

4 Diskussion

4.1 Reduktion der mRNA für Calcineurin B

4.1.1 Die Calcineurin B Konzentration wird in *D. discoideum* durch RNAi reduziert

Zu Beginn dieser Arbeit war RNA Interferenz (RNAi) als Methode zur Stilllegung von Genen in eukaryontischen Organismen noch nicht sehr verbreitet. Für *Dictyostelium* wurde dieser Mechanismus erstmals von Martens und Mitarbeiter im Jahr 2002 beschrieben. In dieser Publikation wurde gezeigt, dass in den Amöben durch RNAi sowohl mRNA als auch Protein von Mitgliedern der Discoidin Genfamilie deutlich reduziert war. In manchen Fällen war die Reduktion so stark, dass im Western Blot kein Protein mehr nachgewiesen werden konnte.

Um Calcineurin B in *D. discoideum* mit RNAi zu reduzieren, wurde in dieser Arbeit ein Konstrukt mit zwei inversen Wiederholungen des Gens, die durch einen ungepaarten *loop* getrennt sind, unter der Kontrolle des konstitutiven Actin-6 Promotors exprimiert. Nach der Transformation des Konstrukts in den Wildtyp konnten mehrere Zelllinien mit reduzierter CNB Konzentration isoliert werden. Wie bereits von Martens und Mitarbeitern beobachtet, variierte die Reduktion zwischen individuellen Klonen sehr stark. Einige Zelllinien zeigten im Vergleich zum Wildtyp keinen veränderten CNB Gehalt, bei anderen wiederum war die Konzentration drastisch verringert. Auffallend war auch, dass unter ca. 50 untersuchten Zelllinien keine ohne nachweisbare CNB Expression isoliert werden konnte (siehe 4.1.2). Die Variation in der Reduktion kann zunächst damit erklärt werden, dass die Anzahl der in eine Zelle transformierten Plasmide und deren Integration in das Genom unterschiedlich ist. Je mehr Kopien des Konstrukts in der Zelle vorliegen, desto stärker ist die Expression von dsRNA und desto stärker sollte der RNAi Effekt sein. Ähnliches gilt für den Integrationsort. Integriert das Plasmid an eine Stelle im Genom, die transkriptional aktiver ist, wäre ein stärkerer RNAi Effekt zu erwarten. Trotzdem verwundert die unterschiedliche Reduktion, da bekannt ist, dass *D. discoideum* mit einer RNA abhängigen RNA-Polymerase (RdRP) das dsRNA Signal zusätzlich amplifiziert und zu einem lang andauernden Silencingeffekt auch in Abwesenheit der induzierenden dsRNA

führt. Damit dürfte es keine Rolle spielen, welche Ausgangsmenge an dsRNA vorliegt. 2001 konnten Caplen und Mitarbeiter (2001) jedoch zeigen, dass das Silencing durch RNAi, unabhängig davon ob das dsRNA Signal durch RdRP-Aktivität verstärkt wird oder nicht, besser zu funktionieren scheint, wenn mehr dsRNA vorliegt. Ein Überschuss an dsRNA kann auf der einen Seite mehr siRNAs erzeugen, um der Verdünnung durch Zellteilung entgegenzuwirken und auf der anderen Seite andere dsRNA verdrängen, die ebenfalls an RNAi-spezifische dsRNA-Bindeproteine gebunden sind, da diese allgemein eine niedrige Sequenzspezifität besitzen.

Sequenzspezifität spielt auch im Hinblick auf die Ziel-mRNA eine wichtige Rolle. Wie oben angedeutet, ist es möglich mit einem RNAi-Konstrukt mehrere Mitglieder einer Genfamilie stillzulegen, wenn die exogene RNA homologe Sequenzen zu den konservierten Bereichen dieser Familie enthält. Damit stellt sich die Frage, ob grundsätzlich die Möglichkeit besteht, dass ungewollt auch andere mRNAs durch RNAi stillgelegt werden, wenn sie homologe Bereiche zu der eigentlichen Ziel-mRNA besitzen. Damit wäre die Spezifität von RNAi fragwürdig und phänotypische Veränderungen könnten nicht mehr zweifelsfrei einem Gen zugeordnet werden. Um die Frage speziell für das *Knockdown* von Calcineurin B zu beantworten, wurde mit der Sequenz der cDNA von *cnbA* nach identischen Sequenzen in einer *D. discoideum* cDNA Datenbank gesucht. Es zeigte sich, dass nur eine einzige cDNA existiert, die über einen Bereich von mehr als 21 bp homolog zu *cnbA* ist. Es handelt sich dabei um eine 23 bp lange Sequenz einer cDNA, die vermutlich für ein G-Protein-gekoppeltes Rezeptor-ähnliches Protein kodiert. Über dieses vorhergesagte Protein gibt es jedoch keine weiteren Informationen. mRNAs, die identische Bereiche von weniger als 20 bp enthalten, sind wahrscheinlich kein Ziel für die aus dsRNA entstandenen siRNAs, da diese kurzen RNAs 21-23 bp lang sein müssen, um an die endogene mRNA binden zu können.

Da Calcineurin ein Holoenzym aus der katalytischen Untereinheit CNA und der regulatorischen Untereinheit CNB ist, musste geklärt werden, ob eine Reduktion der CNB Konzentration überhaupt eine Auswirkung auf den Gehalt an Holoenzym in der Zelle hat. 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 μM beträgt (Hellstern et al., 1997). Über den

Vergleich der CNB Menge aus einer definierten Anzahl Zellen mit einer bekannten CNB Menge wurde die CNB Konzentration in einer *Dictyostelium*-Zelle ermittelt. Sie beträgt ca. 0,1 μM . Calcineurin A und Calcineurin B liegen damit etwa im Verhältnis 1:1 vor und man kann erwarten, dass eine verminderte CNB Konzentrationen einen Einfluss auf den Gehalt an Holoenzym in der Zelle hat.

4.1.2 Ist Calcineurin essentiell für das vegetative Wachstum?

Die Manipulation von Calcineurin war in *D. discoideum* bisher nur in Form einer Überexpression der beiden Untereinheiten erfolgreich, was jedoch keine deutlichen Hinweise zur Aufklärung seiner Funktion erbrachte. Es gelang nicht, eine Deletion des Calcineurin A-Gens zu erzeugen. Unter mehreren hundert analysierten Klonen fand sich kein einziger mit einer Insertion des Markers in das Gen für CNA (Kessen, 2000). Auch Versuche, die Calcineurin A Expression durch „antisense-Mutagenese“ abzuschwächen, scheiterten an der Instabilität der erhaltenen Transformanten (Kessen, 1999). In dieser Arbeit sollte nun gezielt das Calcineurin B Gen ausgeschaltet oder seine Expression reduziert werden. Unter 70 auf Blasticidin-Resistenz selektionierten Klonen, die mit einem *Knockout*-Konstrukt transformiert worden waren, ließ sich kein Klon identifizieren, bei dem die Blasticidin-Kassette in *cnbA* integriert war. Es gelang auch nicht, eine RNAi Mutante gegen Calcineurin B zu isolieren, bei der im Western Blot kein Protein mehr nachzuweisen war. Diese Befunde sind ein Hinweis darauf, dass für das Zellwachstum eine minimale Menge an CNB notwendig ist, die über den isolierten Klon mit der geringsten CNB-Restkonzentration definiert wird.

Aufgrund dieser Ergebnisse kann man davon ausgehen, dass CN eine essentielle Rolle im vegetativen Wachstum bei *D. discoideum* spielt, vielleicht ähnlich seiner Beteiligung an der Aufhebung des *mating factor*-induzierten Zellzyklusarrests bei der Hefe (Withee et al., 1997). Auch bei Säuger Zellen konnte kürzlich gezeigt werden, dass CN an Zellzyklusprozessen über die Regulation der Akkumulation von Cyclin D beteiligt ist (Kahl & Means, 2004).

Dass CN für *Dictyostelium* essentiell ist, wird durch weitere Resultate unterstützt. Die pharmakologische Inhibierung von CN mit Gossypol führte in Wildtypzellen zu Defekten beim vegetativen Wachstum, der Signalübertragung

und der Entwicklung (Weissenmayer et al., 2005). Im Gegensatz dazu erwies sich eine Calcineurin A überexprimierende Zelllinie signifikant resistenter gegen die inhibitorische Wirkung von Gossypol. Darüber hinaus zeigten Zelllinien, die ein RNAi-Konstrukt gegen die mRNA von Calcineurin A von einem induzierbaren Vektor exprimieren, ein stark gehemmtes vegetatives Wachstum (K. Böckeler, unveröffentlichte Beobachtungen).

4.1.3 Calcineurin spielt eine wichtige Rolle bei der Stielzellentwicklung

Bisher wurde Calcineurin in vielen Organismen mit Zelldifferenzierung in Verbindung gebracht, wie beispielsweise bei der Muskelzelldifferenzierung in Säugern. In *Dictyostelium* konnte CN bisher keine Funktion zugeordnet werden. In Differenzierungstests, die im Rahmen dieser Arbeit mit *cnbA* RNAi Mutanten angefertigt wurden, zeigte sich in Zelllinien mit stark reduzierter CNB Expression ein Defekt in der Stielbildung während der Fruchtkörperentwicklung. Dies deutet daraufhin, dass CNB oder das CN Holoenzym eine wichtige Rolle in der Regulation der Stielzellentwicklung und damit in der Differenzierung in *D. discoideum* spielt.

Untersuchungen mit Chimären aus GFP markierten Wildtypzellen und unmarkierten *cnb* RNAi Mutantenzellen ergaben keine unregelmäßige Verteilung der zwei Zelltypen im *slug*. Damit war ausgeschlossen, dass undifferenzierte Zellen der Mutante präferentiell zu Präsporenzellen differenzieren und es damit zu einer Verschiebung des Sporen/Stielzellverhältnisses kommt.

Ein Schlüsselfaktor bei der Entwicklung von Stielzellen ist das Morphogen DIF-1. Es induziert die Expression von prästiel-spezifischen Genen durch einen Anstieg der intrazellulären freien Ca^{2+} -Konzentration (Schaap et al., 1996). Bisher völlig unbekannt war aber, wie die Calcium Signale zur Stielzelldifferenzierung beitragen. Dass die *cnbA* RNAi Mutante kürzere Stiele im Vergleich zum Wildtyp ausbildet, gibt Anlass zu der Vermutung, dass CN das lange gesuchte Bindeglied in der Kette zwischen erhöhtem intrazellulärem Calciumanstieg und Stielzelldifferenzierung ist. Analog zu der eingehend charakterisierten Rolle von CN in der Phosphorylierung von Transkriptionsfaktor-Komplexen der NFAT Familie wird ein Modell vorgeschlagen, bei dem Calcineurin, in Antwort auf einen Anstieg des cytosolischen Calciums, die cytosolische Komponente eines

Transkriptionsfaktors dephosphoryliert, der daraufhin in den Kern einwandert und – in Analogie mit der Situation in anderen Systemen zusammen mit nukleären Komponenten des aktiven Komplexes – die Transkription von prästielspezifischen Genen aktiviert (Abb. 26). Der Transkriptionsfaktor, den CN zum Ziel hat, konnte in *Dictyostelium* bisher nicht identifiziert werden, da die Aminosäuresequenz bei den bisher bekannten CN-regulierten Transkriptionsfaktoren keine Konservierung aufweisen.

Unterstützt wird dieses Modell durch die Analyse der Expression des prästielspezifischen Markers *ecmB*. Dieser Marker kodiert für ein extrazelluläres Matrixprotein, das über Calcium reguliert und dessen Expression in Wildtypzellen am Ende der Entwicklung hochreguliert wird (Jermyn & Williams, 1991). Bei der RNAi Mutante 01-5 dagegen konnte über die gesamte Entwicklung keine verstärkte Expression von *ecmB* mehr nachgewiesen werden, was ein direkter Hinweis darauf ist, dass CN einen Einfluss auf die Genexpression in Prästielzellen besitzt.

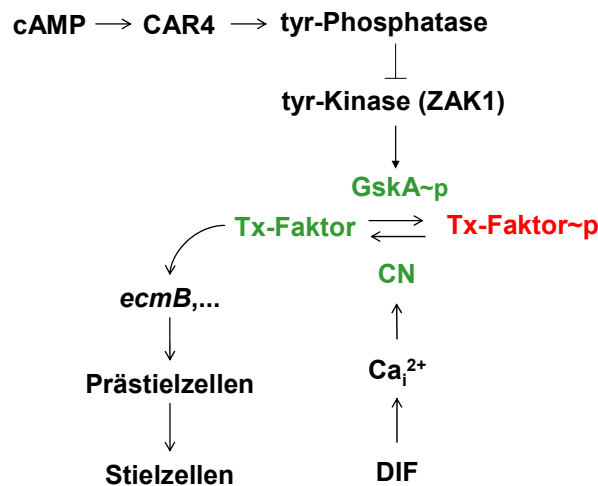


Abb. 26: Modell für die Funktion von Calcineurin bei der Stielzellentwicklung. DIF induziert einen Anstieg an $[Ca^{2+}]_i$. Durch Ca^{2+} aktiviertes Calcineurin (CN) dephosphoryliert einen zu NFAT homologen Transkriptionsfaktor (Tx-Faktor), der daraufhin die Expression stielzellspezifischer Gene induziert. Gegenspieler von CN wäre in diesem Modell die Glykogensynthasekinase A (GskA), die den Transkriptionsfaktor durch Phosphorylierung deaktiviert. In Prästielzellen bleibt die Inaktivierung des Transkriptionsfaktors durch GskA vermutlich aus, weil in Prästielzellen GskA über den cAMP Rezeptor Car4 und wahrscheinlich über eine Proteintyrosin-Phosphatase, die die GskA aktivierende Proteinkinase ZAK1 inhibiert, inaktiviert wird.

Der phänotypische Defekt der kurzen Stiele stellt das Spiegelbild der Effekte von Mutationen im *Dictyostelium* Glykogensynthase-Kinase 3 Homolog GskA (Harwood et al., 1995) dar, von der gezeigt wurde, dass sie posteriore Zellmusterbildung induziert und anteriore Zelldifferenzierung hemmt (Chisholm & Firtel, 2004). GskA wird durch einen intrazellulären Protein-Tyrosinkinase/Phosphatase Signalweg reguliert, der durch die cAMP-Rezeptoren CAR1 und/oder CAR3 und CAR4 vermittelt wird. GskA wird durch CAR1- und/oder CAR3-vermittelte Aktivierung der Tyrosinkinase ZAK1 (Ginsburg & Kimmel, 1997) aktiviert und durch CAR4-vermittelte Aktivierung einer Proteintyrosin-Phosphatase inaktiviert (Kim et al., 2002). GskA Nullmutanten zeigen eine beschleunigte frühe Entwicklung und bilden während der Morphogenese nur Stielzellen (Harwood et al., 1995). Somit kann vermutet werden, dass GskA und CN bei der Zelltypdifferenzierung in *Dictyostelium* als Gegenspieler agieren. Ein weiterer Hinweis darauf ist die Tatsache, dass sowohl der Phänotyp der *gskA* Nullmutante als auch der Phänotyp der *cnbA* RNAi Mutante zell-autonom sind (Harwood et al., 1995; 3.1.5 Abb. 17 A). Die direkte Verbindung zwischen GskA und CN wird auch durch Ergebnisse des NFAT Signalwegs bei Säugern unterstützt. In T Zellen wird die NFAT-abhängige Genexpression durch Phosphorylierung von NFAT durch GSK3 reprimiert. Dadurch kommt es zur Inhibierung der Bindung von NFAT an die DNA (Neal & Clipstone, 2001) und zur Translokation des Faktors aus dem Zellkern in das Cytosol. Falls GSK3 inaktiviert ist, bleibt NFAT im Kern und es kommt zu einer erhöhten NFAT-abhängigen Aktivierung der Genexpression (Diehn et al., 2002).

4.1.4 Calcineurin B hat möglicherweise eine Funktion in der Wahrnehmung von Calcium-Signalen

Calcineurin B zeigt große Homologien zu Mitgliedern der 4 EF hand Calcium Sensorproteinfamilie, zu der beispielsweise Recoverin, der neuronale Calciumsensor-1 (NCS-1) und die pflanzlichen Calcineurin B ähnlichen Proteine gehören. Es wurde vor kurzem gezeigt, dass N-Myristoylierung, eine häufige Modifikation von CNB und Ca^{2+} Sensorproteinen, die Bindungsfähigkeit von Ca^{2+} an NCS-1 erhöht (Jermin et al., 2004). Auch die Konformationsänderungen nach Ca^{2+} Bindung sind beim myristoylierten NCS1 stärker als beim unmyristoylierten

Protein. Wenn Ca^{2+} Sensing eine Funktion von Calcineurin B ist, dann sind die phänotypischen Defekte, die bei der *cnbA* RNAi Mutante beobachtet wurden, möglicherweise dadurch verursacht, dass der die Prästielgenexpression induzierende langsame, anhaltende Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} Konzentration von ca. 50 zu ca. 150 nM während eines Zeitabschnitts von ungefähr 8 Stunden von den Zellen nicht richtig gemessen wird. Beginnend mit der frühen Entwicklung exprimieren *D. discoideum* Zellen zwei CNB Isoformen, wovon der kürzeren die Myristoylierungskonsensussequenz fehlt. Möglicherweise ist das aus CNA und der nicht myristoylierbaren CNB Isoform gebildete alternative Holoenzym mit einer spezifischen Rolle bei der Entwicklung assoziiert. Weitere Arbeiten müssen zeigen, ob die myristoylierte oder die unmyristoylierte CNB Isoform die zentrale Rolle bei der Vermittlung von DIF-1 Signalen auf die Expression von prästiel-spezifischen Genen einnimmt.

4.1.5 Calcineurin spielt eine Rolle bei der späten Entwicklung

Während der späten Entwicklung bilden sich an Sporenköpfen von *cnbA* RNAi Mutanten zusätzliche willkürlich angeordnete Spitzen (*ectopic tips*). Es konnte in dieser Arbeit nicht genau geklärt werden, welchen Zelltyp die *ectopic tips* enthalten. Es ist denkbar, dass es sich um undifferenzierte Zellen oder um Stielzellen handelt. Auch Schnitte durch Fruchtkörper gaben keinen eindeutigen Aufschluss über die Beschaffenheit der *ectopic tips*.

Ein ähnlicher Defekt in der Spitzendominanz und der Bildung von *ectopic tips* ist bei Deletion des *D. discoideum aar* Gens, einem Homolog von β -Catenin in Säugern zu beobachten (Coates et al., 2002). Sowohl bei der *aar* Nullmutante als auch bei der *cnbA* RNAi Mutante ist der Effekt nicht-zellautonom. β -Catenin ist ein transkriptionaler Co-Aktivator im metazooischen kanonischen Wnt Signalübertragungsweg (Überblick in Huelsken & Behrens, 2002), der durch Mitglieder der Wnt Familie sekretierter Glycoproteine induziert wird und an unterschiedlichen Entwicklungsprozessen wie Zelldifferenzierung, Zellbewegung, Zellpolarität und Zellwachstum beteiligt ist. In unstimulierten Zellen wird β -Catenin von GSK3 im Komplex mit APC und Axin phosphoryliert. β -Catenin wird so Ziel für den Abbau durch Ubiquitin-Proteolyse. Das Wnt Signal führt zur Aktivierung des Proteins Dishevelled. Dishevelled blockiert GSK3 und verhindert

damit die Phosphorylierung von β -Catenin. β -Catenin ist stabilisiert und kann in den Nukleus wandern. Dort aktiviert es in Kombination mit Transkriptionsfaktoren der TCF/LEF Familie die Expression von Genen. Dieser Signalweg ist hoch konserviert und für die Entwicklungsmodelle *Caenorabditis elegans*, *Drosophila melanogaster*, *Xenopus* spp. und *Mus musculus* beschrieben.

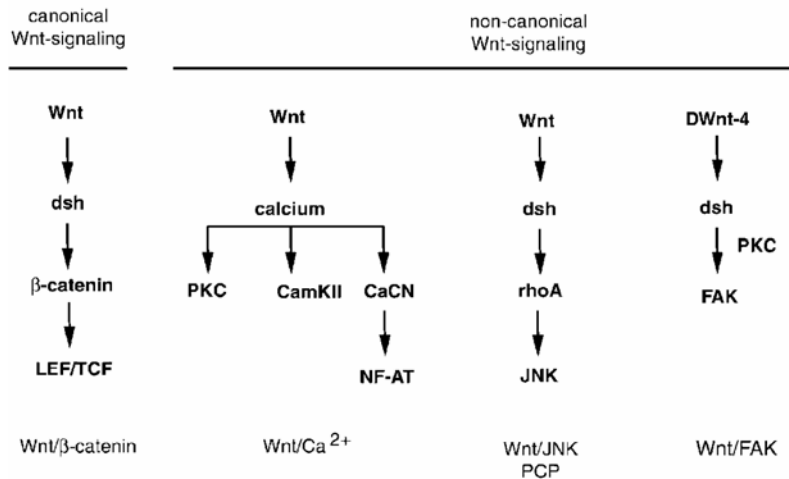


Abb. 27: Schematische Darstellung der kanonischen und nicht-kanonischen Wnt Signalwege. dsh, Dishevelled; PKC, Proteinkinase C; CamKII, Calmodulin Kinase II; NF-AT, *nuclear factor of activated T cells*; JNK, Jun-N-terminale Kinase; PCP, *planar cell polarity*; FAK, *focal adhesion kinase*. (aus Pandur et al., 2002)

In Vertebraten sind bestimmte Wnts wie Wnt5 auch in der Lage über einen nicht-kanonischen Weg zu wirken und β -Catenin über Ca^{2+} vermittelte Signale unabhängig von GSK3 zu destabilisieren. Speziell bei der dorsoventralen Achsenbildung in *Xenopus* Embryos wird durch Wnt die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration erhöht. Eine CN unabhängige NFAT Mutante inhibierte die anteriore Entwicklung der Primärachse, wohingegen eine dominant negative NFAT Mutante ektopische dorsale Achsenbildung und die Expression von Zielgenen des kanonischen Wnt Signalwegs induzierte (Saneyoshi et al., 2002).

CN und NFAT scheinen also Teil des nicht-kanonischen Wnt/ Ca^{2+} Signalwegs zu sein, der zur Hemmung des kanonischen Wnt Signalwegs von β -Catenin führt. Da auch in *D. discoideum* β -Catenin unabhängig von GskA reguliert wird (Coates et al., 2002), könnte ein mögliches Modell für Spitzendominanz einen dem kanonischen ähnlichen und einen dem nicht-

kanonischen ähnlichen Signalweg beinhalten. Der kanonische Wnt Signalweg würde durch CAR1/CAR3 wirken, um GskA zu aktivieren, der nicht-kanonische Wnt/Ca²⁺ Signalweg durch CAR4, um CN über ein intrazelluläres Ca²⁺ Signal zu aktivieren. Dabei ist im weiteren zu untersuchen, ob in der *cnbA* RNAi Mutante β -Catenin auf transkriptionaler oder translationaler Ebene herunterreguliert wird und wie diese vermutete Reduktion mit CN in Verbindung steht.

4.2 Suche nach der Calcineurin B mRNA-prozessierenden Nuklease

4.2.1 Wie kann eine nukleolytische Aktivität identifiziert werden?

Die Analyse der Expression von CNB mRNA und Protein während des Entwicklungszyklus offenbarte einen ungewöhnlichen, bislang in eukaryotischen Zellen unbeschriebenen Regulationsmechanismus, der zur entwicklungsregulierten Synthese zweier CNB Isoformen führt (Aichem & Mutzel, 2001). Auf Western Blots von Extrakten aus wachsenden und frühen präaggregativen Zellen wird hauptsächlich eine CNB-Form (CNB_L) mit dem aus der kodierenden Sequenz des *cnbA* Gens vorhergesagten Molekulargewicht gefunden. Während der Aggregation wird eine zweite Isoform exprimiert, die sich in einem leicht verkürzten N-Terminus von der konstitutiv vorhandenen Form unterscheidet. Die Expression dieser verkürzten Isoform (CNB_S) korreliert mit dem Auftreten einer entsprechend verkürzten mRNA Isoform, die um die 5' nichttranslatierte Region und das erste ATG-Kodon der translatierten Region verkürzt ist. Es konnte gezeigt werden, dass diese mRNA Isoform nicht durch differenzielles Spleißen oder die Verwendung alternativer Promotoren zustande kommt, sondern offenbar auf der Prozessierung der reifen *cnbA* mRNA durch eine entwicklungsregulierte Nuklease beruht, die ihr 5' Ende abschneidet, so dass das prozessierende 5' Ende der kodierenden Regionen nun als neue 5' nichttranslatierte Sequenz das Ribosom rekrutiert und die Translation der kleinen CNB Isoform vom zweiten ATG aus startet (Aichem & Mutzel, 2001). Cis-Determinanten für die Prozessierung finden sich innerhalb der proteinkodierenden Region von *cnbA*.

Obwohl ein solcher mRNA Prozessierungsmechanismus für Eukaryoten bisher nicht beschrieben worden ist, gibt es Berichte über ähnliche nukleolytische Aktivitäten bei DNasen des Fen1-Typs, die für die Prozessierung von Okazaki Fragmenten während der Replikation nötig sind (Stevens, 1998) und für virale Nukleasen, die mRNA Sekundärstrukturen in der Umgebung von *internal ribosome entry sites* erkennen (Elgadi & Smiley, 1999).

Ziel dieser Arbeit war, die Nuklease mit einem genetischen Ansatz zu identifizieren. Ausgangspunkt des Ansatzes war ein cDNA Derivat, bei dem durch ein PCR-Artefakt an Position bp 222 (bp 27 auf der codierenden Sequenz) eine T/A Mutation und damit ein TAA-Stoppkodon in die kodierende Sequenz zwischen erstem und zweitem ATG eingeführt wurde. Bei der Expression dieser cDNA in *D. discoideum* konnten zwei mRNAs, jedoch nur ein einziges, verkürztes rekombinantes Proteinprodukt nachgewiesen werden. Da die Insertion *gfp*-kodierender Sequenzen in die zentrale Region der *cnbA*-kodierenden cDNA die Prozessierung der chimären mRNA nicht störte (Aichem & Mutzel, 2001), sollte durch Insertion eines selektierbaren Markers ein System zur genetischen Komplementation in einem heterologen Organismus aufgebaut werden. *E. coli* konnte nicht als Wirtsorganismus verwendet werden, weil in diesem Organismus durch interne Reinitiation an jedem der drei 5' terminalen ATG Kodons drei Proteinprodukte entstehen (Aichem & Mutzel, unveröffentlicht). Als Wirtsorganismus für das Experiment wurde deshalb *S. cerevisiae* gewählt. Die Hefe hat das gleiche Ribosomenscanning wie *D. discoideum* und bietet geeignete Expressionsplasmidsysteme. Würde nun von dem *cnbA* cDNA Derivat mRNA transkribiert, könnte eine im Hefegenom oder in einer *D. discoideum* cDNA-Bank kodierte prozessierende Aktivität direkt über die Detektion von zwei Proteinprodukten nachgewiesen werden.

4.2.2 Genetischer Selektionsansatz zur Identifizierung der prozessierenden Aktivität

Die Expression der *Dictyostelium* Wildtyp-*cnbA* mRNA in *S. cerevisiae* zeigt keine Prozessierung der *cnbA* mRNA. Damit scheint endogen keine prozessierende Aktivität in der Hefe vorhanden zu sein. Unter dieser Voraussetzung wurden Hefezellen mit dem *cnbA* cDNA Derivat transformiert, in

das der selektierbare Marker *trp1* kloniert worden war. *trp1* kodiert für die Phosphoribosylanthranilatisomerase, die den dritten Schritt in der Tryptophanbiosynthese katalysiert und damit die Auxotrophie des verwendeten Hefestamm INVSc1 komplementiert. Transformanten sollten auf Grund des Stoppkodons nicht in der Lage sein, auf Medium ohne Tryptophan zu wachsen. Trotzdem wurde genau diese Beobachtung bei den meisten der untersuchten Transformanten gemacht. Als mögliche Ursache wird ein Ribosomen *readthrough* über das Stoppkodon angenommen. In Eukaryoten erkennt ein einziger *release factor*, eRF1, alle drei Stoppkodons (Frolova et al., 1994). Die Effizienz der Termination wird durch einen zweiten *release factor*, eRF3, verstärkt (Zhouravleva et al., 1995; Stansfield et al., 1995). Obwohl die Erkennung durch den *release factor* normalerweise gut funktioniert, kann ein Stoppkodon unter bestimmten Umständen von einer falschen tRNA anstelle des *release factors* dekodiert werden (Bertram et al., 2001). Dabei üben in *S. cerevisiae* auch die Bereiche 5' und 3' des Stoppkodons einen Einfluss auf einen möglichen *readthrough* aus (Bonetti et al., 1995). Spezielle Basenfolgen wie CA(A/G)N(U/C/G)A 3' und CCT TCA 5' des Stoppkodons induzieren effektiv das Überlesen (Namy et al., 2001; Tork et al., 2004). In unserem Fall ist die Sequenz 5' des zusätzlichen Stopps in *cnbA* CAT TCA und stimmt daher bis auf das erste A genau mit der Basenfolge der oben beschriebenen 5' Sequenz überein. Zudem wird durch den Aufbau des Ansatzes ein starker Selektionsdruck auf TRP1 exprimierende Zellen ausgeübt, und es sind wahrscheinlich nur sehr geringe Mengen des Enzyms und damit nur sehr wenige korrekte Translationsprodukte erforderlich, um der Hefezelle ein Wachstum zu ermöglichen. Vom Yeast-Two-Hybrid-System ist die Komplementation von Aminosäureauxotrophien als sehr empfindlicher Nachweis bekannt.

Um den *readthrough* Effekt zu minimieren, wurde ein zweites Stoppkodon in das *cnbA::trp1* Konstrukt eingefügt. Da wahrscheinlich die Sekundärstruktur der mRNA ein wichtiger Faktor für die Prozessierung ist, war es nicht möglich, das zweite Stoppkodon kurz vor oder nach dem ersten einzuführen. Mittels PCR wurde deshalb ein Derivat des *trp1* Gens erzeugt, bei dem an Position 16 bzw. 17 ein T und ein C jeweils durch A ausgetauscht wurde. Aber auch dann konnten einige Klone, die mit diesem neuen Konstrukt transformiert wurden, auf Medium ohne Tryptophan wachsen, was eine alternative Strategie notwendig machte.

4.2.3 Screeningansatz zur Identifizierung der prozessierenden Aktivität

Eine andere Alternative bot sich durch die Verfügbarkeit des Antikörpers gegen CNB aus *D. discoideum*. 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. Ferner führt die translationale Suppression zwar zu einer Expression von CNB, sie ist jedoch sehr viel geringer als die der Kontrollzelllinie ohne Stoppkodon. Der große Unterschied zwischen der Signalstärke nichtrekombinanter Hefezellen und Hefezellen mit dem TAA-Konstrukt einerseits und nichtmutierter cDNA für CNB andererseits sollte daher die eindeutige Identifizierung CNB-exprimierender Klone erlauben. Auf diesen Ergebnissen aufbauend wurde ein Screeningansatz entwickelt, bei dem die prozessierende Aktivität durch Screenen für CNB Expression auf "Colony Blots" identifiziert werden sollte. Der Screeningansatz ermöglichte es, *D. discoideum* CNB exprimierende Hefekolonien leicht von mit dem *cnbA* cDNA Derivat (ohne *trp1*) transformierten Klonen zu unterscheiden. Der mit dem *cnbA* cDNA Derivat (ohne *trp1*) transformierte *S. cerevisiae* Stamm wurde mit einer cDNA-Bank aus differenzierenden *D. discoideum* Zellen komplementiert und die Klone in mehreren Runden mit Colony Blotting analysiert.

Unter den bisher ca. 25 000 analysierten Klonen konnte keine prozessierende Aktivität identifiziert werden. Um sicher zu gehen, dass mit einer Bank alle cDNAs abgedeckt werden, sollten ungefähr 5-mal so viele Klone wie Gene analysiert werden, was bei ca. 12 000 Genen in *D. discoideum* 60 000 analysierten Hefeklonen entspräche. Bislang konnte auch die „eingebaute“ Positivkontrolle des Screenings, *cnbA*, nicht gefunden werden. Auch dies ist ein Hinweis darauf, dass noch nicht genügend Klone gescreent wurden.

5 Klone wurden nach mehreren Runden als mögliche positive Kandidaten isoliert. Die Restriktionsanalyse der cDNA-Bank Plasmide mit *EcoRI* und *XhoI* aus diesen Klonen ergab nur für zwei Klone ein detektierbares Fragment. Bereits durch die Größe der ausgeschnittenen Fragmente kann die „interne“ Kontrolle *cnbA* ausgeschlossen werden, weil es drei interne *EcoRI* Schnittstellen enthält. Alle isolierten Plasmide wurden in den Stamm mit dem *cnbA* Stoppperivat rücktransformiert, da nicht auszuschliessen ist, dass die prozessierende Aktivität eine kleine RNA sein könnte, deren cDNA in einer Agarose-Gelelektrophorese wegen ihrer geringen Größe nicht detektiert werden kann. Nach zwei

unabhängigen Transformationen konnte auf Colony Blots kein Signal nachgewiesen werden, so dass die identifizierten Klone als "falsch positiv" betrachtet werden müssen.

Eine von der cDNA Bank kodierte prozessierende Aktivität kann ausgeschlossen werden, weil sonst der Effekt bei der Rücktransformation des kodierenden Plasmids hätte wieder beobachtet werden müssen. Die Suppression des TAA Stoppkodons kann damit entweder auf dem *cnbA* kodierenden Plasmid oder auf dem Chromosom der Hefezellen kodiert sein. Die erste Möglichkeit kann getestet werden, indem dieses Plasmid neu in die Hefe transformiert wird. Kann ein Signal detektiert werden, liegt die Suppression auf dem *cnbA* kodierenden Plasmid. Ist das nicht der Fall, muss die Suppression chromosomal sein. In beiden Fällen sollte berücksichtigt werden, dass der Suppressionseffekt relativ häufig auftrat (5 Klone) obwohl keinerlei Selektionsdruck auf die Expression des rekombinanten Proteins wirken sollte. In dieser Arbeit wurde auf die nähere Untersuchung der Suppression verzichtet, da sie für die Identifizierung der nukleolytischen Aktivität keine Rolle spielt.

4.2.4 Ausblicke für die Identifizierung der prozessierenden Aktivität

Zusammenfassend gibt es drei mögliche Gründe, warum die Nuklease bisher durch das Screening nicht gefunden wurde. 1.) Es wurden noch zu wenige Klone gescreent. 2.) Die Qualität der verwendeten cDNA-Bank könnte unzureichend sein. 3.) Die Nuklease könnte nicht nur aus einer, sondern ähnlich wie die Ribonuklease P (Xiaoh et al., 2002) aus mehreren Untereinheiten bestehen, die zusammen ein funktionierendes Holoenzym bilden. Dann wäre es unmöglich, über das Screening in Hefezellen die nukleolytische Aktivität zu identifizieren.

Ein alternativer Ansatz, mit dem in Zukunft weitergesucht werden kann, würde auch die Identifikation einer prozessierenden Aktivität einschließen, die von mehreren Untereinheiten abhängt. Dieser Ansatz macht sich die Befunde zunutze, dass *thyA*-Deletionsmutanten in *Dictyostelium* 5 Fluoroorotat (5 FO)-resistent sind. 5 FO wirkt auf Zellen toxisch, wenn das für die Uracil-Biosynthese notwendige Gen *thyA* exprimiert wird. Durch Deletion des endogenen *thyA* erhält man einen Uracil-auxotrophen (*ura⁻*) und gegen 5' FO resistenten *D. discoideum*

Stamm. Kloniert man nun ein *cnbA::thyA* Fusionskonstrukt analog dem in 4.2.2 beschriebenen *cnbA::trp1* Konstrukt und transformiert es in den *ura⁻5* FO-resistenten Stamm, ist der rekombinante Stamm Uracil-prototroph und 5' FO-sensitiv. Dies ist auch dann der Fall, wenn sich in *cnbA* zwischen erstem und zweitem ATG ein Stoppkodon befindet, denn das Stoppkodon wird durch die Prozessierung abgeschnitten und die mRNA kann translatiert werden. *Dictyostelium*-Mutanten, denen die prozessierende Aktivität oder eine Komponente davon fehlt und die zum Beispiel durch REMI-Mutagenese (Guerin & Larochelle, 2002) erhalten werden könnten, sollten 5 FO resistent (und Uracil-auxotroph) werden. Alternativ zu REMI könnten Kandidaten-Gene für die prozessierende Aktivität in der vor kurzem veröffentlichten Gesamtsequenz des *Dictyostelium* Genoms (Eichinger et al., 2005) aufgespürt und gezielt ausgeschaltet werden.