony Blots von *S. cerevisiae* Klonen, die *cnbA* Konstrukte exprimieren. Agarplatten mit Einzelkolonien (rechte Seite) wurden auf Nitrozellulosemembran abgedrückt und die Membran wie ein Western Blot weiterbehandelt. Die Detektion erfolgte mit Antikörpern gegen *Dictyostelium* CNB (linke Seite). A: Nur INVSc1.pKB03 Zellen, B: Gemisch aus INVSc1.pYES2, INVSc1.pKB03 und INVSc1.pKB04 (jeweils 1/3).

3.2.4 Untersuchung der Qualität und Kompatibilität der cDNA Bank

Ein wichtiger Test vor dem Beginn der Screeningprozedur war die Prüfung der cDNA Bank. Es musste gewährleistet sein, dass sowohl cDNA von dem Bankplasmid pACT2 im Stamm INVSc1 exprimiert werden kann, als auch dass die Komplexität der Bank groß genug ist, um die Identifizierung des gewünschten Klons wahrscheinlich zu machen. Für die Kontrolle der Expression wurde die *Dictyostelium cnbA* cDNA verwendet. Die cDNA wurde mit *XhoI* und *NcoI* aus pBW104 ausgeschnitten und mit denselben Schnittstellen in pACT2 kloniert. pACT2 besitzt einen Promoter für das Alkoholdehydrogenase Gen und eine Leucinmarkerkassette zur Selektion. Zellextrakte von mit diesem Konstrukt (pKB10) transformierten Hefezellen wurden auf 15% Polyacrylamid/0.1% SDS Gelen aufgetrennt, auf Nitrocellulose geblottet und mit Antikörpern gegen *Dictyostelium* CNB behandelt (Abb. 24). Auf dem Western Blot ist in Spur 2 zu sehen, dass *cnbA* von pACT2 sehr stark exprimiert wurde.

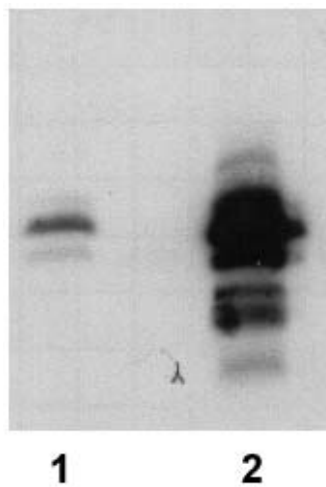


Abb. 24: Expression von *cnbA* in pACT2 in *S. cerevisiae*. Gesamtprotein rekombinanter Hefezellen wurde auf 15%Polyacrylamid/0.1% SDS Gelen aufgetrennt, auf Nitrocellulose geblottet, und die Membran dann mit 1:5000 verdünnten CNB-spezifischen Antikörper behandelt. (1) *Dictyostelium* WT, (2) INVSc1.pKB10

Die Komplexität der cDNA Banken von vegetativen und sich entwickelnden *Dictyostelium* Zellen wurden grob abgeschätzt. *E. coli* Zellen wurden mit den Banken transformiert und aus jeweils 12 Klonen wurden die

Plasmid-DNA isoliert. Die Plasmide wurden dann mit den Restriktionsenzymen verdaut, die für die Erstellung der Bank benutzt wurden (*XhoI* und *EcoRI*) und die Größe der entstanden Fragmente wurde auf Agarosegelen analysiert.

Tab. 5: Vergleich der cDNA Fragmente in *D. discoideum* cDNA Banken

<i>D. discoideum</i> cDNA Bank	vegetativ	differenziell
getestete Klone	12	11
Plasmide ohne Insert	8	3
cDNA > 1 kb	1	5
cDNA < 1 kb	2	3

Während bei der cDNA Bank aus vegetativen Zellen nur 8% der Klone ein Plasmid mit einem cDNA Insert größer als 1 kb besaßen, war das Ergebnis der Bank aus differenzierenden Zellen mit 45% Inserts größer als 1 kb deutlich besser. Diese Bank erfüllte die Voraussetzung für einen Einsatz im Screening.

3.2.5 Screening

Da nun die Grundlagen für ein erfolgreiches Screening geschaffen waren, wurde begonnen Zelllinie INVSc1.pKB04 mit der differentiellen cDNA Bank zu transformieren. Transformierte Zellen wurden auf Minimalmedium-Agarplatten ohne Uracil und Leucin ausplattiert. Dem Medium wurde zur Induktion des pYES2 Promotors statt Glukose 2% Galaktose zugegeben. Die Platten wurden mindestens 4 Tage bei 28°C inkubiert und daraufhin auf Nitrozellulosemembranen gedrückt und mit Antikörper gegen CNB aus *D. discoideum* behandelt.

Auf diese Weise wurden bis jetzt ca. 25 000 Klone analysiert. Bei jeder Runde wurden Kolonien der Zelllinie INVSc1.pKB03 als Positiv- und Kolonien der Zelllinie INVSc1.pKB04 als Negativkontrolle mit untersucht.

Colony Blots wurden nach schwarzen Punkten abgesucht, deren Position deckungsgleich mit einer Hefe-Kolonie war. Solche möglichen Kandidaten wurden dann gepickt, ausgestrichen und von diesen Ausstrichen erneut ein

Colony Blot durchgeführt. Dieses „Re-Screening“ sollte das Aussieben von fälschlicherweise als positiv identifizierten Klonen als auch die Aufreinigung von echten positiven Klonen gewährleisten.

Nach mehreren Runden des Re-Screenings ließen sich 5 Klone als positiv bestätigen (Abb. 25). Aus diesen Klonen wurden daraufhin die Plasmide isoliert, in *E. coli* transformiert und dann aus *E. coli* isoliert. pKB04 Plasmide wurden verworfen und pACT2 Plasmide mit unbekanntem Insert mit *Eco*RI und *Xho*I verdaut. Zwei der verdauten Plasmide trugen ein Insert mit der Größe von 1,2 kb bzw. 2,7 kb, aus zwei Plasmiden konnte kein detektierbares Insert herausgeschnitten werden und ein Plasmid ließ sich nicht mehr mit *Eco*RI und *Xho*I schneiden.

Trotzdem wurden alle fünf Plasmide in die Zelllinie INVSc1.pKB04 rücktransformiert. Nur wenn bei den Rücktransformanten aufs Neue ein positives Signal auf Colony Blots zu detektieren wäre, sollten die pACT2 Plasmide sequenziert werden. Allerdings war dies bei keinem der 5 Rücktransformanten nach zwei unabhängigen Rücktransformationen der Fall.

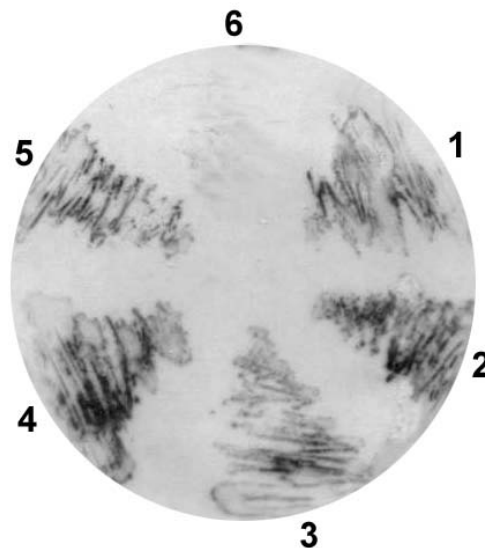


Abb. 25: Colony Blot von als positiv isolierten Klonen. Klone wurden mit einer *Dictyostelium* cDNA Bank transformiert, mit Colony Blotting isoliert und über mehrere Runden Re-Screening gereinigt. Klone wurden für den Colony Blot ausgestrichen, auf Nitrozellulosemembranen abgedrückt und mit Antikörpern gegen CNB behandelt. 2: Positivkontrolle, 6:Negativkontrolle, 1,3,4,5: als positiv isolierte Klone.