

Calcineurin B in *Dictyostelium discoideum*

*Untersuchungen zur entwicklungsabhängigen Regulation der Calcineurin B mRNA
Prozessierung*

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

Universität Konstanz
Fakultät für Biologie

Annette Aichem
Konstanz, 2000

Dissertation der Universität Konstanz

Referenten: Priv. Doz. Dr. R. Mutzel
 Prof. Dr. R. Knippers

Tag der mündlichen Prüfung: 20. Oktober 2000

Prüfer: Prof. Dr. D. Malchow
 Prof. Dr. R. Knippers
 Prof. Dr. W. Schuller

*Es ist nichts
so klein und wenig,
woran man sich nicht
begeistern könnte.*

(Hölderlin)

Publikationen:

Sonnemann, J., Aichem, A., Schlatterer, C. (1998)

Dissection of the cAMP induced cytosolic calcium response in *Dictyostelium discoideum*: the role of cAMP receptor subtypes and G protein subunits. FEBS Letters 436, 271-276

Kessen, U., Schaloske, R., Aichem, A., Mutzel, R. (1999)

Ca²⁺/Calmodulin-independent activation of calcineurin from *Dictyostelium* by unsaturated long chain fatty acids. The Journal of Biological Chemistry 274 (53), 37821-37826

Aichem, A. and Mutzel, R.

Unconventional mRNA processing in the expression of two developmentally regulated calcineurin B isoforms in *Dictyostelium*. (in Vorbereitung)

Zusammenfassung

Diese Arbeit beschreibt die Isolierung des Gens für die regulatorische Untereinheit der Ca^{2+} /Calmodulin abhängigen Proteinphosphatase (Calcineurin B) aus *Dictyostelium discoideum* sowie seine Charakterisierung auf molekularer und biochemischer Ebene. Ein neuer Mechanismus der mRNA Prozessierung wird beschrieben.

Ein Gen (*cnb1*), aber zwei entwicklungsregulierte mRNA Isoformen (*cnb1_S* und *cnb1_L*) von ca. 700 und 1000 Basen wurden in *Dictyostelium discoideum* Ax2 Zellen nachgewiesen. In vegetativen Zellen waren ähnliche Mengen beider mRNA Isoformen enthalten. Im Verlauf der Differenzierung fand ein transienter Anstieg der *cnb1_S* mRNA statt, mit einem "Peak" zwischen dem Beginn der Aggregation nach ca. 6 h Entwicklungszeit und der Ausbildung fester Aggregate nach ca. 12 h. Die *cnb1_L* mRNA wies ein gegenläufiges Expressionsprofil auf. Zwei Calcineurin B Proteinisoformen (CNB_S und CNB_L) mit apparenten Molekulargewichten von 18 und 20.5 kDa wurden auf einem Western Blot mit Gesamtprotein aus Wildtyp Ax2 Zellen detektiert. Die Menge der CNB_L Isoform blieb über die gesamte Entwicklung hinweg auf demselben hohen Niveau wie in vegetativen Zellen. Die Expression der CNB_S Isoform war hingegen entwicklungsreguliert. Während in vegetativen Zellen nur geringe Mengen der CNB_S Isoform vorhanden waren, nahm diese mit dem Beginn der Aggregation stark zu und blieb im weiteren Verlauf der Differenzierung auf diesem hohen Niveau.

Die kompletten cDNA Isoformen wurden mit Hilfe des 5' RACE Systems isoliert. Die Sequenzanalyse ergab, dass der *cnb1_S* cDNA im Vergleich zur *cnb1_L* cDNA lediglich die 5' nicht-translatierte Region, sowie maximal die ersten fünf Nukleotide einschließlich des ersten ATG der *cnb1_L* Sequenz fehlte.

Bei Expression der am 3' Ende verkürzten *cnb1_L* cDNA mit oder ohne die 5' nicht-translatierte Region unter der Kontrolle eines konstitutiv aktiven Aktin Promotors in *Dictyostelium* Zellen wurden zusätzlich zu den endogenen Isoformen zwei weitere mRNA- und Proteinisoformen exprimiert. Verschiedene Fusionen der *cnb1_L* cDNA mit cDNA Fragmenten des "grün fluoreszierenden Proteins" (GFP) wurden hergestellt und unter der Kontrolle von konstitutiv aktiven Aktin Promotoren in *Dictyostelium* Zellen exprimiert. Die Prozessierung der *cnb1_L* mRNA erfolgte nur dann, wenn die GFP-Fragmente innerhalb der *cnb1_L* mRNA eingebracht worden waren, nicht aber bei einer Fusion der GFP-Fragmente an das 5' oder 3' Ende. Aus diesen Experimenten wurde geschlossen, dass die *cnb1_S* mRNA durch strukturabhängiges Prozessieren der *cnb1_L* mRNA entsteht, und dass die 5' nicht-

translatierte Region der *cnb1_L* mRNA nicht für diesen Mechanismus benötigt wird. Die gesamte Information für den Prozessierungsmechanismus ist somit auf der translatierten Sequenz der *cnb1_L* mRNA zu finden. Außerdem muss der Bereich zwischen dem ersten und zweiten ATG des *cnb1* Gens translatierte Sequenz der *cnb1_L* mRNA und gleichzeitig 5' nicht-translatierte Sequenz der *cnb1_S* mRNA sein. Bekannte Mechanismen der mRNA Prozessierung können aufgrund der experimentellen Daten ausgeschlossen werden.

Ein entwicklungsregulierter Mechanismus wird vorgeschlagen, der nach dem Spleißen des primären Transkripts strukturabhängig die *cnb1_L* mRNA um die 5' nicht-translatierte Region sowie maximal um die ersten fünf Nukleotide der translatierten Region verkürzt und so die *cnb1_S* mRNA hervorbringt. Diese dient als Vorlage für die Expression der CNB_S Isoform. Wie ein Vergleich mit anderen zellulären Schleimpilzen zeigte, ist dieser Mechanismus spezifisch für *Dictyostelium* Arten.

Rekombinantes, in *E. coli* Zellen exprimiertes Calcineurin B wurde gereinigt. Das Protein wurde für die Herstellung von Antiserum verwendet und biochemisch charakterisiert. Die erhaltenen Daten sind vergleichbar mit Daten für Calcineurin aus anderen Organismen. Die Bindung des rekombinanten Calcineurin B an die katalytische Untereinheit Calcineurin A wurde gezeigt. Calcineurin B erhöhte die Phosphataseaktivität von Calcineurin A gegenüber dem R_{ij} Phosphopeptid, nicht aber gegenüber dem chromogenen Substrat pNPP.

Um Aufschluß über die Funktion von Calcineurin in der Entwicklung von *Dictyostelium discoideum* zu erhalten, wurden Versuche unternommen, die Calcineurin Untereinheiten gleichzeitig verstärkt zu exprimieren. Eine Überexpression der beiden Calcineurin B cDNA Isoformen in Calcineurin A überproduzierenden Zellen wurde nicht erreicht. Eine verstärkte Expression eines N- und C-terminal verkürzten Calcineurin B wurde jedoch erzielt. Ein veränderter Phänotyp bezüglich der Differenzierung wurde nicht beobachtet.

Abkürzungsverzeichnis

BAPTA	1,2-bis(2-aminophenoxy)ethan N,N,N',N'-tetraacetat
Bromphenolblau	3', 3'', 5', 5''-Tetrabromophenol-sulfonephthalein
BSA	Rinderserumalbumin
CaM	Calmodulin
cAMP	3' 5' cyclisches Adenosin Monophosphat
CNA	Calcineurin A
CNB	Calcineurin B
CsA	Cyclosporin A
DIF	"differentiation inducing factor"
dNTP	Desoxyribonukleotid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure, Dinatriumsalz-Dihydrat
EGTA	Ethylenglycol-O,O'-bis(2-aminoethyl)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
GFP	grün fluoreszierendes Protein
InsP₃	Inositol-1,4,5-trisphosphat
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
kb	Kilo-Basen
kDa	Kilo-Dalton
Ni²⁺-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
OD_x	optische Dichte bei der Wellenlänge x nm
PEI	Polyethylenimin
pNPP	para-Nitrophenylphosphat
REMI	"restriction enzyme mediated insertion"
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylene diamine
Tween 20	Polyoxyethylen-Sorbitan-Monolaurat
5'NTR	5' nicht-translatierte Region
3'NTR	3' nicht-translatierte Region
RT	Raumtemperatur
rpm	Umdrehungen pro Minute
Z/ml	Zellzahl pro 1 ml Puffer oder Medium

Inhaltsverzeichnis

EINLEITUNG	1
DER ORGANISMUS <i>DICTYOSTELIUM DISCOIDEUM</i>	1
CALCIUM.....	3
<i>Die cAMP-vermittelte Signaltransduktion und die Bedeutung von Calcium in Dictyostelium discoideum</i> .	4
CALMODULIN UND CALMODULIN BINDEPROTEINE	5
DIE Ca^{2+} /CALMODULIN ABHÄNGIGE PROTEINPHOSPHATASE CALCINEURIN	6
FUNKTIONEN VON CALCINEURIN.....	9
CALCINEURIN IN <i>DICTYOSTELIUM DISCOIDEUM</i>	11
REGULATION DER mRNA UND PROTEINEXPRESSION IN EUKARYONTEN	12
<i>Regulationsmechanismen auf Ebene der Transkription</i>	12
<i>Regulation auf der Ebene der Translation</i>	14
ZIELE DIESER ARBEIT	16
MATERIAL UND METHODEN	17
MATERIAL	17
<i>Chemikalien und sonstige Materialien</i>	17
<i>Antibiotika</i>	18
<i>Kits</i>	18
<i>Enzyme für die Molekularbiologie</i>	19
<i>Antikörper</i>	19
<i>Proteine</i>	19
<i>Dictyostelium discoideum Stämme</i>	20
<i>Bakterien</i>	21
<i>cDNA Banken</i>	21
<i>Oligonukleotide ("Primer")</i>	22
<i>Plasmide</i>	22
<i>Konstrukte</i>	23
<i>Standards für DNA Gele</i>	25
<i>Medien und Puffer für Dictyostelium discoideum Zellen</i>	25
<u>KULTURMEDIUM</u>	25
<i>Medien für E. coli Zellen</i>	26
<i>Nähragar für Klebsiella planticola</i>	27
PUFFER FÜR BIOCHEMISCHE METHODEN.....	27

PUFFER FÜR MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN.....	29
ZELLBIOLOGISCHE METHODEN.....	30
<i>Anzucht von Dictyostelium discoideum Wildtyp Ax2 Zellen.....</i>	30
<i>Anzucht der Mutante stkA⁻.....</i>	30
<i>Anzucht der Mutante O5TS.....</i>	30
<i>Axenische Anzucht von Dictyostelium discoideum in Kulturschalen.....</i>	31
<i>Anzucht von Dictyostelium discoideum Transformanten.....</i>	31
<i>Differenzierung von Dictyostelium discoideum Zellen.....</i>	31
<i>Konservieren von Sporen.....</i>	32
BIOCHEMISCHE METHODEN.....	32
<i>Herstellung von Zellextrakten für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....</i>	32
<i>Proteinbestimmungen.....</i>	33
<i>SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....</i>	33
<i>Coomassie Blue Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen.....</i>	34
<i>Silberfärbung von SDS-Polyacrylamidgelen (Wray et al., 1981).....</i>	34
<i>Transfer von Proteinen auf Protran BA 85 Nitrocellulose-Membranen.....</i>	34
<i>Ponceau Färbung von Protein-Blots.....</i>	34
<i>Immunfärbung von Protein-Blots (Western Blots).....</i>	35
<i>Reinigung von rekombinantem Calcineurin B mittels einer Ni²⁺-NTA Matrix.....</i>	35
<i>Test der Bindung des rekombinanten Calcineurin B an Dictyostelium Calcineurin A.....</i>	37
<i>Bestimmung der Phosphataseaktivität des Calcineurin Holoenzym.....</i>	38
<i>Herstellung von polyklonalem Calcineurin B Antiserum.....</i>	39
<i>Affinitätsreinigung des polyklonalen Calcineurin B Antiserums.....</i>	40
<i>Deionisierung von Formamid.....</i>	40
MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN.....	40
<i>Standardmethoden.....</i>	40
<i>PEI Transformation von Dictyostelium discoideum Zellen.....</i>	41
<i>Konversion von D. discoideum λ_{yes} Phagen cDNA Banken in Plasmid cDNA Banken.....</i>	41
<i>Präparation von genomischer Dictyostelium discoideum DNA.....</i>	42
<i>DMPC-Behandlung von H₂O und Puffer.....</i>	42
<i>Extraktion von Gesamt-RNA aus Dictyostelium discoideum Zellen.....</i>	43
<i>Herstellung von Digoxigenin-markierten DNA Sonden für Northern und Southern Blots.....</i>	43
<i>RNA Agarose Gelelektrophorese und Northern Blot.....</i>	44
<i>Southern Blot.....</i>	45
<i>Polymerasekettenreaktion (PCR).....</i>	46
<i>Identifizierung und Isolation von bis dahin unbekanntem Calcineurin B Sequenzen aus cDNA Banken... 48</i>	48
<i>Isolation der Calcineurin B cDNA Isoformen mittels 5' RACE ("rapid amplification of cDNA 5' ends"). 49</i>	49

<i>Isolierung des Calcineurin B Gens</i>	50
<i>DNA Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Reinigung von DNA mittels "crush and soak"</i>	51
ERGEBNISSE	52
ISOLIERUNG VON CALCINEURIN B DNA FRAGMENTEN AUS cDNA BANKEN.....	52
REINIGUNG VON REKOMBINANTEM CALCINEURIN B.....	53
FUNKTIONSTESTS DES REKOMBINANTEN CALCINEURIN B.....	55
<i>Test der Bindung von Calcineurin B an Dictyostelium Calcineurin A</i>	55
<i>Phosphataseaktivität des Calcineurin Holoenzym</i> s.....	58
ANTIKÖRPER GEGEN <i>Dictyostelium</i> CALCINEURIN B ERKENNEN ZWEI CALCINEURIN B PROTEINISOFORMEN IN <i>Dictyostelium discoideum</i>	59
EXPRESSION DER CALCINEURIN B PROTEINISOFORMEN WÄHREND DER DIFFERENZIERUNG UND IN DEN VERSCHIEDENEN ZELLTYPEN	62
<i>Regulation der Calcineurin B Expression während der Differenzierung</i>	62
<i>Calcineurin B Expression in Stielzellen und in Sporen</i>	62
NACHWEIS EINES EINZIGEN CALCINEURIN B GENS IN <i>Dictyostelium discoideum</i>	64
ENTWICKLUNGSABHÄNGIGE EXPRESSIONSREGULATION DER CALCINEURIN B mRNA ISOFORMEN	65
ISOLIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG DER CALCINEURIN B cDNA ISOFORMEN	67
<i>Isolierung der Calcineurin B cDNA Isoformen</i>	67
<i>Vergleich der Sequenzen der <i>cnb1</i> cDNA Isoformen</i>	68
<i>Vergleich der Aminosäuresequenzen von Dictyostelium Calcineurin B mit Calcineurin B Sequenzen aus anderen Organismen</i>	71
SEQUENZ UND STRUKTUR DES CALCINEURIN B GENS <i>cnb1</i>	73
EXPRESSION VON AM 3' ENDE VERKÜRZTEN <i>cnb1_L</i> cDNA ISOFORMEN IN <i>Dictyostelium discoideum</i>	74
EINFLUSS DER mRNA SEKUNDÄRSTRUKTUR AUF DIE PROZESSIERUNG DER <i>cnb1_L</i> mRNA	78
<i>Anfügen von GFP cDNA-Fragmenten an das 3' Ende der <i>cnb1_L</i> cDNA</i>	78
<i>Einfügen von GFP cDNA-Fragmenten innerhalb der <i>cnb1_L</i> cDNA</i>	80
<i>Anfügen eines GFP cDNA-Fragments an das 5' Ende der <i>cnb1_L</i> cDNA</i>	84
<i>Vergleich der mRNA Sekundärstrukturen</i>	86
CALCINEURIN B EXPRESSION IN VERSCHIEDENEN ZELLULÄREN SCHLEIMPILZEN.....	89
VERSUCHE ZUR ÜBEREXPRESSION VON CALCINEURIN B.....	90
<i>Expression der kompletten Calcineurin B cDNA Isoformen in Wildtyp Ax2 und in Calcineurin A überproduzierenden Zellen</i>	91
<i>Expression eines N- und C-terminal verkürzten Calcineurin B</i>	91
DISKUSSION	93
ISOLIERUNG DES CALCINEURIN B GENS SOWIE DER cDNA ISOFORMEN	93
REINIGUNG UND BIOCHEMISCHE CHARAKTERISIERUNG VON CALCINEURIN B	94

<i>Bindung des Calcineurin Holoenzym an Calmodulin-Sepharose 4B und an eine Ni²⁺-NTA Matrix</i>	94
<i>Calcineurin B erhöht die Phosphataseaktivität gegenüber dem R_{II} Phosphopeptid, nicht jedoch gegenüber pNPP</i>	95
ENTWICKLUNGSABHÄNGIGE REGULATION DER CALCINEURIN B EXPRESSION.....	95
DIE CALCINEURIN B CDNA ISOFORMEN UNTERSCHIEDEN SICH NUR AM 5' ENDE.....	97
EIN NEUER MECHANISMUS DER mRNA PROZESSIERUNG?	99
1) <i>Verwendung alternativer Promotoren</i>	100
2) <i>Interne Initiation der Translation</i>	100
3) <i>Spleißen, alternatives Spleißen und autokatalytisches Spleißen</i>	101
4) <i>Einfluss des Poly(A) Schwanzes</i>	101
5) <i>Gezielte Degradation der cnb_{1L} mRNA</i>	102
MÖGLICHE FAKTOREN DES CNB _{1L} mRNA PROZESSIERUNGSMCHANISMUS.....	103
1) <i>Ist die Prozessierung der cnb_{1L} mRNA an die Translation gekoppelt?</i>	103
2) <i>Einfluss der cnb_{1L} mRNA Sekundärstruktur</i>	104
3) <i>Beteiligung einer strukturabhängigen Nuklease?</i>	104
MODELL.....	106
MÖGLICHE FUNKTION DER ZWEI CALCINEURIN B PROTEINISOFORMEN	107
AUSBLICK.....	109
ANHANG	111
REFERENZEN	112

Einleitung

Der Organismus *Dictyostelium discoideum*

Der zu den Acrasiomyceten gehörende zelluläre Schleimpilz *Dictyostelium discoideum* ist ein guter Modellorganismus zur Untersuchung von Chemotaxis, Signaltransduktion und Differenzierungsprozessen. Bei Nahrungsmangel bildet sich innerhalb kurzer Zeit aus den ursprünglich als Einzelzellen lebenden Amöben ein vielzelliger Organismus aus. Dieser besteht aus nur zwei unterschiedlich differenzierten Zelltypen, den Stiel- und den Sporenzellen. Da für diesen Prozess sowohl interzelluläre Kommunikation und gerichtete Zellbewegung als auch eine differentielle Veränderung der Genexpression notwendig sind, eignet sich der Organismus besonders gut zur Untersuchung dieser Vorgänge. Ein weiterer Vorteil besteht darin, dass die Differenzierung getrennt vom Wachstum abläuft.

Dictyostelium besitzt ein relativ kleines, haploides Genom von ca. 34 Megabasen die auf 6 Chromosomen verteilt sind (Kay & Williams, 1999). Dieser Organismus eignet sich deshalb gut für molekularbiologische Manipulationen (Übersicht in (Kuspa, Dingermann & Nellen, 1995)).

Dictyostelium discoideum durchläuft einen interessanten Lebenszyklus (Abb. 1). Die amöboid lebenden Zellen findet man in der oberen Laubschicht des Waldbodens, wo sie sich durch Phagozytose von Bakterien ernähren. Dabei bewegen sie sich chemotaktisch aufgrund der von den Bakterien produzierten Folsäure auf ihre Nahrung zu (Loomis, 1975). Nach dem Versiegen der Nahrungsquelle beginnen die Zellen mit dem Entwicklungsprozess. Innerhalb der ersten Stunden der Hungerperiode entwickeln sie ein Kommunikationssystem, welches Voraussetzung für die Ausbildung eines vielzelligen Organismus ist. Dieses System basiert auf der Synthese, Ausscheidung und Detektion von chemotaktisch wirksamem cyclischem AMP (cAMP), sowie auf der Weiterleitung dieses Signals.

Vier bis fünf Stunden nach dem Einsetzen der Hungerphase beginnen einige der Zellen cAMP zu produzieren und auszuschleiden. Diese Ausscheidung verläuft pulsartig alle 5-6 Minuten und bewirkt u.a., dass Zellen, welche dieses Signal empfangen, ebenfalls beginnen, cAMP zu produzieren und auszuschütten. Dadurch bilden sich konzentrische cAMP-Wellen aus, das Signal wird verstärkt, und die Zellen beginnen sich chemotaktisch auf das Aggregationszentrum hinzubewegen (siehe Übersicht in (Devreotes, 1982)). Das

auf der Zelloberfläche gebundene cAMP wird innerhalb kurzer Zeit von Zelloberflächen-gebundenen und von in Lösung befindlichen, extrazellulären cAMP-Phosphodiesterasen abgebaut (Malchow et al., 1972). Zu diesem Zeitpunkt beginnen die Zellen bereits erste Zell-Zell-Kontakte in Form von End-zu-End-Kontakten auszubilden und sich in Zellströmen in Richtung des Aggregationszentrums zu bewegen (Raper, 1935). Als Konsequenz bildet sich nach ca. 10 Stunden ein Aggregat aus bis zu 10^5 Zellen (Loomis, 1975), das zu dem sogenannten Pseudoplasmodium differenziert. Diese Struktur ist von einer schützenden Schleimhülle umgeben und wird aufgrund ihrer Ähnlichkeit zu einer Nacktschnecke als "slug" bezeichnet (Raper & Fennell, 1952). Im "slug" können bereits die zwei vordifferenzierten Zelltypen unterschieden werden: die Prästielzellen im anterioren Bereich und die Präsporenzellen im posterioren Bereich (Raper, 1940), sowie einige Zellen, die als "anterior like cells" bezeichnet werden und vermutlich als Reservoir für die Prästielzellen dienen (Sternfeld & David, 1982). Der "slug" ist in der Lage, auf seinem Untergrund zu migrieren, wobei er sich phototaktisch und thermotaktisch orientiert (Bonner et al., 1950), oder er geht sofort durch Ausbildung des "mexican hat" zum nächsten und letzten Differenzierungsschritt, der Kulmination, über. Nach ca. 24 Stunden bildet sich der Fruchtkörper aus, der aus einer Fußscheibe, einem Stiel und einem Sporenkopf besteht. Während die Stiel- und Fußscheibenzellen nicht mehr lebensfähig sind, können die Sporen sehr lange in einem Ruhezustand überdauern (Übersicht in (Raper, 1984)). Unter günstigen Umweltbedingungen keimen sie wieder aus und bilden neue, wieder als Einzelindividuen lebende Amöben (Loomis & Devreotes, 1982).

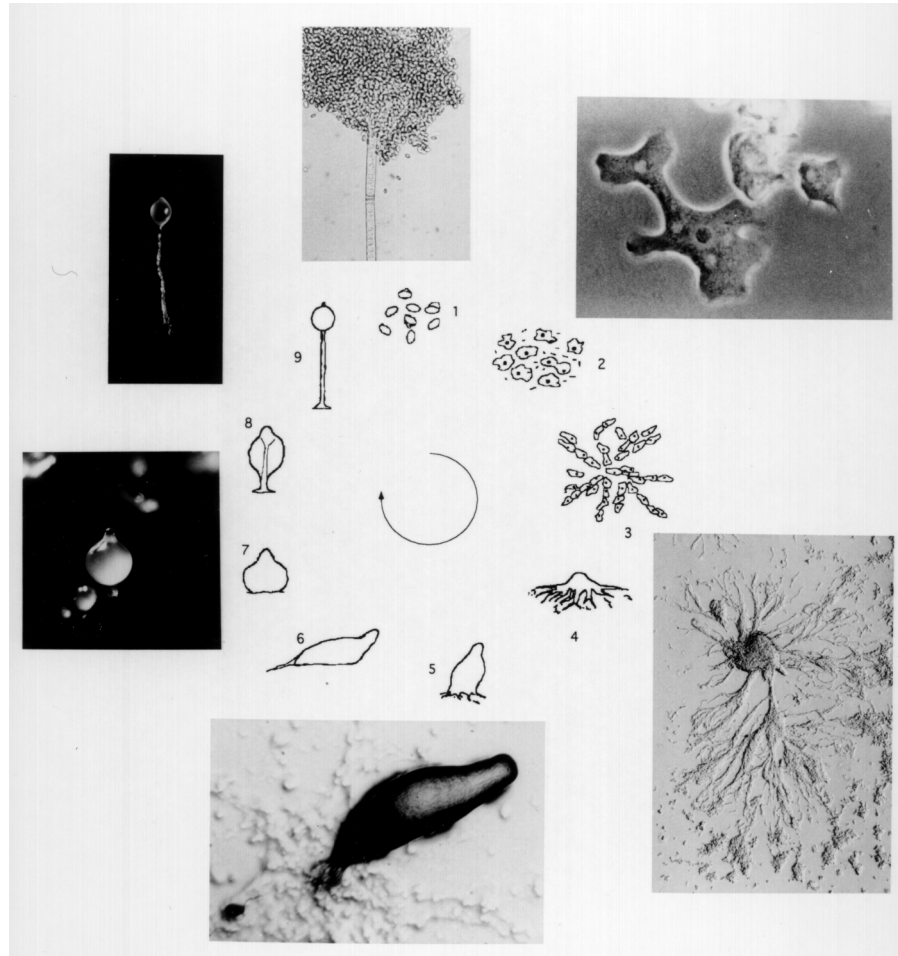


Abb. 1: Lebenszyklus von *Dictyostelium discoideum*

Calcium

Ca^{2+} -Ionen spielen in eukaryontischen Zellen eine wichtige Rolle als intrazellulärer Botenstoff (Means, 1995). Für die Zellen ist es aufgrund ihres phosphatabhängigen Stoffwechsels wichtig, die cytosolische Ca^{2+} -Konzentration niedrig zu halten, da Ca^{2+} mit Phosphaten Komplexe bildet, die im wässrigen Milieu unlöslich sind. Durch die Aktivität von

Ca²⁺-Kanälen, Ca²⁺-Pumpen und Ca²⁺-Speichern ist es der Zelle möglich, die intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration auf einem Ruhewert von ca. 10⁻⁷ M zu halten. Dieser Wert liegt somit deutlich unter der extrazellulären Ca²⁺-Konzentration von 10⁻³ M. Aufgrund dieses großen Ca²⁺-Gradienten über die Plasmamembran kann nach Öffnen von Ca²⁺-Kanälen in der Plasmamembran Ca²⁺ in die Zelle einströmen. Diese intrazelluläre Ca²⁺-Änderung führt in der Zelle zur Auslösung weiterer Prozesse (Übersicht in (Tsien & Tsien, 1990)).

Die cAMP-vermittelte Signaltransduktion und die Bedeutung von Calcium in *Dictyostelium discoideum*

Ca²⁺-Ionen spielen auch in *Dictyostelium* Zellen eine wichtige Rolle als intrazellulärer Botenstoff. Im Gegensatz zu Säugerzellen ist die extrazelluläre Ca²⁺-Konzentration bei natürlich vorkommenden *Dictyostelium* Zellen jedoch z.T. großen Schwankungen unterworfen.

Nach Bindung des chemotaktischen Lockstoffs cAMP an die cAMP-Rezeptoren auf der Zelloberfläche werden eine ganze Reihe intrazellulärer Reaktionen ausgelöst (Übersicht in (Van Haastert, 1995)). Unter anderem erfolgt ein transienter, intrazellulärer Anstieg der Ca²⁺-Konzentration (Schlatteer et al., 1994; Sonnemann, Aichem & Schlatteer, 1998; Yumura, Furuya & Takeuchi, 1996). Dieser Anstieg in der Ca²⁺-Konzentration spielt eine wichtige Rolle sowohl bei der Chemotaxis als auch bei der Differenzierung der Zellen. Unterweger und Schlatteer (1995) schleusten mittels "scrape-loading" den Ca²⁺-Chelator BAPTA in die Zellen ein und zeigten dadurch, dass die transiente Erhöhung der Ca²⁺-Konzentration für die Bewegung und Orientierung der Zellen erforderlich ist. Durch die so erzielte Verringerung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration wurde die Ausbildung von Pseudopodien und Filopodien gehemmt. Diese Beobachtung wird durch weitere Arbeiten unterstützt, die Ca²⁺-abhängige Umlagerungen im Cytoskelett messen konnten ((Condeelis & Taylor, 1977; Europe-Finner & Newell, 1986; Malchow, Böhme & Rahmsdorf, 1981) und Übersicht in (Newell, Malchow & Gross, 1995)).

Neben der Chemotaxis regulieren Ca²⁺-Signale in *Dictyostelium discoideum* auch Zellaggregation und Differenzierung (Übersicht in (Newell et al., 1995)). Unterschiedliche Befunde liegen für den Einfluss von Ca²⁺-Ionen auf die differentielle Genexpression vor. Das derzeitige Modell impliziert eine Rolle von Ca²⁺ für die prästielzellspezifische Genexpression. Durch den Einsatz eines Ca²⁺-ATPasen-Inhibitors konnten Schaap und Mitarbeiter (1996) die DIF ("differentiation inducing factor") induzierte Erhöhung der cytosolischen Ca²⁺-Konzentration nachahmen und die dadurch vermittelte Expression von stielzellspezifischen Genen induzieren. Konsistent hierzu wurden in Prästielzellen größere

Ca²⁺-Speicher sowie höhere cytosolische Ca²⁺-Konzentrationen als in Präsporenzellen gemessen (Maeda & Maeda, 1973). Experimente mit Apoaequorin-exprimierenden Zellen führten ebenfalls zu dem Schluss, dass Prästielzellen über mehr gespeichertes Ca²⁺ verfügen als Präsporenzellen (Cubitt et al., 1995). Im Gegensatz zu diesen Daten wurde kürzlich mittels Röntgenmikroanalyse gezeigt, dass die Ca²⁺-Speicher der Präsporenzellen mehr Ca²⁺ besitzen als die der Prästielzellen (C. Schlatterer, persönliche Mitteilung). Einen Einfluss von Ca²⁺-Ionen auch auf die Präsporen-spezifische Genexpression wurde von Blumberg und Mitarbeiter (1988; 1989) sowie Pinter und Gross (1995) gezeigt.

Calmodulin und Calmodulin Bindeproteine

Ca²⁺-Ionen wirken im Cytosol meist über Vermittlermoleküle auf intrazelluläre Ziele. Bei diesen Vermittlermolekülen handelt es sich um Ca²⁺-Bindeproteine. Durch Ca²⁺-Bindung erfahren diese Proteine eine Konformationsänderung. Die daraus resultierende Aktivitätsänderung befähigt diese Proteine die Aktivität weiterer Enzyme zu beeinflussen. Eines der wichtigsten und gleichzeitig eines der am besten untersuchten Ca²⁺-Bindeproteine ist Calmodulin (Cohen & Klee, 1988). Calmodulin ist ein kleines, hitzestabiles Protein (im Säugergewebe mit 16.7 kDa). Es gehört zur Familie der EF-Hand Calcium-Bindeproteine und besitzt vier Ca²⁺-Bindedomänen mit einem charakteristischen "Helix-Loop-Helix" Motiv. In einer hantelförmigen Struktur werden zwei globuläre Domänen, die jeweils zwei Ca²⁺-Bindedomänen beinhalten, durch eine lange α -Helix voneinander getrennt (Kretsinger, 1980; Babu, Bugg & Cook, 1988). Calmodulin besitzt keine Enzymaktivität. Die Bindung von Ca²⁺ führt zu einer Konformationsänderung, in deren Folge auf den globulären Domänen saure und hydrophobe Bereiche exponiert werden. Dadurch wird eine Interaktion mit den Zielproteinen ermöglicht (Übersicht in (James, Vorherr & Carafoli, 1995)). Zielproteine von Calmodulin sind Proteine des Cytoskeletts, wie z.B. MAP-2 oder Enzyme des Metabolismus cyclischer Nukleotide, wie z.B. Isoformen der Adenylatcyclase. Weitere Zielproteine sind verschiedene Kinasen, wie z.B. die Ca²⁺/Calmodulin abhängigen Kinasen I und II sowie die Proteinphosphatase Calcineurin (Übersicht in (Cohen & Klee, 1988; Means et al., 1991)).

Die Ca²⁺/Calmodulin abhängige Proteinphosphatase Calcineurin

Die Ca²⁺/Calmodulin abhängige Proteinphosphatase Calcineurin wurde erstmals aus Rinderhirn isoliert, wo sie 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 (Steward 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, Draetta & Hubbard, 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. Das aktive Zentrum enthält ein für alkalische und saure Phosphatasen typisches Zn²⁺/Fe³⁺-bindendes Motiv (Vincent & Averill, 1990). Diese Metallionen scheinen eine wichtige Rolle bei der Bindung und Orientierung der Phosphatgruppe des Substrats einzunehmen (Villafranca, Kissinger & Parge, 1996). 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). Diese hohe Konservierung deutet auf die unentbehrliche Funktion dieser Untereinheit für die Phosphatase hin. Die Calmodulin-Bindedomäne ist weniger gut konserviert (Kincaid, 1993). Diese Domäne hat die Fähigkeit, eine basisch amphiphile, für Calmodulin-Bindestellen typische α -Helix auszubilden (Kincaid, Nightingale & Martin, 1988). Wie Röntgenstrukturanalysen zeigen, liegt die autoinhibitorische Domäne in Abwesenheit von Ca²⁺/Calmodulin über der katalytischen Domäne und unterbindet so die Substratbindung an das aktive Zentrum (Kissinger et al., 1995). Bindung von Ca²⁺/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 Ca²⁺/Calmodulin binden kann, es aber nicht mehr für seine Aktivierung benötigt (Manalan & Klee, 1983; Kincaid, Martensen & Vaughan, 1986). Je nach Organismus existieren mehrere Calcineurin A Isoformen (Guerini & Klee, 1989).

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 & Cohen, 1988). 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 10^{-7} M 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 Voraussetzung. Ein Serin oder Threonin an Position 6 und ein Lysin oder Arginin an Position 8 werden außerdem bevorzugt (Resh, 1999). Die Myristoylierung scheint aber 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, Brockman & Rusnak, 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, Phillips & Howells, 1996). In Rattengewebe existieren drei Calcineurin B Isoformen (Chang et al., 1994; Mukai et al., 1991; Su et al., 1995). Dabei handelt es sich um das für Hodengewebe spezifische, Calcineurin B homologe Protein CNB β , welches von einem eigenen Gen kodiert wird. Das Protein hat

eine apparente Größe von 21 kDa. Das zweite Gen - *CNB α* - kodiert für das sogenannte "Gehirn-Typ" Calcineurin B. Das Protein *CNB α 1* hat eine apparente Größe von 19.3 kDa. Ausgehend von diesem Gen wird ebenfalls spezifisch im Hodengewebe eine weitere mRNA Isoform - *CNB α 2* - exprimiert. Diese mRNA unterscheidet sich durch eine Verlängerung von 138 Basen am 5' Ende von der mRNA für das *CNB α 1* Protein und entsteht entweder durch die Aktivität eines alternativen, hodenspezifischen Promotors, oder durch alternatives Spleißen eines 5' nicht-kodierenden Exons (Chang et al., 1994). Das Protein hat eine Größe von 24.9 kDa. Die Expression von beiden hodenspezifischen Calcineurin B Transkripten nimmt im Verlauf der embryonalen Hodenentwicklung zu. Eine hodenspezifische Calcineurin B Isoform wurde auch in Mäusen (Ueki, Muramatsu & Kincaid, 1992) und in humanem Hodengewebe (Wang et al., 1996) nachgewiesen.

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).

Kessen und Mitarbeiter (1999) stellten kürzlich 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 R_{II} 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 et al. (2000) beschrieben. Sie kamen zu dem Schluss, dass Calcineurin *in vivo* durch Redoxprozesse reguliert werden kann. 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, 1997).

Funktionen von Calcineurin

Calcineurin ist an vielen bedeutenden Prozessen in der Zelle beteiligt. Im folgenden wird nur auf einige Funktionen näher eingegangen.

Die Regulation der Interleukin-2 (IL-2) Transkription im Zuge der T-Zell Aktivierung ist eine der am besten untersuchten Funktionen von Calcineurin (Übersicht in (Crabtree & Clipstone, 1994)). Die Stimulierung des T-Zellrezeptors führt neben weiteren Effekten zu einer Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration und zur Aktivierung von Calcineurin durch Bindung von Ca^{2+} /Calmodulin. Der Transkriptionsfaktor NFAT ("nuclear factor of activated T-cells") besteht aus zwei Untereinheiten. Die cytoplasmatische Untereinheit NFATc wird durch Calcineurin dephosphoryliert, wodurch das nukleäre Transportsignal demaskiert wird und NFATc in den Kern transloziert wird (Beals et al., 1997). Dort befindet sich die zweite Untereinheit NFATn, welche ebenfalls durch einen T-Zellrezeptor-vermittelten Signalweg aktiviert wird. NFATn ist ein Heterodimer aus Mitgliedern der Fos- und Jun-Proteinfamilie von Transkriptionsfaktoren (Übersicht in (Weiss & Littman, 1994)). Beide Untereinheiten bilden im Zellkern einen Komplex, binden an spezifische Promotorregionen des IL-2 Gens und aktivieren die IL-2 Transkription (McCaffrey et al., 1993).

Shibasaki und Mitarbeiter (1996) zeigten, dass Calcineurin im Komplex mit NF-ATc in den Kern transportiert wird. Cabin 1 ist ein nukleäres Protein in T-Zellen, welches direkt oder indirekt durch die Proteinkinase C hyperphosphoryliert wird. In diesem Zustand bindet es mit hoher Affinität an Calcineurin und hemmt dessen Phosphataseaktivität. Dadurch wirkt es als negativer Regulator der Calcineurin-vermittelten Aktivierung der Immunantwort (Sun et al., 1998).

Cyclosporin A (CsA) und FK506 zählen zu den wirksamsten Immunsuppressiva und werden bei Organtransplantationen und Autoimmunkrankheiten eingesetzt (Übersicht in (Kunz & Hall, 1993)). Diese Drogen binden intrazellulär an die löslichen Rezeptormoleküle Cyclophilin bzw. FK506-Bindeprotein-12 (FKBP12). Sie sind fähig, die Translokation von NFATc in den Zellkern und somit die Aktivierung der Immunantwort zu hemmen. Dies geschieht, indem die Komplexe aus CsA/Cyclophilin und FK506/FKBP12 Ca^{2+} -abhängig und mit hoher Affinität an Calcineurin binden und somit ebenfalls dessen Phosphataseaktivität hemmen (Liu et al., 1991).

Möglicherweise wird die Ca^{2+} -Freisetzung aus Inositol-1,4,5-trisphosphat (InsP_3)-sensitiven Speichern über Calcineurin reguliert. Calcineurin ist *in vivo* über das FKBP12 mit dem InsP_3 -Rezeptor dieses Ca^{2+} -Speichers assoziiert und reguliert über die Kontrolle des

Phosphorylierungsstatus des Rezeptors den Ionenfluss durch diesen Ca^{2+} -Kanal. Liegt der Rezeptor phosphoryliert vor, ist er sensitiv gegenüber InsP_3 und ein InsP_3 -induzierter Ca^{2+} Ausstrom kann stattfinden. Wird der Rezeptor durch Calcineurin dephosphoryliert, wird er insensitiver gegenüber InsP_3 . Eine ähnliche Funktion von Calcineurin ist auch im Fall des Ryanodin-Rezeptors möglich, da Calcineurin auch assoziiert mit dem Ryanodin-Rezeptor/FKBP12 Komplex vorliegt (1995; Cameron et al., 1997). Unter Einsatz der Immunsuppressiva CsA und FK506 wurde in Neuronen gezeigt, dass Calcineurin zudem einen stimulierenden Einfluss auf die Expression des InsP_3 -Rezeptors hat (Genazzani, Carafoli & Guerini, 1999).

Eine weitere wichtige Funktion nimmt Calcineurin bei der Zellzyklus-Kontrolle ein. In *Saccharomyces cerevisiae* können sich Zellen des Paarungstyps a, bei denen die Gene für Calcineurin A oder B ausgeschaltet sind, nicht mehr von dem durch das α -Pheromon induzierten Zellzyklus-Arrest in der G1-Phase erholen (Cyert & Thorner, 1992). In *Saccharomyces cerevisiae* wurden eine Reihe weiterer Funktionen von Calcineurin beschrieben. So wurde eine Beteiligung an der Adaptation der Hefezellen an hohe Salzkonzentrationen (Nakamura et al., 1993), bei der Ca^{2+} -Sequestrierung, der Cytogenese und der Sporulation (Yoshida, Toda & Yanagida, 1994; Tanida et al., 1995) nachgewiesen.

In *Aspergillus nidulans* ist Calcineurin ebenfalls an der Regulation des Zellwachstums und der Zellteilung beteiligt. Wird das Calcineurin A Gen ausgeschaltet, so wird ebenfalls der Übergang von der G1- zur S-Phase gehemmt (Rasmussen et al., 1994). Untersuchungen zur Wachstumsfaktor-induzierten DNA Synthese in der Swiss-3T3-Fibroblasten Zelllinie unter Einsatz der Calcineurin Hemmstoffe CsA und FK506 lassen vermuten, dass Calcineurin hier ebenfalls den Übergang von der G1- in die S-Phase reguliert (Tomono et al., 1996).

Weitere Funktionen von Calcineurin wurden bei der Apoptose (Yazdanbakhsh et al., 1995; Asai et al., 1999), in unterschiedlichen Zelltypen bei der Exocytose (Momayezi et al., 1987; Hultsch et al., 1990; Forrest et al., 1991; Antoni et al., 1995; Renström et al., 1996) und bei der Endocytose von synaptischen Vesikeln (Liu, Sim & Robinson, 1994) nachgewiesen. In Neuronen des Hippocampus hemmt aktiviertes Calcineurin die Freisetzung der Neurotransmitter Glutamat und γ -Aminobuttersäure (GABA) (Stelzer, 1992; Nichols, Suplick & Brown, 1994). Calcineurin wird auch eine Rolle bei der Alzheimer'schen Krankheit zugeschrieben (Übersicht in (Kincaid, 1995)).

Calcineurin in *Dictyostelium discoideum*

In *Dictyostelium discoideum* ist wenig über die Funktion von Calcineurin bekannt. Bei der cAMP-vermittelten Signaltransduktion während der Chemotaxis wurde eine Beteiligung von Calcineurin vermutet, da in Gegenwart des Calcineurin-Hemmstoffs Deltamethrin die Chemotaxis der *Dictyostelium* Zellen gehemmt wurde (Polesky & O'Day, 1995).

PAT1 ist eine PMCA-Typ Ca^{2+} -ATPase der kontraktilen Vakuole von *Dictyostelium*. Bei hohen extrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationen wird die PAT1-mRNA verstärkt exprimiert. Unter Einsatz von CsA und FK506 wurde gezeigt, dass diese Ca^{2+} -abhängige Induktion der PAT1-mRNA Expression von Calcineurin abhängig ist (Moniakis, Coukell & Janiec, 1999).

Horn und Gross (1996) zeigten in einem *in vitro* Differenzierungstest, dass die Calcineurin Hemmstoffe CsA und FK506 einen deutlichen Effekt haben. So wurde die Stielzellbildung in Wildtypzellen und die Sporenbildung in der sporogenen Mutante HM18 gehemmt. Dabei wirkten beide Drogen nur während der frühen Differenzierung der Zellen hemmend, nicht jedoch in der späten Entwicklungsphase. Ein wichtiger Einfluss von Calcineurin auf die Differenzierung wird deshalb vermutet.

Bisher wurde aus *Dictyostelium discoideum* nur das Gen für die katalytische Untereinheit Calcineurin A isoliert (Dammann et al., 1996) und das Protein gereinigt und biochemisch charakterisiert (Hellstern et al., 1997). Das von einem Gen kodierte Protein weist im Vergleich zu anderen Organismen N- und C-terminale Extensionen auf. Innerhalb der C-terminalen Verlängerung wurden Konsensus-Sequenzen der Phosphorylierungsstellen für die Caseinkinase II gefunden.

Die Calcineurin A Expression wird während der Differenzierung reguliert. In vegetativen Zellen wird sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene die stärkste Expression beobachtet. Zu Beginn der Differenzierung nimmt die Expression von mRNA und Protein zunächst ab und erreicht mit der Ausbildung fester Aggregate wieder ein Maximum. Gegen Ende der Entwicklung sinkt die Protein- und mRNA-Menge wieder ab (Dammann et al., 1996).

Versuche, die Calcineurin A Expression durch "antisense-Mutagenese" abzuschwächen, um dadurch einen Einblick in die Funktion von Calcineurin in *Dictyostelium* zu erhalten, scheiterten bislang an der Instabilität der erhaltenen Transformanten (Kessen, 1995). Calcineurin A überproduzierende Zellen zeigten weder im Wachstum noch in der Entwicklung einen veränderten Phänotyp (Hellstern et al., 1997).

Regulation der mRNA und Proteinexpression in Eukaryonten

Die Calcineurin A und B Isoformen anderer Organismen entstehen durch sehr unterschiedliche Mechanismen. Auf die Regulation der mRNA- und Proteinexpression in eukaryontischen Zellen wird im folgenden näher eingegangen.

Regulationsmechanismen auf Ebene der Transkription

Verwendung alternativer Promotoren

Eine Möglichkeit, wie ausgehend von einem Gen mehrere mRNA Isoformen entstehen können, ist die Verwendung von alternativen Promotoren. Dies tritt oft bei gewebespezifischer oder entwicklungsabhängiger Genexpression auf. In unterschiedlichen Gewebetypen sind so verschiedene Promotoren aktiv, die oft auch unterschiedlich stark sind. Je nachdem wo die Promotorbereiche lokalisiert sind, verfügen die mRNA Isoformen über unterschiedliche Sequenzen im 5' Bereich. Falls der zweite Promotor so lokalisiert ist, dass der Translationsstart innerhalb des ersten kodierenden Exons liegt, wird bei der Translation ein anderes Startkodon verwendet als bei Transkripten, die ausgehend vom ersten Promotor exprimiert werden. Das resultierende Protein ist dadurch N-terminal kürzer. Ausgehend von einem Gen können so Proteinisoformen mit unterschiedlicher Struktur und Funktion entstehen (Übersicht in (Ayoubi & Van de Ven, 1996)).

Die Verwendung von alternativen Promotoren ist auch in *Dictyostelium* für das *P8A7* Gen (Maniak & Nellen, 1990), den cAMP-Rezeptor Subtyp *cAR1* (Fumiyoshi & Maeda, 1994; Louis, Saxe III & Kimmel, 1993) und das Phosphodiesterase Gen (Podgorski et al., 1989) beschrieben. Im Fall des *P8A7* Gens entstehen z.B. zwei mRNA Isoformen mit 700 und 1000 Basen, deren Expression entwicklungsabhängig reguliert ist (Maniak & Nellen, 1988).

Spleißen, alternatives Spleißen und autokatalytisches Spleißen

Die meisten unreifen eukaryontischen mRNAs enthalten ein oder mehrere Introns, die im Zuge der mRNA Reifung durch konstitutives Spleißen entfernt werden. Findet alternatives Spleißen statt, so werden neben Introns auch Exons entfernt. Durch die Verwendung alternativer 5' oder 3' Spleißstellen können auch nur Teile von Exons entfernt werden oder aber auch Teile von Introns in der reifen mRNA zurückbleiben. Ausgehend von einem Gen entstehen so verschiedene mRNA Isoformen, die sich in ihrer Sequenz unterscheiden. Werden Exons entfernt, so entstehen Proteine mit unterschiedlicher Größe und eventuell auch mit unterschiedlichen Funktionen (Übersicht in (Breitbart, Andreadis &

Nadal-Ginard, 1987; McKeown, 1992)). Alternatives Spleißen ist auch bei *Dictyostelium discoideum* bekannt, wie z. B. im Fall des cAMP Rezeptor Subtyps *CAR1* (Louis et al., 1993; Fumiyoshi & Maeda, 1994). Hier entstehen durch die Aktivität zweier alternativer Promotoren, ausgehend von einem Gen, entwicklungsabhängig zwei mRNA Isoformen. Beide mRNA Isoformen werden zusätzlich alternativ gespleißt. Da das alternative Spleißen in der 5' nicht-translatierten Region stattfindet, sind die von diesen mRNAs abstammenden Proteine identisch. Alternatives Spleißen erzeugt auch im Fall des *Dictyostelium* cAMP-Bindeproteins CABP1 zwei mRNA Isoformen (Grant, Bain & Tsang, 1990). Hier wird ein kodierendes Exon entfernt, was zu Proteinen unterschiedlicher Größe führt. Die spezifisch im Hodengewebe von Ratten nachgewiesene CNB α 2 Calcineurin B mRNA Isoform unterscheidet sich von der Gehirn-Typ Isoform CNB α 1 durch eine Verlängerung von 138 Basen am 5' Ende. Diese Verlängerung entsteht vermutlich durch die Verwendung von zwei alternativen Promotoren, oder ebenfalls durch alternatives Spleißen eines 5' nicht-kodierenden Exons (Chang et al., 1994).

Autokatalytisches Spleißen findet nur bei einigen mRNAs statt. Genau wie beim Spleißen im Spleißosom, werden auch hier Introns aus der Sequenz entfernt. Dieser Mechanismus ist aber weder abhängig von Energiezufuhr noch von Proteinen (Cech, 1987; Sharp, 1994).

Einfluss des Poly(A) Schwanzes

Der Poly(A) Schwanz hat Einfluss auf Prozesse, die am 5' Ende der mRNA stattfinden. So wird einigen Faktoren, die an der Polyadenylierung beteiligt sind, in Eukaryonten auch eine Beteiligung an Prozessen wie dem Anfügen der 7-Methyl-Guanosin-Kappe an das 5' Ende der mRNA, Spleißen des primären Transkripts, sowie eine Beteiligung bei der Initiation und Termination der Transkription zugeschrieben (Übersicht in (Minvielle-Sebastia & Keller, 1999)). In *Saccharomyces cerevisiae* wurde gezeigt, dass der Poly(A) Schwanz über das Poly(A) bindende Protein Pab1p und den Translations-Initiationsfaktor eIF-4G einen Komplex mit der 7-Methyl-Guanosin-Kappe der mRNA eingeht. Diese ringförmige Struktur schützt die mRNA vor dem Abbau (Culbertson, 1999).

Der Poly(A) Schwanz beeinflusst indirekt über das Poly(A)-Bindeprotein (PAB) die Initiation der Translation, da durch das Poly(A)-Bindeprotein die Bindung der 40S-ribosomalen Untereinheit verstärkt wird (Sachs, Sarnow & Hentze, 1997). Entsprechend wurde in *Saccharomyces cerevisiae* gezeigt, dass eine verringerte PAB Menge die Initiation der Translation hemmte (Sachs & Davis, 1989).

Regulation auf der Ebene der Translation

Initiation der Translation

Bei der Initiation der Translation lagert sich die 40S-ribosomale Untereinheit zusammen mit der Methionin-beladenen tRNA sowie bestimmten Initiationsfaktoren an das 5' Ende der mRNA an und wandert in Richtung 3' Ende, bis sie auf das erste Startkodon stösst ("scanning" Mechanismus). Die Wahl des Startkodons ist abhängig von einer bestimmten Konsensus-Sequenz. Die optimale Konsensus-Sequenz für die Initiation der Translation bei Eukaryonten beinhaltet ein Adenin an Position -3 und ein Guanin an Position +4. Wird ein AUG Kodon als Startkodon festgelegt, so wird die 60S-ribosomale Untereinheit rekrutiert und die Translation beginnt. Bei der Mehrzahl aller eukaryontischen mRNAs ist das erste AUG Kodon auch das Startkodon. Es gibt jedoch Ausnahmen. Im Fall des sogenannten "leaky scanning" übergeht die 40S-ribosomale Untereinheit in den meisten Fällen das erste AUG Kodon, weil sich dieses in einem suboptimalen Kontext befindet. Die Initiation der Translation findet dann sowohl am ersten als auch am zweiten oder sogar dritten AUG Kodon statt (Übersicht in (Kozak, 1999)). Im Fall von Termination/Reinitiation verbleibt die 40S-ribosomale Untereinheit nach Beendigung der Translation auf der mRNA und startet an einem stromabwärts gelegenen AUG erneut die Translation (Peabody & Berg, 1986). Bei interner Initiation beginnt die Translation nicht an dem AUG, welches dem 5' Ende am nächsten liegt, sondern an einem internen AUG Kodon (Übersicht in (Kozak, 1999)). Durch diese Mechanismen entstehen, ausgehend von einer mRNA, mehrere Proteinisoformen.

mRNA Degradations-Mechanismen

Die Halbwertszeiten verschiedener mRNAs im Cytoplasma unterscheiden sich z.T. erheblich. Manche mRNAs sind nur für einige Minuten stabil, andere mRNAs sind über mehrere Stunden bis Tage stabil. mRNA-Abbau ist ein wichtiger Mechanismus für die Kontrolle der Genexpression. Man unterscheidet mRNA Abbau, der abhängig vom Entfernen des Poly(A) Schwanzes ist (Deadenylierungs-abhängiger mRNA Abbau) von mRNA Abbau, der unabhängig davon stattfindet ("nonsense-mediated mRNA decay"):

Eukaryontische mRNA wird hauptsächlich durch den Poly(A) Schwanz und die 7-Methyl-Guanosin-Kappe am 5' Ende vor der Degradation geschützt. *Dictyostelium* mRNAs besitzen ebenfalls Kappen, die im Vergleich zu den Säuger-Kappen leichte Unterschiede aufweisen (Dottin, Weiner & Lodish, 1976). Unterschiedliche Mechanismen der mRNA Degradation existieren in eukaryontischen Zellen. In allen Fällen findet jedoch entweder ein

5'→3' oder ein 3'→5' exonukleolytischer, vollständiger Abbau der mRNA statt, nachdem der Poly(A) Schwanz schrittweise so lange verkürzt wurde, bis das Poly(A)-bindende Protein nicht mehr binden kann. Der ringförmige Komplex zwischen dem Poly(A) Schwanz und der Kappe löst sich auf, die Kappe wird entfernt, und die mRNA wird degradiert (Übersicht in (Decker & Parker, 1994)).

In Eukaryonten existiert ein weiterer Degradationsmechanismus, bei dem fehlerhafte mRNAs erkannt und abgebaut werden. Dieser Mechanismus wird als "nonsense-mediated mRNA decay" bezeichnet und findet ohne vorherigen Abbau des Poly(A) Schwanzes statt. Die durch diesen Mechanismus abgebauten mRNAs weisen Leserasterverschiebungen oder Basenaustausche auf, durch die Stopkodons innerhalb des offenen Leserasters entstehen. Diese führen zu einer verfrühten Beendigung der Translation, wodurch die mRNA-Abbau-Maschinerie aktiviert wird. Die 7-Methyl-Guanosin-Kappe wird entfernt und eine 5'→3' Exonuklease degradiert die mRNA (Culbertson, 1999).

Translationsabhängige Prozessierung

Die Stabilität bestimmter mRNAs wird durch die Translation beeinflusst. Manche mRNAs werden durch die Translation vor dem schnellen Abbau geschützt, bei anderen mRNAs sind hingegen Translation und Degradation gekoppelt. Ein Beispiel für den zweiten Fall ist die *c-myc* mRNA, die durch Hemmstoffe der Proteinsynthese stabilisiert wird (Wisdom & Lee, 1991). Auch bei der β^0 -thalassämischen β -Globin mRNA Expression ist ein Translations-abhängiger mRNA Abbau beschrieben. Hier 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). Diese mRNA Isoformen verfügen sowohl über eine 7-Methyl-Guanosin-Kappe (Lim & Maquat, 1992) als auch über einen Poly(A) Schwanz (Lim et al., 1989). Die Autoren gehen davon aus, dass die Entstehung der kleineren mRNAs abhängig ist von der unvollständigen Translation der defekten mRNA, da die kleinen Transkripte nur im Cytoplasma, aber nie im Kern nachweisbar sind (Lim et al., 1989; Lim et al., 1992). Ein komplexer Mechanismus, der mRNA Sekundärstruktur und Enzyme wie z.B. strukturabhängige Endonukleasen oder 5' Exoribonukleasen einschliesst, wird vermutet (Lim & Maquat, 1992).

Translationskontrolle durch mRNA-Protein Interaktionen

Eines der besten untersuchten Modelle der Translationskontrolle durch mRNA-Protein Interaktion ist das Transferrin-Modell. Transferrin ist ein Eisen-Bindeprotein in eukaryontischen Zellen. Die Transferrin-mRNA bildet in der 5' nicht-translatierten Sequenz eine Haarnadelstruktur aus, das sogenannte "iron response element" (IRE). Bei Eisenmangel bindet ein IRE-Bindeprotein an diese Struktur und hemmt dadurch die Translation der Transferrin mRNA. Bei Eisenüberschuss sinkt die Affinität des IRE-Bindeproteins für das IRE ab, die Translation der Transferrin mRNA findet statt, und Eisen kann gespeichert werden. Der Transferrin-Rezeptor bindet den Transferrin-Eisen-Komplex. Bei Eisenmangel wird die mRNA des Rezeptors stabilisiert, indem an fünf IRE-Bereiche in der 3' nicht-translatierten Sequenz der Rezeptor-mRNA ebenfalls IRE-Bindeproteine binden. Dadurch werden die Destabilisierungselemente der mRNA verdeckt. Der Eisenstoffwechsel unterliegt somit sowohl der Translationskontrolle des Transferrins als auch der Abbaukontrolle der Transferrin-Rezeptor mRNA (Übersicht in (Munro, 1990; Melefors & Hentze, 1993; Sachs, 1993).

Ziele dieser Arbeit

Die Funktion der Ca^{2+} /Calmodulin-abhängigen Proteinphosphatase Calcineurin in *Dictyostelium discoideum* Zellen ist unklar. Bisher wurde nur das Gen für die katalytische Untereinheit Calcineurin A aus *Dictyostelium discoideum* isoliert (Dammann et al., 1996) und das Protein gereinigt und biochemisch charakterisiert (Hellstern et al., 1997). *Dictyostelium* Zellen, die Calcineurin A überproduzieren, zeigten weder im Wachstum noch in der Differenzierung einen veränderten Phänotyp (Hellstern et al., 1997). Dies ist durch die fehlende gleichzeitige Überproduktion der regulatorischen Untereinheit Calcineurin B zu erklären, die für die Erkennung spezifischer Substrate benötigt wird. Ziele dieser Arbeit waren deshalb:

- Isolierung des *Dictyostelium* Calcineurin B Gens und der cDNA
- Charakterisierung des Gens und der mRNA
- Untersuchungen zur entwicklungsabhängigen mRNA- und Proteinexpression
- Expression der Calcineurin B cDNA in *E. coli*, sowie die Reinigung und biochemische Charakterisierung des Proteins
- Herstellung von Calcineurin B Antiserum in Kaninchen
- Untersuchungen zur Funktion von Calcineurin in *Dictyostelium discoideum*

Material und Methoden

Material

Chemikalien und sonstige Materialien

Rotiphorese Gel 30 (30% Acrylamid mit 0.8% Bisacrylamid, 37.5 : 1)	Roth (Karlsruhe)
Agarose (Molecular Biology Grade)	Eurogentec (Seraing, Belgien)
Ammoniumpersulfat (APS)	Serva (Heidelberg)
BIOMOL GREEN™ Reagenz	Biomol (Hamburg)
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Rinderserumalbumin (BSA)	Roth (Karlsruhe)
Caesiumchlorid	Gibco BRL (Karlsruhe)
Casein Hydrolysat (Bactotrypton)	Gibco BRL (Karlsruhe)
Calmodulin-Sepharose 4B	Pharmacia (Freiburg)
Coomassie Brilliant Blue R250	Serva (Heidelberg)
Coomassie Protein Assay Reagent	Pierce (Rockford, USA)
Chromatographie Papier Chr 1MM und 3MM	Whatman (Maidstone, England)
CSPD	Boehringer (Mannheim)
Spectra/Por Dialyse Schlauch Ø 11.5 mm, 1 ml/cm, ≥ 3.5 kDa Ausschlussvolumen	Spektrum Medical Industries (Los Angeles, USA)
dNTP Mix (je 2 mM)	MBI Fermentas, (Vilnius, Litauen)
Dimethylpyrocarbonat (DMPC)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Ethylendinitrilotetraessigsäure, Dinatriumsalz-Dihydrat (EDTA)	Merck (Darmstadt)
Ethylenglycol-O,O'-bis(2-aminoethyl)-N,N,N',N'-tetraessigsäure (EGTA)	Fluka (Neu-Ulm)
Elektroporationsküvetten 2 mm	Biorad (München)
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Harnstoff	Roth (Karlsruhe)
Formamid reinst	Merck (Darmstadt)
Formaldehyd Lösung min. 36.5%	Riedel-de Haen (Seelze)
Guanidinthiocyanat	Fluka (Neu-Ulm)
Glasfaser Rundfilter Ø 47 mm	Schleicher & Schuell (Dassel)
Glycogen	Gibco BRL (Karlsruhe)
Heringssperma DNA	Boehringer (Mannheim)
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Roth (Karlsruhe)
Imidazol	Merck (Darmstadt)
Magermilchpulver (Frema Reform)	Finck GmbH (Herrenberg)
Maleinsäure	Merck-Schuchardt (Hohenbrunn)
2-Mercaptoethanol	Merck-Schuchardt (Hohenbrunn)
Mixed H ⁺ + OH ⁻ Bed Resin (Partikel Ø 300 - 850 µm)	Biorad (Richmond, USA)
Morpholinopropane sulfonic acid (MOPS)	Serva (Heidelberg)
MS-Agarose	Boehringer (Mannheim)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva (Heidelberg), Roth (Karlsruhe)
Ni ²⁺ -NTA Matrix	Qiagen (Hilden)

Nitrocellulose-Filter HABP (Ø 47 mm, 0.45 µm Porengröße)	Millipore (Eschborn)
N-Lauroylsarcosin, Natriumsalz	Sigma (Deisenhofen)
Nonidet P-40 (NP-40)	Fluka (Neu-Ulm)
NZ-Amine A (Casein Hydrolysat)	Interorgana (Köln)
Nytran Nylon-Membran (0.45 µm Porengröße)	Schleicher & Schuell (Dassel)
Aqua-Roti-Phenol pH 4.5-5	Roth (Karlsruhe)
p-Nitrophenylphosphat (pNPP)	Merck (Darmstadt)
Polyethylenimin (PEI)	Fluka (Neu-Ulm)
Proteinase K	AGS (Heidelberg)
Protran BA 85 Nitrocellulose-Membran (0.45 µm Porengröße)	Schleicher & Schuell (Dassel)
Roti-Block	Roth (Karlsruhe)
Röntgenfilme Fuji medical x-Ray	Allmedt (Essen)
Saccharose	Roth (Karlsruhe)
Select Agar	Gibco BRL (Karlsruhe)
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Serva (Heidelberg)
Polyoxyethylen-Sorbitan-Monolaurat (Tween 20)	Sigma (Deisenhofen)
Hefe Extrakt	Gibco BRL (Karlsruhe)
X-Gal	Appligene Oncor (Heidelberg)

Antibiotika

Ampicillin, Natriumsalz	Roth (Karlsruhe)
Streptomycin Sulfat	Serva (Heidelberg)
Kanamycin Sulfat	Appli Chem (Darmstadt)
G418 Sulfat (Geneticin)	Calbiochem - Novabiochem Corporation (La Jolla, USA)
Hygromycin B	Gibco BRL (Karlsruhe)
Blasticidin S Hydrochlorid	ICN Biochemicals (Aurora, USA)

Kits

Concert Rapid Plasmid Miniprep System	Gibco BRL (Karlsruhe)
Concert Rapid PCR Purification System	Gibco BRL (Karlsruhe)
RNeasy Plant Mini Kit	QIAGEN (Hilden)
DIG DNA Labeling Kit	Boehringer (Mannheim)
5' RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends, Version 2.0	Gibco BRL (Karlsruhe)
QIAquick Gel Extraction Kit	QIAGEN (Hilden)

Enzyme für die Molekularbiologie

Restriktionsenzyme	MBI Fermentas (Vilnius, Litauen) New England Biolabs (Schwalbach) Gibco BRL (Karlsruhe) Boehringer (Mannheim)
Expand™ High Fidelity PCR System	Boehringer (Mannheim)
Pow DNA Polymerase	Gibco BRL (Karlsruhe)
Taq DNA Polymerasen	MBI Fermentas, (Vilnius, Litauen) Gibco BRL (Karlsruhe)
"Shrimp" alkalische Phosphatase	Amersham Life Science (Braunschweig)
T4 DNA Ligase	MBI Fermentas (Vilnius, Litauen)
Lysozym	Sigma-Aldrich (Steinheim)

Antikörper

Kaninchenserum gegen <i>D. discoideum</i> Calcineurin B	diese Arbeit
Kaninchenserum gegen <i>D. discoideum</i> Calcineurin A, Anti-AB 42.2	(Dammann et al., 1996)
Peroxidase-gekoppelte Anti-Kaninchen-IgG	Dianova (Hamburg)
Monoklonaler Anti-GFP Antikörper	Boehringer (Mannheim)
Anti-Digoxigenin-AP Fab Fragmente	Boehringer (Mannheim)

Proteine

Gereinigtes, rekombinant exprimiertes <i>D. discoideum</i> Calcineurin B	diese Arbeit
Aus <i>D. discoideum</i> gereinigtes Calcineurin A	(Hellstern et al., 1997), freundlicherweise von U. Kessen überlassen
Calmodulin (Rinderhirn)	Alexis Biochemicals (San Diego, USA)
R _{II} Phosphopeptid (Asp-Leu-Asp-Val-Pro-Ile-Pro-Gly-Arg-Phe-Asp-Arg-Arg-Val-pSer-Val-Ala-Ala-Glu)	BIOMOL (Hamburg)

Standards für Proteingele

LMW Electrophoresis Calibrating Kit
(Mischung folgender Standardproteine: Phosphorylase b (94 kDa), BSA (67 kDa), Ovalbumin (43 kDa), Carboanhydrase (30 kDa), Trypsin-Inhibitor (20.1 kDa) und α -Lactalbumin (14.4 kDa).
Pharmacia (Freiburg)

HMW Proteinstandard Mischung, vorgefärbt:
 α_2 Macroglobulin (230 kDa), β -Galactosidase (135 kDa), Fructose-6-Phosphat Kinase (97 kDa), Pyruvat Kinase (78 kDa), Fumarase (57.5 kDa), Lactat Dehydrogenase (38.5 kDa) und Triosephosphat Isomerase (33.5 kDa).
Sigma (Deisenhofen)

***Dictyostelium discoideum* Stämme**

Stamm	Genotyp / Bemerkung	Referenz
Ax2	Abstammend vom Freilandisolat NC4 (Raper, 1935), enthält zwei rezessive Mutationen, die ihn zum axenischen Wachstum befähigen.	(Watts & Ashworth, 1970)
Tr E1	Calcineurin A überproduzierender Stamm; Aktin 6 Promotor; G418 ^R .	(Hellstern et al., 1997)
Ax2+CNB	Von Ax2 abstammend; enthält Konstrukt pBsrH - CNB; Aktin 15 Promotor; Blastocidin S ^R .	diese Arbeit
CNOP A+B	Von Tr E1 abstammend; enthält Konstrukt pBsrH - CNB; Aktin 15 Promotor; G418 ^R , Blastocidin S ^R .	diese Arbeit
CNOP A+CNB _S	Von Tr E1 abstammend; enthält Konstrukt pHEX- <i>cnb1_S</i> ; Aktin 15 Promotor; G418 ^R , Hygromycin B ^R .	diese Arbeit
CNOP A+CNB _L	Von Tr E1 abstammend; enthält Konstrukt pHEX- <i>cnb1_L</i> ; Aktin 15 Promotor; G418 ^R , Hygromycin B ^R .	diese Arbeit

O5TS	Sporogener Phänotyp nach Temperaturerhöhung von 23° C auf 26.5° C.	freundlicherweise überlassen von Prof. Dr. P.Newell, Oxford, England
<i>stkA</i> ⁻	REMI Mutante, <i>stkA</i> ⁻ ; bildet nur Stielzellen aus.	(Chang, Newell & Gross, 1996)

Bakterien

Klebsiella planticola freundlicherweise überlassen von Prof. Dr. E. Flaschl, Bielefeld

E. coli:

Stamm	Genotyp	Referenz
<i>E. coli</i> sure	<i>rec B, rec J, sbc C 201 uvr C, umu C::Tn5 (kan^r) mcrA, mcr B, mrr, lac, Δ hsd RMS, end A1, gyr A 96, thi, rel A1, sup E44, F[pro A⁺B⁺, lacI^{q(u)}, lac Z Δ M15, Tn 10 (Tet^r)]</i>	Stratagene (Amsterdam, Holland)
XL 1 blue	<i>end A1, hsd R 17 (r_{k-}, m_{k+}), sup E44, thi, rec A1, gyr A 96, rel A 1, Δ lac, F' [pro A⁺B⁺, lacI^q, lac Z Δ M15, Tn 10 (Tet^r)]</i>	(Bullock, Fernandez & Short, 1987)
SCS 110	<i>rpsL (Str^r) thr leu endA thi-l lacY galk galT ara tonA tsx dam dcm supE44 Δ(lac-proAB)[F' traD36 proAB lacI^qZΔ M15]</i>	Stratagene (Amsterdam, Holland)
SG13009 [pREP 4]	<i>F, lac⁻, ara⁻, gal, mtf, recA⁺, uvr⁺</i>	(Gottesmann, Halpern & Trisler, 1981)
LE 392	<i>supE44, supF58, hsdR514, galk2 galT22, metB1, trpR55, lacY1</i>	(Borck et al., 1976)
BNN 132	<i>supE44, hsdR, thi-1, thr-1, leuB6, lacY1, tonA21, hflA150[chr::Tn(tet^r)]</i>	(Young & Davis, 1983)

cDNA Banken

D. discoideum λ_{yes} Phagen cDNA Banken von vegetativen und sich entwickelnden Zellen (konvertiert zu Plasmid cDNA Banken) überlassen von Sije Lu (Houston, USA)

D. discoideum λgt11-cDNA Bank

(Lacombe et al., 1986)

Oligonukleotide ("Primer")

pACT/AS 5' BamH I	5' <u>CGC GGA TCC</u> ATG GCT TAC CCA TAC GAT G 3'
λgt11 fwd BamH I	5' <u>CGC GGA TCC</u> GGT GGC GAC GAC TCC TGG AGC CCG 3'
λgt11 rev BamH I	5' <u>CGG GAT CCT</u> TGA CAC CAG ACC AAC TGG TAA TG 3'
CNB rev BamH I	5' <u>CGG GAT CCC</u> TAT TCC TCT TGA TTA ACA ATC 3'
D.d. CNB fwd HinDIII	5' <u>CCC AAG CTT</u> ATG AAA GAT AAT AGT AGT TTT TCA GAA GC 3'
D.d. CNB rev HinDIII (1)	5' <u>CCC AAG CTT</u> CTA TTC CTC TTG ATT AAC AAT C 3'
D.d. CNB rev HinDIII (2)	5' <u>CCC AAG CTT</u> CTA TTC CTC TTG ATT AAC AAT CAT ATG 3'
CNB fwd pQE30	5' <u>CGC GGA TCC</u> AAA GAT AAT AGT AGT TTT TCA GAA GC 3'
CNB fwd BamH I + ATG	5' <u>CGG GAT CCC</u> <u>GAT</u> GAA AGA TAA TAG TAG TTT TTC AGA AGC 3'
GSP1 CNB rev	5' TTA TTC TGA CCA ATT TAC GC 3'
GSP1 CNB rev BamH I	5' <u>CGG GAT CCT</u> TAT TCT GAC CAA TTT ACG CTA AG 3'
GSP2 CNB rev BamH I	5' <u>CGG GAT CCA</u> AGT TTT TCT TCT ATT CCT TCT TG 3'
CNB 600 fwd HinDIII	5' <u>CCC AAG CTT</u> GGA AAT CAC CAT TCA TTA TTA AAT AAA G 3'
CNB 800 fwd HinDIII	5' <u>CCC AAG CTT</u> ATG GGA AAT CAC CAT TCA TTA TTA AAT AAA G 3'
CNB rev + 3', HinDIII	5' <u>CCC AAG CTT</u> TTA TTC TGA CCA ATT TAC GCT AAG 3'
CNB Δ 5' BamH I fwd	5' <u>CGC GGA TCC</u> TTT TAG AAA GAG TTA TTC AAA TC 3'
CNB 800 fwd Bgl II	5' <u>GAA GAT CTC</u> TAT GGG AAA TCA CCA TTC ATT ATT AAA TAA AG 3'
CNB Δ 3' rev Bgl II	5' <u>GAA GAT CTT</u> CTA TTC CTC TTG ATT AAC AAT CAT ATG AAT G 3'
CNB 800 + 3'rev BamH I	5' <u>CGC GGA TCC</u> TTC TGA CCA ATT TAC GCT AAG TTT TTC TTC 3'
5' RACE AAP	5' GGC CAC GCG TCG ACT AGT ACG GGI IGG GII GGG IIG 3'
AAP + Bgl II	5' <u>GAA GAT CTC</u> TTC GAC TAG TAC GGG GGG GG 3'
AAP + Nco I	5' <u>CAT GCC ATG GCG</u> TCG ACT AGT ACG GGG GGG G 3'
CNB - 3' rev BamH I	5' <u>CGC GGA TCC</u> CTC TTG ATT AAC AAT CAT ATG AAT G 3'
5' NTR fwd 1	5' <u>CGC GGA TCC</u> TTA TTT TTG CAA CCA ATA ATT TGA TTA ACC 3'
5' NTR fwd 2	5' <u>CGC GGA TCC</u> AAC AAA CCA AAA AAA TAA AAA TAA AAA T 3'
GFP fwd Bcl I	5' <u>CAA ATC TTT GAT CAA</u> ATG AGT AAA GGA GAA GAA CTT TTC 3'
GFP rev 1 Bcl I	5' <u>GGA TTT TGA TCA</u> AGA ATG TTT CCA TCT TCT TTA AAA TC 3'
GFP rev 2 Bcl I	5' <u>GGA TTT TGA TCA</u> ACT TTG TAT AGT TCA TCC ATG CC 3'

Die unterstrichenen Bereiche kennzeichnen Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme. Bis auf das Oligonukleotid 5' RACE AAP (Gibco BRL, Karlsruhe) wurden alle Oligonukleotide von der Firma MWG Biotech (Ebersberg) synthetisiert.

Plasmide

Plasmid	Beschreibung bzw. Genotyp	Referenz
---------	---------------------------	----------

pQE30	<i>E. coli</i> Expressionsplasmid, T _S Promotor, Amp ^R	QIAGEN (Hilden)
pUC19	<i>lacZ</i> , Amp ^R	(Yanisch-Perron, Vieira & Messing, 1985)
pBsrH	<i>Dictyostelium</i> Expressionsplasmid: Aktin 15 Promotor, Amp ^R , Blasticidin S ^R	überlassen von A.Erdmann (Martinsried)
pHEX	<i>Dictyostelium</i> Expressionsplasmid: Aktin 15 Promotor, Amp ^R , Hygromycin B ^R	(Rivero et al., 1996)
pDNeoll	<i>Dictyostelium</i> Expressionsplasmid: Aktin 6 Promotor, Amp ^R , G418 ^R	(Witke, Nellen & Noegel, 1987)
pDNeogfp	<i>Dictyostelium</i> Expressionsplasmid für C- terminale Fusionen mit GFP: Aktin 15 Promotor, Amp ^R , G418 ^R	(Rauchenberger et al., 1997)
pDdA15gfp	<i>Dictyostelium</i> Expressionsplasmid für N- terminale Fusionen mit GFP: Aktin 15 Promotor, Amp ^R , G418 ^R	(Gerisch et al., 1995)

Konstrukte

Alle Konstrukte wurden im Rahmen dieser Arbeit hergestellt. Die über PCR amplifizierten cDNAs wurden zur Kontrolle der Sequenz von der Firma GATC (Konstanz) sequenziert. Die Positionsangaben der Nukleotide beziehen sich auf die in Abb. 11 auf Seite 70 der Ergebnisse gezeigten *cnb1_L* cDNA Sequenz. Die Angabe "Δ 3' " bedeutet immer, dass die letzten 36 bp deletiert sind. Diese cDNAs enden am 3' Ende mit dem Nukleotid 705 und den zusätzlichen, nicht in der *cnb1_L* cDNA Sequenz vorhandenen Nukleotiden "GAA TAG". Diese Angabe gilt auch für die Konstrukte CNB pACT2-14, CNB λ-2 und pQE30-CNB. Die Angabe "+3' " bedeutet, dass wenn nicht anders angegeben, der 3' Bereich einschließlich Nukleotid 744 vollständig vorhanden ist.

Konstrukt	Beschreibung	verwendete Oligonukleotide
pUC19 - <i>cnb1</i>	Genomische Calcineurin B Sequenz, inklusive der 5' nicht-kodierenden Region in pUC19.	5' NTR fwd 2, GSP 1 CNB rev BamH I
CNB pACT2-14	Calcineurin B cDNA-Fragment (Nukleotide 232-705) in pUC19.	pACT/AS 5' BamH I, CNB rev BamH I
CNB λ-2	Calcineurin B cDNA-Fragment (Nukleotide 235-705) in pUC19.	λgt11 rev BamH I, CNB rev BamH I

pQE30-CNB	Calcineurin B cDNA-Fragment (Nukleotide 250-705) in pQE30. N-terminale Fusion mit 6 Histidinen.	CNB fwd pQE30, D.d. CNB rev HinDIII
pUC19- <i>cnb1_S</i>	5' RACE Calcineurin B cDNA Isoform <i>cnb1_S</i> (Nukleotide 205-744) in pUC19.	5' RACE AAP, GSP1 CNB rev BamH I
pUC19- <i>cnb1_L</i> + 5' NTR Δ 3'	5' RACE Calcineurin B cDNA Isoform <i>cnb1_L</i> (Nukleotide 1-705) in pUC19.	5' RACE AAP, CNB rev BamH I
pDNeoll- <i>cnb1_L</i> + 5' NTR Δ 3'	Insert des Konstrukts pUC19- <i>cnb1_L</i> + 5' NTR Δ 3' in pDNeoll umklontiert.	-
pDNeoll- <i>cnb1_L</i> + 5' NTR Δ 3'-GFP1 (417 bp)	Abstammend von pDNeoll- <i>cnb1_L</i> + 5' NTR Δ 3'. In die Bcl I Schnittstelle der <i>cnb1_L</i> cDNA wurde im Leseraster ein 417 bp großes GFP cDNA-Fragment eingefügt.	GFP fwd Bcl I, GFP rev 1 Bcl I
pDNeoll- <i>cnb1_L</i> + 5' NTR Δ 3'-GFP2 (720 bp)	Abstammend von pDNeoll- <i>cnb1_L</i> + 5' NTR Δ 3'. In die Bcl I Schnittstelle der <i>cnb1_L</i> cDNA wurde im Leseraster ein 720 bp großes GFP cDNA-Fragment eingefügt.	GFP fwd Bcl I, GFP rev 2 Bcl I
pBsrH- <i>cnb1_L</i> Δ 5' NTR Δ 3'	<i>cnb1_L</i> cDNA ab dem ersten ATG (Nukleotide 202-705) in pBsrH.	CNB 800 fwd HinDIII, D.d. CNB rev HinDIII (2)
pBsrH-CNB	CNB cDNA-Fragment (Nukleotide 247-705) in pBsrH.	D.d. CNB fwd HinDIII, D.d. CNB rev HinDIII (1)
pDdA15gfp- <i>cnb1_L</i> + 5' NTR Δ 3'	Fusion eines GFP Fragments an das 3' Ende der <i>cnb1_L</i> cDNA (Nukleotide 1-705, ohne Stopkodon TAG) in pDdA15gfp.	AAP+Bgl II, CNB -3'rev BamH I
pDdA15gfp- <i>cnb1_L</i> Δ 5' NTR + 3'	Fusion eines GFP Fragments an das 3' Ende der <i>cnb1_L</i> cDNA (Nukleotide 202-741 ohne Stopkodon TAA) in pDdA15gfp.	CNB 800 fwd Bgl II, CNB 800 +3' rev BamH I
pDNeogfp- <i>cnb1_L</i> Δ 5' NTR Δ 3'	Fusion eines GFP Fragments an das 5' Ende der <i>cnb1_L</i> cDNA (Nukleotide 202-705) in pDNeogfp.	CNB 800 fwd Bgl II, CNB Δ 3' rev Bgl II

pHEX- <i>cnb1_S</i>	<i>cnb1_S</i> cDNA (Nukleotide 205-744) in pHEX.	CNB600 fwd HinDIII, CNB rev +3' HinDIII
pHEX- <i>cnb1_L</i>	<i>cnb1_L</i> cDNA (Nukleotide 202-744) in pHEX.	CNB 800 fwd HinDIII, CNB rev +3'HinDIII

Standards für DNA Gele

Lambda / Eco RI / HinDIII, DNA Marker	MBI Fermentas (Vilnius, Litauen)
DNA 100 bp Leiter	MBI Fermentas (Vilnius, Litauen)
DNA Molekulargewichtsmarker III, Digoxigenin markiert	Boehringer (Mannheim)

Medien und Puffer für *Dictyostelium discoideum* Zellen

Kulturmedium

Nach Watts & Ashworth (1970)

14.3 g Bactopepton	Oxoid (Wesel)
7.15 g Hefeextrakt	Oxoid (Wesel)
1.28 g Na ₂ HPO ₄ *H ₂ O	Merck (Darmstadt)
0.48 g KH ₂ PO ₄	Merck (Darmstadt)
18.0 g Maltose	Merck (Darmstadt)
0.2 ml Vitaminlösung:	
48 µg/ml Vitamin B12	Sigma-Aldrich (Steinheim)
1.97 mg/ml Folsäure	Sigma-Aldrich (Steinheim)

ad 1 l H₂O bidest ergibt pH 6.7
Das Medium wurde 20 min bei 120° C autoklaviert.

Definiertes Medium (FM-Medium)
nach Franke & Kessin (1977)

10 x Stammlösungen:

<u>Aminosäuren:</u>		<u>Vitamine:</u>		<u>Spurenelemente</u>	
L-Arginin	33 mM	Biotin	0.2 mg/L	Na ₂ EDTA	130 µM
L-Asparagin	23 mM	Cyanocobalamin	0.05 mg/L	H ₃ BO ₃	18 µM
L-Cystein	17 mM	Folsäure	2.0 mg/L	CoCl ₂	7 µM
Glycin	120 mM	Liponsäure	4.0 mg/L	CuSO ₄	6 µM
L-Glutaminsäure	34 mM	Riboflavin	5.0 mg/L	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄	0.8 µM
L-Histidin	14 mM	Thiamin-HCl	6.0 mg/L	MnCl ₂	26 µM
L-Isoleucin	46 mM			ZnSO ₄	80 µM
L-Leucin	69 mM	<u>Salze:</u>		<u>Kohlenstoff-</u>	
L-Lysin	49 mM	K ₂ HPO ₄	50 mM	<u>quelle:</u>	
L-Methionin	20 mM	NaOH	20 mM	Glucose	
L-Phenylalanin	30 mM	NaHCO ₃	2.0 mM	560 mM	
L-Prolin	70 mM	NH ₄ Cl	10 mM		
L-Threonin	42 mM	CaCl ₂	0.2 mM		
L-Tryptophan	10 mM	FeCl ₃	1.0 mM		
L-Valin	60 mM	MgCl ₂	0.4 mM		

Aus den Stammlösungen wurde 1 x Medium hergestellt, pH 6.5. Das Medium wurde 20 min bei 120° C autoklaviert.

Sørensen Phosphat Puffer (SP-Puffer)

13 mM KH₂PO₄ Merck (Darmstadt)
4 mM Na₂HPO₄ Merck (Darmstadt)

mit 17 mM KH₂PO₄ auf pH 6.0 eingestellt.

Medien für *E. coli* Zellen

LB: 1% Bactotrypton, 0.5% Hefe Extrakt, 0.5% NaCl

LB Terrific Broth: 12% Bactotrypton, 24% Hefe Extrakt, 0.4% Glycerin. Nach dem Autoklavieren Zugabe von 1/10 Volumen einer 0.17 M KH₂PO₄, 0.72 M K₂HPO₄ Lösung, pH 7.5

NZA: 1% NZ-Amine A, 0.5% Hefe Extrakt, 0.5% NaCl

NZY (für *E. coli* SCS110) 5% NaCl, 2% MgSO₄ * 7H₂O, 5% Hefe Extrakt, 10% NZ-Amine A, mit NaOH auf pH 7.5 eingestellt

Für Agarplatten wurden je Liter Medium 20 g Select-Agar zugegeben.

Nähragar für *Klebsiella planticola*

SM Agar 10% Glucose, 10% Bactotrypton, 1% Hefe Extrakt, 1% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$,
2.2% KH_2PO_4 , 1.3% $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 15 g Select-Agar

Puffer für biochemische Methoden

2 x Gel Probenpuffer für Proteingele (2xGSB):

30 ml 1 x "upper gel buffer" (Laemmli, 1970)
1.5 ml 0.1% Bromphenolblau in Ethanol
15 ml Glycerin
3% SDS
ad 100 ml H_2O bidest,
Vor Gebrauch 2% 2-Mercaptoethanol zugeben

Silberlösung:

1.2 g AgNO_3 in 8 ml H_2O bidest lösen und
tropfenweise zu einer gerührten Lösung aus
40 ml H_2O bidest, 380 μl 10 N NaOH und
2.8 ml 25% NH_4OH zugeben.
ad 200 ml H_2O bidest

Coomassie Entfärber:

20% Ethanol
10% Essigsäure

TBS I:

10 mM Tris-HCl, pH 7.4
150 mM NaCl
0.05% NP-40

ECL II

Wasserstoffperoxid (H_2O_2) 18.3%
Zugabe von 1 μl ECL II/1 ml ECL I

Lysepuffer

0.1 M Natriumphosphatpuffer pH 8.0
0.01 M Tris-HCl, pH 8.0

5 x Gel Probenpuffer für Proteingele (5xGSB):

20 ml 5 x "upper gel buffer" (Laemmli, 1970)
1.5 ml 0.1% Bromphenolblau in Ethanol
37.5 ml Glycerin
7.5% SDS
ad 100 ml H_2O bidest
Vor Gebrauch 2% 2-Mercaptoethanol zugeben

Färbelösung für Silbergele:

100 μl Formaldehyd (min. 36.5%)
100 μl 10% Citronensäure
ad 200 ml H_2O bidest

Ponceau Färbelösung:

0.1% Ponceau S in 5% Essigsäure

ECL I:

Lösung A: 0.5 M Luminol (3-Aminophtalhydrazid)
in DMSO (Argon begast)
Lösung B: 0.18 M *p*-Cumarsäure in DMSO
Lösung C: 1 M Tris-HCl, pH 8.5
450 ml H_2O bidest und 50 ml Lösung C durch
Zugabe von einigen ml flüssigem Stickstoff
entgasen. Dann unter Rühren tropfenweise
Zugabe von 2.5 ml Lösung A und 1.11 ml Lösung
B.

Lysepuffer ^{+H}

0.1 M, Natriumphosphatpuffer pH 8.0
0.01 M Tris-HCl, pH 8.0
8 M Harnstoff

Waschpuffer

0.1 M Natriumphosphatpuffer pH 8.0
0.01 M Tris-HCl, pH 8.0
8 M Harnstoff
10 mM Imidazol

Ca²⁺-Puffer

50 mM Tris-HCl, pH 7.8
150 mM NaCl
2 mM CaCl₂
1 mM EDTA, pH 8.0
0.5 mM DTT
0.1% Tween 20
ad 20 ml H₂O bidest

Elutionspuffer für Bindetests

50 mM Tris-HCl, pH 7.8
150 mM NaCl
20 mM EGTA
1 mM EDTA, pH 8.0
0.5 mM DTT
0.1% Tween 20
ad 20 ml H₂O bidest

Ni²⁺-NTA Elutionspuffer

50 mM Natriumphosphatpuffer pH 8.0
300 mM NaCl
2 mM CaCl₂
250 mM Imidazol

**5 x Reaktionspuffer
(für Phosphatase Tests)**

250 mM Tris-HCl, pH 7.8
1 mg/ml BSA
2.5 mM MnCl₂
5 mM CaCl₂
2.5 mM DTT
100 mM MgCl₂

Elutionspuffer für Proteinreinigung

0.1 M Natriumphosphatpuffer pH 8.0
0.01 M Tris-HCl, pH 8.0
8 M Harnstoff
250 mM Imidazol

Ca²⁺-Puffer "hoch Salz"

50 mM Tris-HCl, pH 7.8
1 M NaCl
2 mM CaCl₂
1 mM EDTA, pH 8.0
0.5 mM DTT
0.1% Tween 20
ad 20 ml H₂O bidest

Ni²⁺-NTA Bindepuffer

50 mM Natriumphosphatpuffer pH 8.0
300 mM NaCl
2 mM CaCl₂
1 mM Imidazol

Calcineurin-Verdünnungspuffer

50 mM Tris-HCl, pH 7.8
150 mM NaCl
0.1% Tween 20
10 mM EGTA
0.1 mM EDTA
0.5 mM DTT

**Stop-Lösung
(für Phosphatase Tests)**

1 M Na₂CO₃
20 mM EDTA
2 mM EGTA

Puffer für molekularbiologische Methoden

Probenpuffer für DNA Gele (5 x "Blue Run")

150 mM EDTA
25 mM Tris-HCl, pH 7.0
25% Glycerin
0.05% Bromphenolblau

Guanidinthiocyanat Puffer

4 M Guanidinthiocyanat
25 mM Natriumcitrat
0.5% N-Lauroylsarcosin
in DMPC-behandeltem H₂O bidest

30 x SSC

4.5 M NaCl
0.45 M Natriumcitrat
pH 7.0
DMPC behandelt

Blockpuffer

Waschpuffer mit 1% Milchpulver

"High-SDS" Hybridisierungs-Puffer

7% SDS
50% deionisiertes Formamid
5 x SSC
2% Blockpuffer
50 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7.0
0.1% N-Lauroylsarcosin
Für die Herstellung von 500 ml Puffer wurden
250 ml deionisiertes Formamid, 83 ml
30 x SSC, 25 ml 1 M Natriumphosphatpuffer
pH 7.0, 100 ml 10% Blockpuffer und 5 ml
10% N-Lauroylsarcosin gemischt, zu 35 g
SDS gegeben, bei 65° C gelöst und mit
sterilem H₂O bidest auf 500 ml Gesamtvolumen
aufgefüllt. Der Puffer wurde bei 4° C
aufbewahrt und vor Gebrauch auf 65° C
erwärmt.

Lysepuffer

(für Präparation von genomischer DNA)

10 mM Mg-Acetat
10 mM NaCl
2% NP-40
10% Saccharose
30 mM Tris-HCl, pH 8.5

20 x SSC

3 M NaCl
0.3 M Natriumcitrat
pH 7.0
für Northern Blots mit DMPC behandelt

Waschpuffer

100 mM Maleinsäure
150 mM NaCl
pH 7.5 mit 6 N NaOH eingestellt,
dann Zugabe von 0.3% Tween 20

Detektionspuffer

100 mM Tris-HCl, pH 9.5
100 mM NaCl
pH 9.5

TBE Puffer

0.89 M Tris
0.89 M Borsäure
2 mM EDTA
ergibt pH 8.3

10 x RNA Gelpuffer

200 mM MOPS
50 mM Natrium-Acetat
10 mM EDTA
mit NaOH auf pH 8.0 eingestellt und mit DMPC
behandelt

10 x RNA Laufpuffer

200 mM MOPS
50 mM Natrium-Acetat
10 mM EDTA
mit NaOH auf pH 7.0 eingestellt und mit DMPC behandelt

RNA Probenpuffer

50% Formamid
6% Formaldehyd Lösung (mind. 36.5%)
1 x RNA Gelpuffer
in DMPC-behandeltem H₂O bidest

RNA Farbmarker

50% Saccharose
0.25% Bromphenolblau
in DMPC-behandeltem H₂O bidest

**Hybridisierungslösung
(für Southern Blots)**

5 x SSC
0.1% N-Lauroylsarcosin
0.02% SDS
1% Milch

Zellbiologische Methoden

Anzucht von *Dictyostelium discoideum* Wildtyp Ax2 Zellen

Zellkulturen wurden wöchentlich aus frischen Vorkulturen angeimpft und bis zu Zelldichten von 5×10^6 Z/ml angezogen. Für Vorkulturen wurden 30 ml, für Hauptkulturen 300 ml Kulturmedium verwendet. Alle Kulturkolben wurden im Dunkeln bei 23° C mit 150 rpm geschüttelt.

Anzucht der Mutante *stkA*⁻

Die Mutante *stkA*⁻ (Chang et al., 1996) wurde wie der Wildtyp Ax2 axenisch, aber in definiertem Medium (FM-Medium) angezogen.

Anzucht der Mutante O5TS

Klebsiella planticola Zellen wurden mit SP-Puffer gemischt und gleichmässig auf eine SM-Agarplatte ausgebracht. Sporen der Mutante O5TS wurden in einem Tropfen SP-Puffer auf den Bakterienrasen ausgebracht, bei 23° C im Dunkeln zum auskeimen und wachsen gebracht, bis ein Fressrand sichtbar war. Für die Hauptkultur wurden *Klebsiella planticola* und O5TS Zellen aus dem Fressrand in 1 ml SP-Puffer gemischt, auf 14 cm SM-Agarplatten ausgebracht und zwei Tage bei 23° C im Dunkeln angezogen.

Axenische Anzucht von Dictyostelium discoideum in Kulturschalen

Bei axenischer Anzucht der Zellen in Schalen wurde dem Medium zusätzlich zu den für die Selektion der Resistenzgene benötigten eukaryontischen Antibiotika 100 µg/ml Ampicillin und 40 µg/ml Streptomycin zugegeben. Sporen wurden direkt in 9 cm oder 14 cm Schalen mit 15 ml bzw. 40 ml Medium angeimpft und die Zellen bei 23° C im Dunkeln ohne Schütteln angezogen. Ein Wachstum der Zellen war an der Trübung des Schalenbodens erkennbar. Die Zellen wurden so lange angezogen, bis beim Schwenken der Schalen deutlich Zellen im Überstand sichtbar waren. Für Hauptkulturen wurden mehrere 14 cm Schalen mit je 2 ml der Vorkultur angeimpft und die Zellen für 3-4 Tage angezogen.

Anzucht von Dictyostelium discoideum Transformanten

Nach der PEI Transformation (s. "Molekularbiologische Methoden") wurden die Zellen über Nacht bei 23° C inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Kulturmedium gegen frisches ausgetauscht, welches 100 µg/ml Ampicillin und 40 µg/ml Streptomycin enthielt, sowie je nach gewünschter Selektion entweder 20 µg/ml G418 oder 10 µg/ml Blasticidin S. Um Hygromycin B resistente Klone zu erhalten, wurde die Hygromycin B Konzentration im Medium nach einer Woche von 20 µg/ml auf 50 µg/ml erhöht. Bei dieser Selektion konnten resistente Klone nach ca. zwei Wochen isoliert werden, bei Selektion auf G418 und Blasticidin S bereits nach einer Woche. Im Fall von Doppelmutanten wurden die Antibiotika entsprechend in Kombination dem Medium zugefügt.

Die isolierten Klone wurden zunächst in 96-er Mikrotiterplatten in 150 µl Medium bis zu einer Trübung des Bodens angezogen, dann in 12-er Mikrotiterplatten zu je 2 ml Medium überführt, erneut angezogen und schließlich in 9 cm Schalen zu jeweils 12 ml Medium überführt. Ausgehend von dieser Vorkultur wurden die Transformanten entweder weiter in Schalen angezogen, oder 3-4 ml der Kultur wurden als Vorkultur in einem Kolben mit 30 ml Kulturmedium und entsprechenden Antibiotikazusätzen bei 150 rpm und 23° C bis zu einer Zelldichte von 5×10^6 Z/ml angezogen.

Differenzierung von Dictyostelium discoideum Zellen

Zum Einleiten der Differenzierung wurden die Zellen der jeweiligen Hauptkultur in der Minifuge 2 (Hereaus Christ) bei 670 x g und 4° C sedimentiert. Das Zellsediment wurde in 50-100 ml eiskaltem SP-Puffer resuspendiert und der Waschvorgang zweimal wiederholt.

Anschließend wurden die Zellen auf eine definierte Zellzahl (2×10^7 , 3×10^7 oder 5×10^7 Z/ml) in SP-Puffer eingestellt. Dieser Zeitpunkt wird im folgenden als t_0 bezeichnet, die Zeitpunkte der späteren Differenzierungsstadien werden dementsprechend als t_1 , t_2 usw. bezeichnet.

Im Fall der Mutante O5TS wurden die Zellen zusammen mit den Bakterien mit SP-Puffer und mit Hilfe eines Glasspatels von den Agarplatten abgelöst. Die Waschvorgänge wurden so lange wiederholt, bis der Überstand klar war und sich somit nur noch wenige Bakterien darin befanden. Je 1 ml der gewaschenen Zellen wurde auf einen HABP Nitrocellulose-Filter ausgebracht, der auf zwei in SP-Puffer getränkten Glasfaserfiltern lag. Nachdem sich die Zellen abgesetzt hatten, wurde der überschüssige SP-Puffer abgenommen und die Filter zur Differenzierung der Zellen in einer feuchten Kammer bei 23° C im Dunkeln inkubiert. Für die Ausbildung des sporogenen Phänotyps der Mutante O5TS wurde die Temperatur ab Erreichen des "slug" Stadiums auf 26.5° C erhöht.

Konservieren von Sporen

Gewaschene Zellen wurden auf SP-Platten (\varnothing 9 cm) ausgebracht und eine Woche bei 23° C im Dunkeln inkubiert. Mit einer sterilen Platinöse wurden die Fruchtkörper von jeweils einer halben Agarplatte abgeerntet, in 1 ml SP-Puffer aufgenommen und bei -70° C gelagert.

Biochemische Methoden

Herstellung von Zellextrakten für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Dictyostelium discoideum Zellextrakte aus Flüssigkultur

1 ml der gewaschenen Zellen wurden in einer Eppendorftischzentrifuge 5 s sedimentiert. Das Zellsediment wurde in 200 μ l heißem 2 x GSB, 2% 2-Mercaptoethanol aufgenommen und für 10 min gekocht.

Dictyostelium discoideum Zellextrakte von differenzierenden Zellen

Jeweils 1 ml der gewaschenen Zellen wurden auf einen angefeuchteten HABP Filter ausgebracht. Zu den gewünschten Entwicklungszeiten wurden die Zellen eines Filters mit 5 ml kaltem SP-Puffer durch Vortexen abgewaschen, in einem Eppendorfgefäß sedimentiert und in 200 µl heißem 2 x GSB, 2% 2-Mercaptoethanol für 10 min gekocht.

Extrakte aus Dictyostelium Sporen und Stielzellen

Gewaschene und in SP-Puffer auf 2×10^7 Z/ml eingestellte *Dictyostelium discoideum* Zellen wurden für die Differenzierung auf SP-Agarplatten ausgebracht. Zum Ernten der Fruchtkörper wurden die Platten mit SP-Puffer abgespült und die Sporen durch kräftiges Vortexen von den Stielen abgetrennt. Durch die anschließende zweimalige fünfminütige Zentrifugation in der Hettich Universal II-Tischzentrifuge bei 2000 rpm wurden die Sporen (im Sediment) von den Stielen (im Überstand) abgetrennt. Die Stiele wurden in einer Eppendorftischzentrifuge sedimentiert und wie die Sporen in heißem 2 x GSB, 2% 2-Mercaptoethanol aufgenommen und gekocht.

E. coli Zellextrakte

Eine Übernachtskultur wurde 1:100 im entsprechendem Medium verdünnt und auf eine OD₆₀₀ von 0.5-0.6 angezogen. Die Proteinexpression wurde durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert. Nach der gewünschten Induktionszeit wurden jeweils 2 ml der Zellkultur sedimentiert und in 2 x GSB, 2% 2-Mercaptoethanol für 10-15 min gekocht. Dabei wurde bei einer OD₆₀₀ von 1 (ca. 5×10^8 Z/ml) das Sediment in 100 µl 2 x GSB, 2% 2-Mercaptoethanol aufgenommen. Entsprechend dieser Regel wurden die Volumina des zuzugebenden 2 x GSB, 2% 2-Mercaptoethanol jeweils der optischen Dichte der Kultur angepasst.

Proteinbestimmungen

Proteinbestimmungen wurden wie bei Bradford (1976) beschrieben durchgeführt.

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophoresen wurden nach der Methode von Laemmli (1970) mit Gelen, die 0.1% SDS enthielten, durchgeführt. Zur Auftrennung der Calcineurin

B Isoformen und Fusionsproteine wurden 15 und 20%-ige Gele verwendet, für Calcineurin A 9%-ige Gele. Als Proteinstandard wurden für 15 und 20%-ige Gele der "LMW Electrophoresis Calibrating Kit", für 9%-ige Gele der vorgefärbte "HMW" Proteinstandard verwendet.

Coomassie Blue Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen

Proteinbanden in SDS-Polyacrylamidgelen wurden mit 0.05% Coomassie Brilliant Blue R250 in 25% Isopropanol, 10% Essigsäure für eine Stunde angefärbt. Anschliessend wurden die Gele in Coomassie Entfärber solange entfärbt, bis die Proteinbanden deutlich sichtbar waren.

Silberfärbung von SDS-Polyacrylamidgelen (Wray et al., 1981)

SDS-Polyacrylamidgele wurden zunächst über Nacht in 50% Methanol entwässert, wobei die Methanol Lösung dreimal gewechselt wurde. Dann wurden die Gele ca. 5 min in H₂O bidest gewaschen und anschliessend 15 min in der Silberlösung inkubiert. Danach wurden die Gele bis zu 15 min in der Färbelösung geschwenkt, bis die Proteinbanden deutlich angefärbt waren. Die Reaktion wurde durch Austausch der Färbelösung gegen Coomassie Entfärber abgestoppt und fixiert.

Transfer von Proteinen auf Protran BA 85 Nitrocellulose-Membranen

Die auf SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennten Proteine wurden nach der "Semi-dry" Methode von Kyhse-Andersen (1984) elektrophoretisch auf Nitrocellulose-Membranen übertragen. Der Transfer erfolgte während 1 h bei konstantem Stromfluss (0.8 mA / cm² Membran).

Ponceau Färbung von Protein-Blots

Die Standardproteine des LMW Electrophoresis Calibrating Kit sind nicht vorgefärbt. Aus diesem Grund wurden die Nitrocellulose-Membranen nach dem Proteintransfer für

einige Minuten in Ponceau S Färbelösung inkubiert. Danach wurden die Membranen kurz in TBS I Puffer gewaschen und die Laufhöhen der Standardproteine markiert.

Immunfärbung von Protein-Blots (Western Blots)

Die Protein-Blots wurden nach dem Transfer und gegebenenfalls Färben mit Ponceau Lösung 10 min in TBS I gewaschen und anschliessend in Roti-Block Lösung (1:10 in H₂O)

1 h bei RT abgesättigt. Bei Absättigung über Nacht erfolgte dies ohne Schütteln bei 8° C. Dann wurde die Membran 1 h in verdünnter Antikörperlösung inkubiert (CNB Antiserum 1:5000, 1:6000 oder 1: 20.000, affinitätsgereinigter anti-CNB Antikörper 1:250, CNA Antiserum 1:5000, jeweils in TBS I, 3% BSA, 0.02% NaN₃). Anschliessend wurde 3 x 3 min in TBS I und 5 x 3 min in TBS I/5% Magermilchpulver gewaschen. Die darauffolgende Inkubation mit 1:5000 verdünntem, Peroxidase-gekoppeltem Ziege-anti-Kaninchen sekundärem IgG Antikörper, erfolgte ebenfalls in TBS I/5% Magermilchpulver. Vor der ECL Detektion wurde der Blot 3 x 3 min in TBS I/5% Magermilchpulver, 2 x 3 min in TBS I und 2 x 3 min in 10 mM Tris-HCl, pH 7.4 gewaschen. Je Membran wurden 2 ml ECL I Lösung mit 2 µl ECL II Lösung gemischt, die Membran für 1 min mit der Mischung inkubiert und die Lumineszenz auf einem Röntgenfilm dokumentiert.

Reinigung von rekombinantem Calcineurin B mittels einer Ni²⁺-NTA Matrix

Für die Reinigung von rekombinantem Calcineurin B wurde das Konstrukt pQE30-CNB in den *E. coli* Stamm SG13009 transformiert. Die Expression unterlag der Kontrolle des Lactose-Operons und konnte durch IPTG induziert werden. Der Stamm SG13009 enthält zusätzlich das Plasmid pREP4 (kan^R), wodurch große Mengen eines Lactose-Repressorproteins exprimiert werden, welches an den Lactose-Operator bindet und so die Expression des rekombinanten Proteins verhindert. Durch IPTG Zugabe wird das Repressorprotein gebunden, inaktiviert, und eine Induktion der Proteinexpression erfolgt. Das rekombinante Protein enthielt eine N-terminale Fusion mit 6 Histidinen und wurde in einer einstufigen Affinitätschromatographie gereinigt.

Eine Übernachtskultur des Calcineurin B exprimierenden SG13009 Stamms wurde in LB amp₁₀₀/kan₂₅ Medium (100 µg Ampicillin/ml, 25 µg Kanamycin/ml) bei 37° C und konstantem Schütteln (150 rpm) angezogen. 10 ml dieser Übernachtskultur wurden in 1 l LB

amp₁₀₀/kan₂₅ verdünnt und weiter angezogen. Bei einer OD₆₀₀ von 0.6 wurde die Expression des rekombinanten Calcineurin B durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert. Vier Stunden nach Induktion wurden die Zellen 15 min bei 8400 x g und 4° C in einer Heraeus Christ Cryofuge sedimentiert. Das Zellsediment wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren, während 15 min auf Eis aufgetaut und in 30 ml kaltem Lysepuffer resuspendiert. Die Lyse der Zellen erfolgte bei 10 mPa durch einen viermaligen Durchgang durch eine "French Pressure Cell Press" bei 4° C. Der rohe Zellextrakt wurde anschliessend 20 min in einer Sorvall RC-5B Zentrifuge in einem SS34-Rotor bei 18.000 rpm und 4° C zentrifugiert. Das Sediment wurde erneut in flüssigem Stickstoff eingefroren, während 15 min auf Eis aufgetaut und in 10 ml Lysepuffer^{+H} aufgenommen. Während einer Dauer von 2 h wurde das Sediment bei Raumtemperatur wiederholt resuspendiert. Anschliessend wurde 20 min bei 4° C und 18.000 rpm in einem SS34 Rotor zentrifugiert. Das Sediment wurde verworfen, der Überstand wurde für die weiteren Reinigungsschritte verwendet. Hierfür wurden 0.5 ml einer Ni²⁺-NTA Matrix (1 ml "slurry") mit 40 ml Lysepuffer^{+H} gewaschen. Der Überstand der letzten Zentrifugation wurde mit der äquilibrierten Ni²⁺-NTA Matrix gemischt, 1 h bei RT auf einem Roller inkubiert und auf eine Säule (Ø 1 cm) aufgetragen. Der Durchlauf wurde abgelassen und die Säule mit 16.5 ml Lysepuffer^{+H} bis zum Erreichen einer OD₂₈₀ von 0.05 gewaschen, um unspezifisch gebundene Proteine zu entfernen. Anschliessend wurde mit 6 ml Waschpuffer gewaschen. Fraktionen von jeweils 1.5 ml wurden gesammelt. Gebundenes Calcineurin B wurde mit 7.5 ml Elutionspuffer in 1.5 ml Fraktionen eluiert. Bei der direkt nachfolgenden Dialyse wurde immer die zweite und dritte Eluatfraktion verwendet. Der Dialyseschlauch (Ø 11.5 mm, 1ml/cm, ≥ 3.5 kDa Ausschlussvolumen, Spektra/Por) wurde zuvor 10 min in H₂O mit einer Spatelspitze EDTA gekocht. Dialysiert wurde 3-5 h gegen Lysepuffer mit 6 M Harnstoff, über Nacht gegen Lysepuffer mit 4 M Harnstoff, 3 h gegen Lysepuffer mit 2 M Harnstoff und schliesslich 2-3 h gegen 10 mM Tris-HCl, pH 8.0. Das gereinigte Calcineurin B wurde in Aliquoten bei -20° C gelagert.

Proben der nicht-induzierten und induzierten Zellen wurden genommen wie bei "Herstellung von Zellextrakten für SDS-Polyacrylamidgele" beschrieben. Bei jedem Reinigungsschritt wurde eine Probe von 100-200 µl abgenommen, mit 5 x GSB versetzt und 10 min gekocht. Für die Dokumentation der Reinigung wurden die Proben auf einem 15%-igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und die Proteine anschliessend mit Coomassie Blue Färbelösung angefärbt. Die Konzentration des gereinigten Proteins wurde photometrisch bei 280 nm nach der Formel von Lambert-Beer bestimmt:

$$c = (E \times MW) / (\epsilon \times d)$$

wobei $d = 1$ cm Schichtdicke der Küvette

E = Extinktion bei 280 nm

MW = Molekulargewicht des rekombinanten Calcineurin B (18.000 g/mol)

$\epsilon = (n \times \text{Trp} \times 5546) + (n \times \text{Tyr} \times 1340) + (n \times \text{Phe} \times 10) + (n \times \text{Cys} \times 30)$

(n = Anzahl der jeweiligen Aminosäure in der Sequenz).

Für rekombinantes Calcineurin B beträgt $\epsilon = 4170$.

Test der Bindung des rekombinanten Calcineurin B an Dictyostelium Calcineurin A

Rekombinantes Calcineurin B wurde mit *Dictyostelium* Calcineurin A gemischt. Die Ausbildung des Holoenzym wurde sowohl durch Bindung an eine Ni^{2+} -NTA Matrix, als auch durch Bindung an Calmodulin-Sepharose 4B überprüft.

Bindungstest an Calmodulin-Sepharose 4B

Für die Überprüfung der Ausbildung eines Calcineurin Holoenzym wurden $0.17 \mu\text{M}$ *Dictyostelium* Calcineurin A mit $0.66 \mu\text{M}$ rekombinantes Calcineurin B in $150 \mu\text{l}$ Ca^{2+} Puffer gemischt und 1 h bei 4°C auf einem Roller inkubiert. $100 \mu\text{l}$ Calmodulin-Sepharose 4B, die zuvor mit einem 25-fachen Volumen an Ca^{2+} Puffer äquilibriert worden war, wurde zu der Mischung gegeben und 2 h auf einem Roller bei 4°C inkubiert. Die Sepharose wurde durch Zentrifugation in einer Eppendorfzentrifuge sedimentiert und $220 \mu\text{l}$ des Überstands wurden abgenommen. Dann wurde die Sepharose fünfmal mit $220 \mu\text{l}$ Ca^{2+} Puffer, dreimal mit $220 \mu\text{l}$ Ca^{2+} Puffer "hoch Salz" und ein weiteres Mal mit $220 \mu\text{l}$ Ca^{2+} Puffer gewaschen. Für die Elution der gebundenen Proteine wurde die Sepharose in $220 \mu\text{l}$ Elutionspuffer resuspendiert und 30 min bei 4°C auf einem Roller inkubiert. Nach der folgenden Sedimentation wurde die Elution mit dem gleichen Volumen an Elutionspuffer wiederholt. Die abgenommenen Überstände wurden mit 5 x GSB versetzt und für die folgende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese 10 min gekocht. Jeweils $80 \mu\text{l}$ der Proben wurden auf einem 15%-igen Gel aufgetrennt und auf Nitrocellulosemembranen übertragen. Die Membranen wurden beim anschließenden Western Blot mit 1:20.000 verdünntem Calcineurin B Antiserum, bzw. 1:5000 verdünntem Calcineurin A Antiserum behandelt.

Bindungstest an eine Ni²⁺-NTA Matrix

Pro Ansatz wurden 10 µl einer Ni²⁺-NTA Matrix mit einem 100-fachen Volumen an Ni²⁺-NTA Bindepuffer äquilibriert. 0.17 µM *Dictyostelium* Calcineurin A wurden mit 0.66 µM rekombinantem Calcineurin B in insgesamt 90 µl Ni²⁺-NTA Bindepuffer 1 h bei 4° C auf einem Roller inkubiert. In einem Kontrollansatz wurde nur 0.66 µM Calcineurin A eingesetzt. Jeweils 10 µl äquilibrierte Ni²⁺-NTA Matrix wurde zugegeben und die Mischung eine Stunde bei 4° C auf einem Roller inkubiert. Die Matrix wurde durch Zentrifugation in einer Eppendorffzentrifuge sedimentiert und 80 µl Überstand wurden abgenommen. Danach folgten drei Waschschriffe mit je 80 µl Ni²⁺-NTA Bindepuffer und zwei Elutionsschritte mit je 80 µl Elutionspuffer. Die Überstände wurden mit 5 x GSB versetzt und für die folgende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese 10 min gekocht. Jeweils 80 µl der Proben wurden auf einem 15%-igen bzw. 9%-igen Gel aufgetrennt und auf Nitrocellulosemembranen übertragen. Die Membranen wurden beim anschliessenden Western Blot mit 1:20.000 verdünntem Calcineurin B Antiserum bzw. 1:5000 verdünntem Calcineurin A Antiserum behandelt.

Bestimmung der Phosphataseaktivität des Calcineurin Holoenzym

Für die Ansätze, in denen die Phosphataseaktivität des Calcineurin Holoenzym bestimmt werden sollte, wurde zunächst eine äquimolare Mischung aus *Dictyostelium* Calcineurin A und rekombinantem Calcineurin B in Calcineurin-Verdünnungspuffer hergestellt. Aliquote von je 4 µl, die je 650 ng Calcineurin A und 160 ng Calcineurin B enthielten, wurden bei -70° C gelagert. Aliquote, die nur 650 ng Calcineurin A enthielten, wurden auf dieselbe Weise hergestellt und freundlicherweise von U. Kessen überlassen.

Verwendung von *p*-Nitrophenylphosphat (pNPP) als Substrat

Phosphataseaktivitätstests wurden in zwei- und dreifach Bestimmungen nach der von Hellstern und Mitarbeiter (1997) beschriebenen Methode in 150 µl Reaktionsvolumen durchgeführt. Calcineurin A (60 nM) bzw. Calcineurin A und B (jeweils 60 nM) wurden 1 h bei 30° C in Reaktionspuffer in An- oder Abwesenheit von 1 µM Calmodulin vorinkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 20 mM pNPP gestartet und nach einer Stunde durch Zugabe von 150 µl Stop-Lösung abgestoppt. Die Absorption (A) wurde bei 405 nm in einem Mikrotitermessgerät spektrophotometrisch bestimmt und mit Kontrollmesswerten von Ansätzen, die kein Enzym enthielten, korrigiert. Die Phosphataseaktivität wurde unter

Berücksichtigung des Extinktionskoeffizienten des gebildeten *p*-Nitrophenolat-Anions (ϵ) von $1.75 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$, der Schichtdicke (d) = 0.4 cm und des Reaktionsvolumens (V)= 0.3 ml folgendermaßen berechnet:

$$\text{Aktivität (nmol Phosphat x min}^{-1} \text{ x mg Protein}^{-1}) = (A \times \epsilon^{-1} \times d^{-1}) \times (V \times 60 \text{ min}^{-1} \times \text{mg Protein}^{-1})$$

Verwendung des R_{II} Phosphopeptids als Substrat

Phosphatsetests mit dem R_{II} Phosphopeptid als Substrat wurden in einem Endvolumen von 50 μl in zwei- und dreifach Bestimmungen durchgeführt. Calcineurin A (180 nM) bzw. Calcineurin A und B (jeweils 180 nM) wurden in An - oder Abwesenheit von 1 μM Calmodulin in Reaktionspuffer bei 30° C 1 h vorinkubiert. Durch Zugabe von 35 μM R_I Phosphopeptid wurde die Reaktion gestartet und nach 40 min durch Zugabe von zwei Volumen Biomol Green™ Reagenz abgestoppt. Der Test verlief linear zwischen 10 und 50 min. Die Ansätze wurden anschliessend 30 min bei RT inkubiert. Die Absorption wurde in einem Mikrotitermessgerät spektrophotometrisch bei 620 nm bestimmt und gegen Referenzansätze ohne Enzym abgeglichen. Die freie Phosphatkonzentration wurde mit Hilfe einer Eichgeraden unter Verwendung eines Phosphatstandards (Biomol) berechnet.

Herstellung von polyklonalem Calcineurin B Antiserum

Für die Gewinnung eines polyklonalen Antiserums gegen rekombinantes Calcineurin B wurden 300 μg gereinigtes Calcineurin B in 500 μl 10 mM Tris-HCl, pH 8.0 10 min bei 100° C denaturiert, mit 500 μl RAS Adjuvans gemischt und einem Kaninchen subkutan injiziert. Drei weitere Immunisierungen mit jeweils 200 μg Protein folgten im Abstand von jeweils zwei Wochen. Sämtliche Immunisierungen wurden in der Tierforschungsanlage (TFA) der Universität Konstanz durchgeführt.

Für die Bestimmung des Antiserum-Titers wurde auf einem präparativen 15%-igen SDS-Polyacrylamidgel *Dictyostelium* Gesamtzellextrakt (100 $\mu\text{g}/0.7 \text{ cm}$) aufgetrennt. Die Nitrocellulose-Membran wurde nach dem Proteintransfer in 0.7 cm breite Streifen geschnitten und das Antiserum in verschiedenen Verdünnungen beim nachfolgenden Western Blot getestet.

Affinitätsreinigung des polyklonalen Calcineurin B Antiserums

110 µg gereinigtes Calcineurin B wurde auf einem präparativen 15%-igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. Die durch Ponceau S Färbung angefärbte Proteinbande wurde ausgeschnitten, 10 min in TBS I gewaschen, 1 h in Roti-Block Lösung abgesättigt und über Nacht bei 4° C mit 1.5 ml 1:15 in TBS I, 3% BSA, 0.02% NaN₃ verdünntem Antiserum auf einem Roller inkubiert. Danach wurde der Streifen 3 x 10 min bei 4° C in TBS I gewaschen. Zum Eluieren der Antikörper wurde der Streifen 5 min mit 2 ml 50 mM Tris-HCl, 200 mM Glycin, pH 2.6 auf Eis inkubiert. Das Eluat wurde dann zur Neutralisation in ein neues Gefäß zu 200 µl 1 M Tris-Base überführt.

Die einzusetzende Verdünnung des erhaltenen Antikörpers wurde mit Hilfe eines präparativen SDS-Polyacrylamidgels, wie bei "Herstellung von polyklonalem Calcineurin B Antiserum" beschrieben, ermittelt.

Deionisierung von Formamid

Pro 100 ml Formamid wurden 5 g Bed Resin (Mixed H⁺ + OH⁻ Bed Resin, Partikel Ø 300 - 850 µm, Biorad) zugegeben und das Gemisch für 1-2 h bei RT gerührt. Danach wurde das deionisierte Formamid durch Filtration von dem Resin abgetrennt und bei 4° C im Dunkeln gelagert.

Molekularbiologische Methoden

Standardmethoden

Enzymatische Verdauung von DNA mit Restriktionsendonukleasen, Dephosphorylierungen von DNA 5' Enden mit "Shrimp" alkalischer Phosphatase, Ligationen von DNA-Fragmenten mit der T4 DNA Ligase, Ethanol Fällungen von DNA, spektrophotometrische Konzentrationsbestimmungen von DNA und RNA, Isolation von Plasmid DNA aus *E. coli* Zellen mittels Cäsiumchlorid-Dichtegradienten-Zentrifugation, Agarose Gelelektrophoresen zur Auftrennung von DNA-Fragmenten und Transformationen von *E. coli* Zellen mittels Elektroporation wurden nach Standardmethoden durchgeführt

(Sambrook, Fritsch & Maniatis, 1989). Die Isolation von Plasmid DNA aus *E. coli* Zellen im kleinen Umfang wurde mit dem "Concert Rapid Plasmid Miniprep System" (Gibco BRL) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Für Klonierungen wurden die *E. coli* Stämme E-sure und XL1-blue verwendet. Bei Klonierungen der beiden Konstrukte pDNeoll-*cnb1_L* +5' NTR Δ 3'- GFP1 (417 bp) und -GFP2 (720 bp) wurde der Stamm SCS110 (*dam⁻*, *dcm⁻*) verwendet, da die verwendete Bcl I Schnittstelle in der Calcineurin B cDNA sonst im methylierten Zustand vorgelegen hätte. DNA Sequenzanalysen wurden von den Firmen GATC (Konstanz) und MWG Biotech (Ebersberg) durchgeführt. RNA Sekundärstrukturen wurden mit dem Programm "mfold" Version 2.3 (<http://mfold2.wustl.edu/~mfold/rna/form1-2.3.cgi>) von Zuker und Turner (Washington University, School of Medicine, St. Louis, USA) erstellt.

PEI Transformation von Dictyostelium discoideum Zellen

Polyethylenimin (PEI) ist ein stark positiv geladenes, organisches Makromolekül, welches DNA durch die Plasmamembran von Zellen schleusen kann (Boussif et al., 1995). Für die Transformation von *Dictyostelium* Zellen mittels PEI wurden Kulturen verwendet, die auf ca. 1×10^6 Z/ml gewachsen waren. Die Zellen wurden zweimal mit eiskaltem SP-Puffer gewaschen und wieder auf eine Zelldichte von 1×10^6 Z/ml eingestellt. 3-5 µg der einzuschleusenden Plasmid-DNA wurde zu 50 µl 150 mM NaCl gegeben. In einem zweiten Ansatz wurden 6 µl 10 mM PEI mit 50 µl 150 mM NaCl gemischt. Beide Ansätze wurden leicht gevortext und 10 min bei RT inkubiert. Dann wurde das PEI/NaCl Gemisch tropfenweise zu dem DNA/NaCl Gemisch gegeben und 10 min bei RT inkubiert. Je 1 ml der gewaschenen Zellen wurde als Tropfen in eine 9 cm Petrischale pipettiert und das DNA/PEI/NaCl Gemisch gleichmäßig zugegeben. Diese Transformationsansätze wurden 4 h bei 26-27° C im Dunkeln inkubiert. Anschliessend wurden jeweils 12 ml Kulturmedium zugegeben und die Schalen über Nacht bei 23° C aufbewahrt.

Konversion von D. discoideum λ_{yes} Phagen cDNA Banken in Plasmid cDNA Banken

Die Methode der Konversion einer λ_{yes} Phagen cDNA Bank in eine Plasmid cDNA Bank beruht auf dem Prinzip der *cre-lox* spezifischen Rekombination und wurde, wie bei Elledge und Mitarbeiter (1991) beschrieben, durchgeführt.

Präparation von genomischer *Dictyostelium discoideum* DNA

Die Präparation von genomischer *Dictyostelium discoideum* DNA wurde nach einem veränderten Protokoll von A. Noegel (Universität Köln) und B. Wetterauer (LMU München) durchgeführt.

Dictyostelium Ax2 Zellen wurden bei 23° C und 150 rpm in einem Kulturvolumen von 200 ml bis zu einer Dichte von 1×10^7 Z/ml angezogen. Die Zellen wurden zweimal mit SP-Puffer gewaschen. Das Sediment des letzten Waschschriffs wurde in 20 ml kaltem Lysepuffer aufgenommen und die Zellen durch vorsichtiges Pipettieren lysiert. Die Vollständigkeit der Lyse wurde mikroskopisch kontrolliert. Bei der folgenden Zentrifugation in einem SS34 Rotor bei 13.000 x g und 4° C wurden die Zellkerne während 10 min sedimentiert und dann erneut in 5 ml Lysepuffer resuspendiert. Nachfolgend wurden 500 µl 0.2 M EDTA, 300 µl 10% SDS und 30 µl 20 mg/ml Proteinase K zu der Lösung zugegeben. Die Mischung wurde 30 min bei 65° C inkubiert und anschliessend auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 240 µl 5 M NaCl wurde die Lösung mit 12 ml 100% Ethanol überschichtet und durch mehrmaliges Invertieren vorsichtig gemischt. Die dabei ausfallende, genomische DNA wurde mit einer Pasteurpipette aufgespult und in ein Eppendorfgefäß zu 1 ml 70% Ethanol überführt. Nicht-spulbare DNA wurde durch eine nachfolgende Zentrifugation bei 12.000 x g für 20 min im SS34 Rotor sedimentiert und ebenfalls mit 70% Ethanol gewaschen. Die DNA wurde erneut sedimentiert, in 800 µl TE Puffer pH 8.0 aufgenommen und über Nacht bei 4° C gelöst. Um verunreinigende RNA zu entfernen, wurden die Ansätze anschliessend mit 1:100 verdünnter RNase A Stammlösung (10 mg/ml) 20 min bei 37° C behandelt. Nach der folgenden Phenol/Chloroform Extraktion wurde die DNA mit Ethanol gefällt, in 300 µl TE Puffer, pH 8.0 aufgenommen und über Nacht bei 4° C gelöst.

DMPC-Behandlung von H₂O und Puffer

H₂O und Puffer, die bei der RNA Extraktion und bei Northern Blots verwendet wurden, wurden durch Behandlung mit Dimethylpyrocarbonat (DMPC) RNase-frei gemacht. Hierfür wurde DMPC 1:1000 verdünnt zugegeben, die Ansätze über Nacht bei RT inkubiert und anschliessend autoklaviert. DMPC-behandeltes Wasser wird in der Folge als H₂O-DMPC bezeichnet.

Extraktion von Gesamt-RNA aus *Dictyostelium discoideum* Zellen

Für die Extraktion von Gesamt-RNA aus *Dictyostelium discoideum* Zellen mit dem RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) wurden die Zellen nach dem Waschen auf $3-4 \times 10^7$ Z/ml in SP Puffer eingestellt und je 1 ml dieser Zellen für eine Probe verwendet. Für Proben von vegetativen Zellen (t_0) wurden die Zellen direkt aus der gewaschenen Flüssigkultur entnommen und sedimentiert. Für Proben von differenzierenden Zellen wurden diese nach dem Waschen auf HAP Nitrocellulose-Filter ausgebracht. Nach einer Entwicklungszeit von 8 h wurden die Zellen mit 5 ml SP-Puffer von den Filtern abgelöst und sedimentiert. Die Sedimente wurden jeweils sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die RNA Extraktion wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

Wurde die Methode von Chomczynski & Sacchi (1987) verwendet, wurde eine Zellzahl von 5×10^7 Z/ml verwendet. Die eingefrorenen Zellsedimente wurden in 600 μ l Guanidinthiocyanat Puffer resuspendiert. Nacheinander wurden 60 μ l 2 M Natriumacetat und 600 μ l Aqua Roti-Phenol zugegeben und das Gemisch 1 min gevortext. Dann wurden 400 μ l einer Chloroform/Isoamylalkohol Mischung (49:1) zugegeben, erneut 1 min gevortext und die Ansätze 15 min auf Eis inkubiert. Die wässrige Phase der nachfolgenden Zentrifugation in einer Eppendorftischzentrifuge bei 10.000 x g für 20 min bei 4° C wurde in ein neues Eppendorfgefäß zu 700 μ l 100% Isopropanol überführt und zweimal in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die RNA wurde dann 10 min bei 10.000 x g und 4° C sedimentiert, in 300 μ l Guanidinthiocyanat Puffer gelöst und nach weiterer Zugabe von 300 μ l 100% Isopropanol zweimal in flüssigem Stickstoff eingefroren. Danach wurde erneut 10 min bei 10.000 x g und 4° C zentrifugiert. Das Sediment wurde zum Waschen 15 min bei RT in 500 μ l 75% Ethanol inkubiert und anschliessend 5 min bei 10.000 x g und 4° C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment ca. 40 min bei RT getrocknet. Die erhaltene RNA wurde dann in 40 μ l H₂O-DMPC aufgenommen. Zur Bestimmung der RNA Konzentration und Reinheit wurde die Extinktion von in H₂O-DMPC verdünnten Aliquoten der Proben bei 260 und 280 nm gemessen.

Herstellung von Digoxigenin-markierten DNA Sonden für Northern und Southern Blots

Die Markierung von DNA mit Digoxigenin wurde mit dem "DIG DNA Labeling Kit" von Boehringer (Mannheim) durchgeführt. Der Nachweis der markierten DNA erfolgt, indem Antikörper (Fab-Fragmente) gegen Digoxigenin, an die alkalische-Phosphatase gekoppelt

ist, an Digoxigenin binden. Durch Zugabe des Chemilumineszenz-Substrats CSPD wird ein Lichtsignal erzeugt, welches auf einem Röntgenfilm dokumentiert werden kann.

Verwendet wurde jeweils gereinigtes PCR Produkt. Für Northern Blots wurden die Calcineurin B- und GFP-Sonden aus cDNA hergestellt. Bei Southern Blots wurde genomische Calcineurin B DNA markiert. Ansätze mit jeweils 300 ng DNA wurden in einem Volumen von 15 µl 10 min bei 100° C denaturiert und auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 2 µl Hexanukleotid Mix, 2 µl dNTP Labeling Mix und 1 µl Klenow Enzym wurde die Markierungsreaktion 20 h bei 37° C durchgeführt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2 µl 200 mM EDTA, pH 8.0 abgestoppt.

Um die Qualität der Sonden zu testen, wurden Verdünnungen von 1 ng/µl bis 1 pg/µl in Verdünnungspuffer ("DIG DNA Labeling Kit") hergestellt. 1 µl der jeweiligen Verdünnung wurde auf eine Nytran Nylon-Membran aufgetropft und die Membran 30 min bei 120° C gebacken. Alle folgenden Schritte wurden bei RT durchgeführt. Die Membran wurde 1 min in Waschpuffer inkubiert und anschliessend 30 min in Block-Puffer abgesättigt. Der Block-Puffer wurde gegen frischen Puffer ausgetauscht, der mit 1:10.000 verdünnten Anti-Digoxigenin-AP Fab Fragmenten versetzt war. Nach 30 min wurde die Membran 2 x 15 min in Waschpuffer und 2-5 min in Detektionspuffer gewaschen. Für die Detektion wurde CSPD 1:100 in Detektionspuffer verdünnt, die Membran 5 min darin inkubiert und ein Röntgenfilm aufgelegt. Eine Verdünnung der Sonde auf 1-20 pg/µl zeigte nach 3-4 h ein deutliches Signal auf dem Röntgenfilm.

RNA Agarose Gelelektrophorese und Northern Blot

RNA Agarose Gelelektrophorese

RNA Agarosegele enthielten 1.2-2% Agarose, 1 x RNA Gelpuffer und 16 ml der 36.5%-igen Formaldehydlösung bei einem Gelvolumen von 100 ml. Die Formaldehydlösung wurde erst nach Aufkochen der Agarose-Puffer-Mischung und wieder Abkühlen auf 65° C zugegeben. 10-20 µg Gesamt-RNA wurde 1:2 mit RNA Probenpuffer versetzt und während 10 min bei 65° C denaturiert. Dann wurde 1/10 Volumen an RNA Farbmaler zugegeben und die Gelelektrophorese bei 70 Volt in 1 x RNA Laufpuffer durchgeführt. Um das Formaldehyd zu entfernen, wurden die Gele nach dem Lauf für 15 min in DMPC-behandeltem 20 x SSC Puffer geschwenkt. Der Transfer auf Nytran Nylon-Membranen erfolgte durch Kapillarität während 4 h oder über Nacht mit dem Turbo-Blotting System von Schleicher & Schuell. Als Laufpuffer wurde DMPC-behandelter 20 x SSC Puffer verwendet.

Hybridisierung und Detektion

Nach dem Transfer wurde die Membran 2 h bei 80° C gebacken und anschliessend in 40 ml "High" SDS-Hybridisierungspuffer 2-3 h bei 50° C und leichtem Schütteln vorinkubiert. Dann wurde der Puffer gegen 20 ml frischen Puffer ausgetauscht und die zuvor ermittelte Menge an Digoxigenin-markierter Sonde zugegeben. Die Sonde wurde dazu mit 200 µl 10 mg/ml Heringssperma DNA gemischt, 10 min bei 100° C denaturiert und auf Eis abgekühlt. Die Hybridisierung erfolgte ebenfalls bei 50° C unter leichtem Schütteln für 18-20 h.

Um unspezifisch gebundene Sonde zu entfernen, wurde die Membran anschliessend zweimal 5 min bei RT in 2 x SSC, 0.1% SDS und zweimal 15 min bei 50° C in 0.5 x SSC, 0.1% SDS gewaschen. Alle weiteren Schritte (Absättigen der Membran sowie Detektion) erfolgten bei RT wie unter "Herstellung von Digoxigenin-markierten DNA Sonden für Northern und Southern Blots" beschrieben. Um ein deutliches Signal zu erhalten, wurde der Röntgenfilm für 18-20 h aufgelegt.

Southern Blot

Für Southern Blots wurden 1%-ige Agarosegele mit 100 ml Volumen nach Standardprotokoll (Sambrook et al., 1989) hergestellt. Pro Ansatz wurden 15 µg genomische *Dictyostelium discoideum* DNA mit Restriktionsenzymen, die unterschiedlich häufig im Calcineurin B Gen schneiden verdaut und anschliessend mit Ethanol gefällt. Als Restriktionsenzyme wurden BamHI, HindIII, Sal I, Xmn I, Bcl I, Kpn I und Eco RI verwendet. Die gefällte DNA wurde jeweils in 20 µl H₂O aufgenommen und mit 5 x DNA "Blue Run" Puffer versetzt. Es wurde immer der gesamte Ansatz auf das Gel aufgetragen. Als Größenstandard diente der Digoxigenin-markierte DNA Marker III (Boehringer Mannheim). Nach dem Lauf wurde das Gel zum Depurinieren der DNA zunächst für 10 min in 0.25 M HCl, dann zum Denaturieren zweimal 15 min in 0.5 M NaOH/1.5 M NaCl und schließlich zum Neutralisieren zweimal 15 min in 3 M Na-Acetat pH 5.5 inkubiert. Der DNA-Transfer auf eine Nytran Nylon-Membran erfolgte über Nacht durch Kapillarität mit 10 x SSC als Laufpuffer wie bei Sambrook und Mitarbeiter (1989) beschrieben. Nach dem Transfer wurde die Membran 10 min in 6 x SSC Puffer gewaschen und dann 2 h bei 80° C gebacken. Nach der 2-3 stündigen Vorinkubation in der Hybridisierungslösung erfolgte die Hybridisierung mit der Digoxigenin-markierten Calcineurin B-Sonde über Nacht. Die Vorbehandlung der Sonde erfolgte ebenfalls wie bei "RNA Agarose Gelelektrophorese und Northern Blot" beschrieben.

Beide Schritte erfolgten bei 68° C unter leichtem Schütteln. Nach der Hybridisierung wurde die Membran zweimal 5 min bei RT in 2 x SSC, 0.1% SDS und zweimal 15 min bei 68° C in 0.5 x SSC, 0.1% SDS gewaschen. Die weitere Behandlung der Membran sowie die Detektion erfolgte wie bei "Herstellung von Digoxigenin-markierten DNA Sonden" beschrieben. Ein Röntgenfilm wurde für 3-4 h aufgelegt.

Polymerasekettenreaktion (PCR)

PCR Reaktionen wurden durchgeführt, um Calcineurin B cDNA Inserts aus Plasmiden zu amplifizieren und um Calcineurin B DNA aus cDNA Banken sowie aus genomischer DNA zu isolieren.

Für die Amplifizierung von cDNA Sequenzen, die für Calcineurin B kodieren wurden Plasmid-spezifische Oligonukleotide in Kombination mit dem Calcineurin B-spezifischen Oligonukleotid "CNB rev BamH I" eingesetzt. An die Oligonukleotide war für die spätere Klonierung in das Plasmid pUC19 jeweils die Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym BamH I angebracht (s. "Identifizierung und Isolation von bis dahin unbekanntem Calcineurin B Sequenzen aus cDNA Banken"). Für die Amplifizierung von bereits bekannten Calcineurin B Sequenzen aus Plasmiden und aus genomischer DNA wurden Calcineurin B-spezifische Oligonukleotide verwendet, an die ebenfalls eine entsprechende Erkennungssequenz angefügt war. Die Hybridisierungs-Temperatur (T_H) des jeweiligen Oligonukleotids wurde folgendermaßen berechnet:

$$T_H = ((n_1 \times A) + (n_2 \times T)) \times 2^\circ \text{C} + ((n_3 \times C) + (n_4 \times G)) \times 4^\circ \text{C}$$

(n_{1-4} = Anzahl des jeweiligen Nukleotids in der Sequenz (angefügte Schnittstelle nicht mitgerechnet))

Bei der Festsetzung der Hybridisierungs-Temperatur für die PCR wurde von der niedrigeren Temperatur (T_H) der beiden Oligonukleotide ausgegangen und davon nochmals 5° C subtrahiert. Die PCR wurde mit folgendem Programm in einem Pekin-Elmer Thermocycler 2400 durchgeführt:

4 min	94° C	-	1 x
2 min	T _H		
1 min	72° C		
1 min	94° C	-	30 x
2 min	T _H		
1 min	72° C		
1 min	94° C	-	1 x
2 min	T _H		
8 min	72° C		

Vorbereitung der DNA Matrize

Die als Matrize für die PCR dienende DNA wurde in H₂O bidest auf 10 ng/μl verdünnt. Pro Reaktionsansatz wurde für die Amplifizierung eines cDNA Inserts 10-20 ng Plasmid-DNA eingesetzt. Im Fall der Isolation von Calcineurin B-kodierenden DNA Abschnitten aus cDNA Banken, wurden bis zu 100 ng Plasmid-Bank und im Fall der genomischen DNA bis zu 50 ng eingesetzt. Bei Verwendung der λgt11 cDNA Bank wurde die DNA zunächst folgendermaßen isoliert: die Phagen wurden so in H₂O bidest verdünnt, dass sich in einem Volumen von 20 μl 3 - 4.5 x 10⁵ Phagen befanden. Die Ansätze wurden 15 min bei 70° C denaturiert, kräftig gevortext und anschliessend zentrifugiert, um die Membranbestandteile zu sedimentieren. Je 20 μl dieser DNA Präparation wurden in einem PCR Ansatz eingesetzt.

Zusammensetzung der PCR Ansätze

Die PCR Reaktionen wurden, wenn nicht anders beschrieben, immer in einem Gesamtvolumen von 100 μl durchgeführt. Die Komponenten wurden in der folgenden Reihenfolge pipettiert:

x₁ μl H₂O bidest (für ein Endvolumen von 100 μl)

10 μl 10 x DNA Polymerase Reaktionspuffer (mit oder ohne MgCl₂)

x₂ μl MgCl₂ (falls von der Polymerase benötigt und noch nicht im Reaktionspuffer enthalten)

2 μl dNTP Mix (Mischung aus den vier Nukleotiden; Konzentration in der Stammlösung jeweils 2 mM)

je 1 μl Oligonukleotid (Stammlösung je 100 pmol/μl in H₂O bidest)

x₃ μl DNA Matrize

0.5-1 μl Polymerase (ca. 2.5-5 units)

1/10 des Ansatzes wurde nach Beendigung der Reaktion mit 5 x DNA "Blue Run" Puffer versetzt und auf einem 0.7%-igen Agarosegel analysiert. Die amplifizierten DNA-Fragmente wurden mit dem "Concert Rapid PCR Purification Kit" (Gibco) von Salzen und restlichen Oligonukleotiden befreit. PCR Fragmente, die kleiner als 400 bp waren, wurden über eine DNA Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt und über die nachfolgend beschriebene Methode des "crush and soak" (Sambrook et al., 1989) gereinigt.

Identifizierung und Isolation von bis dahin unbekanntem Calcineurin B Sequenzen aus cDNA Banken

Das Calcineurin B-spezifische Oligonukleotid "CNB rev BamH I" wurde in verschiedenen PCR Ansätzen mit den Oligonukleotiden "pACT/AS 5' BamH I", " λ gt11 fwd BamH I" und " λ gt11 rev BamH I" kombiniert. Alle drei Oligonukleotide hybridisieren nahe der Klonierungsstelle der cDNA Inserts in der jeweiligen cDNA Bank. Bei den verwendeten *Dictyostelium* cDNA Banken handelte es sich um die λ gt11 cDNA Bank (Lacombe et al., 1986) und um die zu Plasmid cDNA Banken konvertierten λ_{yes} Phagen cDNA Banken aus vegetativen und differenzierenden Zellen (λ_{yes} Phagen Banken überlassen von S. Lu, Houston, USA).

Bei Verwendung eines Plasmid-spezifischen Oligonukleotids wird oft unspezifisches PCR Produkt synthetisiert. Um die amplifizierte Calcineurin B cDNA zu identifizieren, wurden jeweils zwei identische Reaktionen durchgeführt. Beide Ansätze wurden anschliessend mit Ethanol gefällt. Da in dem bis dahin bekannten Calcineurin B cDNA Abschnitt drei Eco RI Schnittstellen vorkommen, wurde einer der Ansätze mit dem Restriktionsenzym Eco RI verdaut. Die DNA wurde dann auf einem 8%-igen DNA Polyacrylamidgel aufgetrennt. DNA-Fragmente aus dem unverdauten Ansatz, die mindestens die Größe des bisher bekannten Calcineurin B cDNA Abschnitts hatten und im verdauten Ansatz nicht mehr sichtbar waren, wurden mit einer Rasierklinge ausgeschnitten und mit der Methode des "crush and soak" (Sambrook et al., 1989) eluiert. Die cDNA-Fragmente wurden anschliessend über die BamH I Schnittstelle in das Plasmid pUC19 kloniert. Bei einem Eco RI Restriktionsverdau von in pUC19 klonierten Calcineurin B cDNAs waren Fragmente der Größe 55 bp, 87 bp und 243 bp, sowie ein mindestens 78 bp großes Fragment zu erwarten. Die Größe des zuletzt genannten cDNA-Fragments ist abhängig von der Länge des 5' Bereichs der Calcineurin B cDNA. Läuft dieses Fragment auf einem DNA Polyacrylamidgel auf einer größeren Länge als 78 bp, so sollte es sich hierbei um eine

Sequenz mit einem längeren 5'-Terminus im Vergleich zu der vom cDNA Sequenzierprojekt in Tsukuba veröffentlichten Sequenz handeln. Die in pUC 19 klonierten Calcineurin B cDNA-Fragmente wurden deshalb auf die Länge dieses Fragments untersucht. Die Sequenzanalyse wurde von der Firma GATC durchgeführt.

Isolation der Calcineurin B cDNA Isoformen mittels 5' RACE ("rapid amplification of cDNA 5' ends")

Mit Hilfe der Methode des 5' RACE können 5' Bereiche von cDNAs isoliert werden. Ausgehend von Gesamt-RNA wird die cDNA Synthese mit einem Gen-spezifischen Oligonukleotid durchgeführt, so dass nur die gewünschte cDNA synthetisiert wird. Anschliessend wird durch das Enzym "Terminale Desoxynukleotid Transferase" (TdT) eine Kette von Cytosinen an das 5' Ende der cDNA angefügt ("TdT-tailing Reaktion"). Durch Kombination eines weiteren Gen-spezifischen Oligonukleotids mit dem 5' RACE Anker-"Primer" ("5' RACE abridged anchor primer", AAP), welcher mit dem angefügten Cytosin Bereich hybridisiert, wird die synthetisierte cDNA in der nachfolgenden PCR amplifiziert. Der Anker-"Primer" verfügt über eine Adapterregion mit mehreren Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme, so dass die cDNA anschliessend in ein Plasmid kloniert werden kann.

Für die Isolation der Calcineurin B cDNA Isoformen wurde der Kit "5' RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends, Version 2.0" von Gibco BRL verwendet. Gesamt-RNA wurde wie beschrieben nach Chomczynski & Sacchi (1987) isoliert. Bis auf folgende Änderungen wurden die Reaktionen wie vom Hersteller angegeben durchgeführt: für die Isolation der *cnb1_S* cDNA Isoform wurde bei der cDNA Synthese von 5 µg Gesamt-RNA ausgegangen, bei der cDNA Isoform *cnb1_L* von 10 µg Gesamt-RNA. Die cDNA Synthese wurde wie vom Hersteller beschrieben während 40 min mit dem Calcineurin B-spezifischen Oligonukleotid "GSP1 CNB rev" durchgeführt. Bei dem darauffolgenden Verdau der RNA wurde im Fall des Ansatzes mit 10 µg Gesamt-RNA die doppelte Menge an RNase Mix eingesetzt. Die "TdT-Tailing" Reaktion wurde wie angegeben in einem Volumen von 25 µl durchgeführt. Für eine bessere Ausbeute an Cytosin-markierter cDNA wurden die Ansätze mit der gereinigten cDNA Lösung, anstatt mit H₂O bidest aufgefüllt. Die nachfolgende PCR wurde wie angegeben durchgeführt. Für die Amplifizierung der *cnb1_S* cDNA Isoform wurden die Oligonukleotide "GSP1 CNB rev BamH I" und "5' RACE AAP" verwendet, für die *cnb1_L* cDNA Isoform "CNB rev BamH I" und "5' RACE AAP". Der Thermocycler 2400 (Perkin-Elmer) wurde folgendermaßen programmiert:

3 min	94° C	1 x
2 min	55° C	
1 min	72 °C	
1 min	94° C	34 x
2 min	55° C	
1 min	72 °C	
1 min	94° C	1 x
2 min	55° C	
8 min	72 °C	

Für die getrennte Isolierung der beiden cDNA Isoformen wurden die PCR Ansätze mit Ethanol gefällt und auf einem Agarosegel aufgetrennt. Mit einer Rasierklinge wurden die beiden cDNA Banden getrennt voneinander ausgeschnitten, mit dem "QIAquick Gel Extraction Kit" (Qiagen) gereinigt und über die BamH I Schnittstelle in das Plasmid pUC 19 kloniert. Um die Ausbeute der *cnb1_L* cDNA zu erhöhen, wurden mehrere PCR Ansätze vereinigt.

Sämtliche unabhängig über PCR isolierten Calcineurin B Nukleotidsequenzen, sowie die Calcineurin B Sequenz der Universität Tsukuba, wurden in einem Sequenzvergleich auf PCR-bedingte Fehler verglichen und angeglichen. Die so erhaltene endgültige Calcineurin B cDNA Sequenz ist in Abbildung 11 der Ergebnisse auf Seite 70 gezeigt.

Isolierung des Calcineurin B Gens

Das Gen für Calcineurin B wurde ebenfalls über PCR isoliert. Genomische *Dictyostelium discoideum* DNA wurde wie beschrieben isoliert und davon 50 ng pro PCR Ansatz eingesetzt. Zwei Oligonukleotide ("5' NTR fwd 1" und "-2") wurden, basierend auf der 5' nicht-translatierten Sequenz des Klons pUC19-*cnb1_L*+5' NTR Δ3', erstellt und in Kombination mit dem Oligonukleotid "GSP1 CNB rev BamH I" bei der PCR eingesetzt. Die amplifizierte DNA wurde auf einem Agarosegel aufgetrennt, mit einer Rasierklinge ausgeschnitten und mit dem "QIAquick Gel Extraction Kit" aus dem Gel eluiert. Die Klonierung in das Plasmid pUC19 erfolgte über die BamH I Schnittstelle.

DNA Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Reinigung von DNA mittels "crush and soak"

DNA Polyacrylamidgele enthielten 8% Polyacrylamid in 1 x TBE Puffer (Sambrook et al., 1989). Die aufzutrennende DNA wurde mit Ethanol gefällt und in 20 µl H₂O bidest mit entsprechendem Volumen an 5 x DNA "Blue Run" Puffer aufgenommen. Als Standard wurde eine 100 bp DNA Leiter (MBI Fermentas) aufgetragen. Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte bei 110 Volt. Das Gel wurde anschliessend 20 min in 1 x TBE Puffer mit Zusatz von Ethidiumbromid (30 µl 20 mg/ml Ethidiumbromid pro 20 ml 1 x TBE Puffer) angefärbt und anschliessend 30 min in H₂O bidest entfärbt.

Für die Reinigung von DNA-Fragmenten aus DNA Polyacrylamidgelen wurden die DNA Banden mit einer Rasierklinge aus dem Gel ausgeschnitten. Die Elution der DNA erfolgte nach der von Sambrook und Mitarbeiter (1989) beschriebenen Methode des "crush and soak".

Ergebnisse

Isolierung von Calcineurin B DNA Fragmenten aus cDNA Banken

Im Rahmen des *Dictyostelium discoideum* cDNA Sequenzierprojekts an der Universität in Tsukuba (Japan) wurde im Frühjahr 1998 eine unvollständige cDNA Sequenz veröffentlicht (<http://www.csm.biol.tsukuba.ac.jp>). Die übersetzte Aminosäuresequenz weist große Ähnlichkeit zu Calcineurin B Sequenzen aus anderen Organismen auf. Das Oligonukleotid "CNB rev BamH I" wurde erstellt, welches komplementär zum 3' Ende dieser cDNA ist. Für die Isolierung der kompletten Calcineurin B cDNA wurde dieses Oligonukleotid in Kombination mit Plasmid-spezifischen Oligonukleotiden bei der PCR eingesetzt.

Aus allen drei verwendeten cDNA Banken wurden auf diese Weise mehrere Calcineurin B cDNA Klone von verschiedener Länge isoliert. Die in pUC19 klonierten Calcineurin B cDNAs wurden über einen Eco RI Restriktionsverdau auf die Länge des 5' Bereichs untersucht. Von den ca. 60 untersuchten Klonen wiesen nur die Klone "CNB λ -2" und "CNB pACT2-14" einen längeren 5' Bereich auf als die vom Sequenzierprojekt in Tsukuba veröffentlichte Calcineurin B cDNA Sequenz. Klon "CNB λ -2" wurde mit den Oligonukleotiden "CNB rev BamH I" und " λ gt11 rev BamH I" aus der *Dictyostelium discoideum* λ gt11 cDNA Bank (Lacombe et al., 1986) isoliert. Klon "CNB pACT2-14" wurde mit den Oligonukleotiden "CNB rev BamH I" und "pACT2/AS 5' BamH I" aus der vegetativen *Dictyostelium discoideum* λ_{yes} Plasmid-cDNA Bank isoliert.

Das cDNA Sequenzierprojekt veröffentlichte später eine am 3' Ende um 36 bp verlängerte Calcineurin B Sequenz, die mit einem neuen Stopkodon abschliesst, so dass die Sequenzen der beiden Calcineurin B cDNAs am 3' Ende nicht komplett sind. Auch der 5' Bereich der Sequenzen ist nicht vollständig. Die kompletten Calcineurin B cDNA Sequenzen werden in Abb. 11 auf Seite 70 der Ergebnisse gezeigt.

Da die Sequenzen der beiden Calcineurin B cDNA Klone alle vier EF-Hand Calcium-Bindedomänen aufwiesen, wurde die cDNA des Klons "CNB λ -2" für die im folgenden beschriebene Reinigung des rekombinanten Calcineurin B verwendet.

Reinigung von rekombinantem Calcineurin B

Die cDNA des Calcineurin B Klons "CNB λ -2" wurde ab dem Nukleotid 250 (s. auch Abb. 11 auf Seite 70) in das *E. coli* Expressionsplasmid pQE30 eingefügt und in den *E. coli* Stamm SG13009 transformiert. Die Expression wurde auf den angegebenen cDNA Bereich beschränkt, da die Sequenzen der beiden isolierten Calcineurin B Klone ab diesem Triplet überinstimmen. Das amino- und carboxyterminal verkürzte Calcineurin B wurde als Fusionsprotein mit 6 N-terminalen Histidinen exprimiert und konnte über eine einstufige Affinitätschromatographie an einer Ni²⁺-NTA Matrix gereinigt werden.

In einem Expressionstest wurde zunächst die Zeitdauer bestimmt, welche die Zellen benötigten, um nach Induktion der Proteinexpression mit IPTG eine maximale Expression des Fusionsproteins zu erreichen. Dafür wurde nach Zugabe von IPTG zu der *E. coli* Kultur während einer Dauer von 6 Stunden stündlich eine Probe für ein SDS-Polyacrylamidgel genommen. Der Test ergab, dass die maximale Expression des Proteins nach vier Stunden erreicht war (nicht gezeigt). Die Induktion der Proteinexpression ist in Abb. 2 im Vergleich der Spuren "n.i." und "t₄" sichtbar. Das rekombinante Calcineurin B weist ein apparentes Molekulargewicht von ca. 16 kDa auf.

Nach dem Ernten der Zellen und nachfolgendem Aufbrechen mittels "French Press" wurden die unlöslichen von den löslichen Zellbestandteilen durch Zentrifugation abgetrennt. Rekombinante Proteine sind oft unlöslich und liegen in Form von Einschlusskörpern ("inclusion bodies") in der Zelle vor. In diesem Fall muss das Protein in Anwesenheit von Harnstoff unter denaturierenden Bedingungen gereinigt werden. Wie beim Vergleich der Spuren "FPÜ" ("French Press" Überstand; lösliche Bestandteile) und "FPP" ("French Press" Sediment, hier findet man u.a. die "inclusion bodies") sichtbar ist, war Calcineurin B sowohl in gelöster als auch in ungelöster Form in den Zellen vorhanden (Abb. 2). Eine denaturierende Reinigung aus "inclusion bodies" wurde der unter nativen Bedingungen vorgezogen, da hier eine größere Ausbeute an gereinigtem Protein zu erwarten war (A. Walz, persönliche Mitteilung).

Um unspezifisch an das Säulenmaterial gebundenes Protein zu entfernen, wurde der Waschpuffer mit 10 mM Imidazol versetzt. Imidazol ist ein Struktur analog zu dem Imidazolring des Histidins und kompetiert um die Bindestellen an der Ni²⁺-NTA Matrix. Die hohe Affinität des "Histidin-"Tags" des rekombinanten Proteins zum Ni²⁺-NTA Säulenmaterial erlaubte sehr stringentes Waschen. Auf überladenen Gelen war lediglich ein verunreinigendes Protein von ca. 40 kDa sichtbar. Die Ausbeute der Reinigung betrug 3 mg Protein pro Liter Zellkultur.

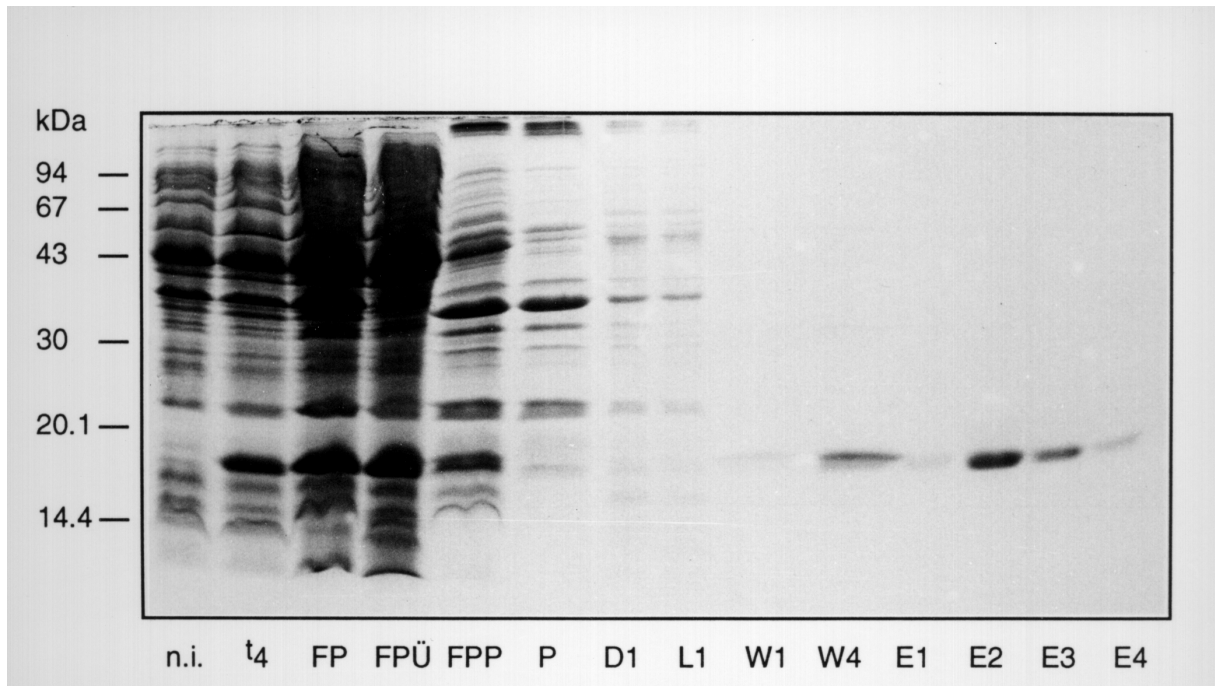


Abb. 2: Coomassie Blue gefärbtes SDS-Polyacrylamidgel einer Reinigung von rekombinantem Calcineurin B

Eine Übernachtskultur des mit dem Konstrukt "pQE30-CNB" transformierten *E. coli* Stamms SG13009 wurde 1:100 in 1 l Medium verdünnt und die Proteinexpression bei einer OD_{600} von 0.6 mit 1 mM IPTG induziert. Die Zellen wurden nach 4 h geerntet und in einer "French Pressure Cell Press" lysiert. Der rohe Zellextrakt wurde bei 40.000 x g zentrifugiert. Das Sediment wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren und unter denaturierenden Bedingungen in Lysepuffer^{+H} resuspendiert. Der Überstand der nachfolgenden Zentrifugation wurde 1 h bei RT mit der äquilibrierten Ni^{2+} -NTA Matrix inkubiert. Nach Ablassen des Durchlaufs wurde die Säule zunächst mit Lysepuffer^{+H} und anschließend mit Waschpuffer gewaschen. Gebundenes Protein wurde mit insgesamt 7.5 ml Elutionspuffer eluiert. Durch Dialyse gegen Lysepuffer mit abnehmenden Harnstoffkonzentrationen wurde das Protein schrittweise renaturiert. **n.i.**: 20 µg (30 µl) des Zellextrakts vor IPTG Zugabe; **t₄**: 20 µg (30 µl) des Zellextrakts 4 h nach IPTG Zugabe; **FP**: 40 µl des rohen Zellextrakts nach der "French Press"; **FPÜ**: 40 µl des "French Press" Überstands nach der ersten Zentrifugation; **FPP**: 40 µl des Sediments der 1. Zentrifugation, nach Aufnahme in 10 ml Lysepuffer^{+H}; **P**: 40 µl des Sediments nach der 2. Zentrifugation. Das Sediment wurde hierzu in einem dem Überstand entsprechenden Volumen an Lysepuffer^{+H} aufgenommen; **D1**: 13 µl der ersten Fraktion des Durchlaufs; **L1**: 13 µl der ersten Waschfraktion mit Lysepuffer^{+H}; **W1 + W4**: je 60 µl der Waschfraktionen 1 und 4 mit Waschpuffer; **E1-E4**: je 12 µl der Eluatfraktionen.

Funktionstests des rekombinanten Calcineurin B

Es wurde einerseits die Bindung von rekombinatem Calcineurin B an *Dictyostelium* Calcineurin A und andererseits der Einfluss von Calcineurin B auf die Phosphataseaktivität von Calcineurin A getestet.

Test der Bindung von Calcineurin B an Dictyostelium Calcineurin A

Es wurde untersucht, ob rekombinantes Calcineurin B und *Dictyostelium* Calcineurin A ein Holoenzym ausbilden. Für diesen Nachweis wurde überprüft, ob beide Untereinheiten nach Inkubation mit Calmodulin-Sepharose 4B oder mit einer Ni²⁺-NTA Matrix gemeinsam von der jeweiligen Säule eluiert werden.

Bindung an Calmodulin-Sepharose 4B

Um zu vermeiden, dass Calcineurin A Moleküle, die kein Calcineurin B gebunden hatten, an die Calmodulin-Sepharose 4B binden konnten, wurde ein 3.7-facher molarer Überschuss an Calcineurin B im Vergleich zu Calcineurin A zugegeben. Dadurch lag ein großer Anteil von Calcineurin B ungebunden vor und befand sich nach der Inkubation mit der Calmodulin-Sepharose 4B im Überstand (Abb. 3 B: S). Ein weiterer Teil war unspezifisch an die Calmodulin-Sepharose gebunden und wurde in den folgenden Schritten durch Waschen mit Ca²⁺-Puffer entfernt (Abb. 3 B: W1 -W4). In Anwesenheit von 1 M NaCl im Waschpuffer (Ca²⁺-Puffer "hoch Salz") löste sich weder Calcineurin A von der Calmodulin-Sepharose 4B ab (Abb. 3 A: H1-H3), noch löste sich Calcineurin B von Calcineurin A ab (Abb. 3 B: H1-H3). Dies zeigte weiterhin, dass die Renaturierung erfolgreich war und bestätigte, dass die im rekombinanten Protein fehlenden amino- und carboxyterminalen Bereiche nicht an der Bindung an Calcineurin A beteiligt waren. Der Komplex aus Calcineurin A und Calcineurin B wurde erst in Anwesenheit von 20 mM EGTA im Elutionspuffer von der Calmodulin-Sepharose 4B abgelöst (Abb. 3 A und B: E1 und E2). In einem Kontrollansatz wurde gezeigt, dass Calcineurin B nicht an Calmodulin-Sepharose 4B binden konnte (nicht gezeigt).

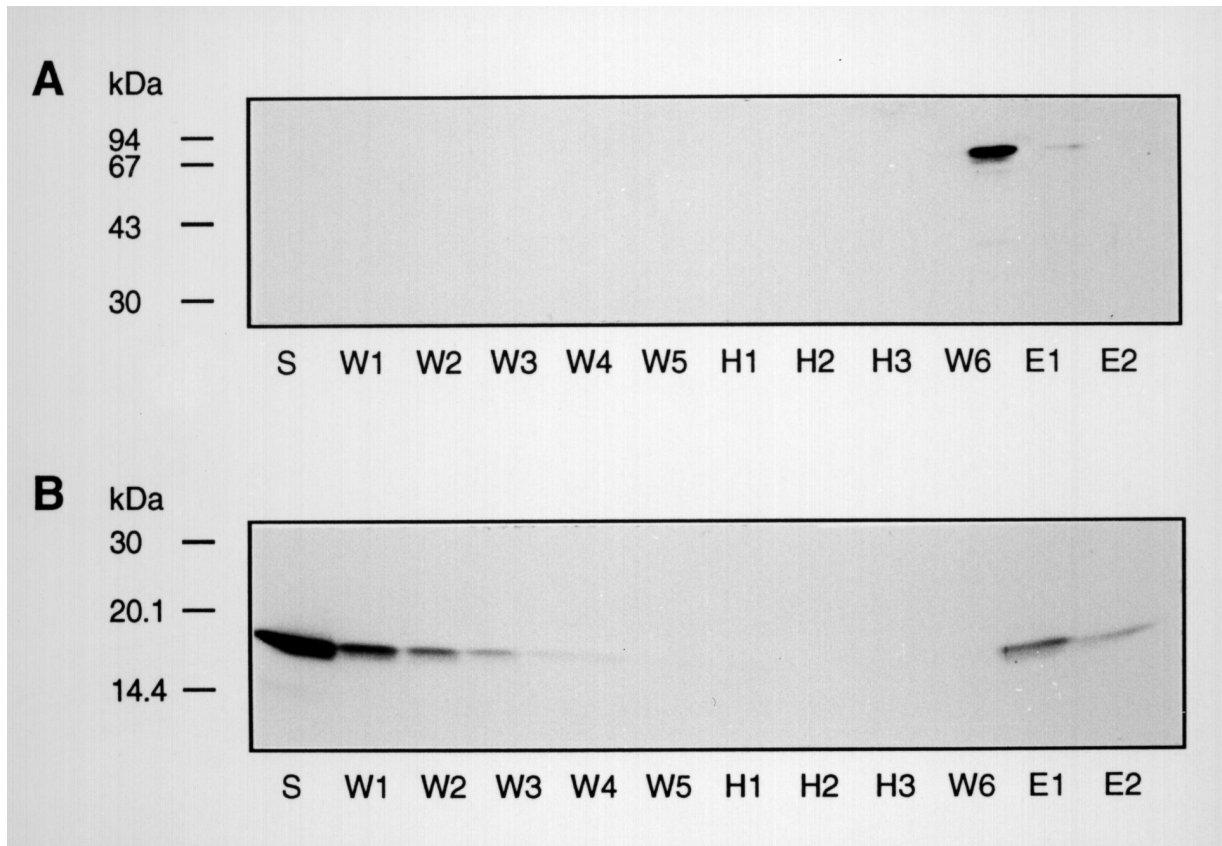


Abb. 3: Western Blot Analyse der Bindung des Komplexes aus rekombinantem Calcineurin B und *Dictyostelium* Calcineurin A an Calmodulin-Sepharose 4B

0.17 μM *Dictyostelium* Calcineurin A und 0.66 μM rekombinantes Calcineurin B wurden nach einstündiger Vorinkubation bei 4°C in 150 μl Ca^{2+} -Puffer zu 100 μl äquilibrierter Calmodulin-Sepharose 4B gegeben und 2 h bei 4°C inkubiert. Nach drei Waschschrritten mit Ca^{2+} -Puffer wurde der Ansatz dreimal mit 220 μl Ca^{2+} -Puffer "hoch Salz" gewaschen. Die Elution des Holoenzym erfolgte mit je 220 μl EGTA-haltigem Elutionspuffer. Nach jedem Zentrifugationsschritt wurden 220 μl Überstand abgenommen, mit 5 x GSB versetzt und gekocht. Jeweils 80 μl der Proben wurden auf einem 15%-igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und für die anschließende Immunfärbung auf Nitrocellulose-Membranen übertragen. In **A** wurde die Nitrocellulose mit 1:5000 verdünntem Calcineurin A Antiserum behandelt, in **B** mit 1:5000 verdünntem Calcineurin B Antiserum. Die Positionen der Molekulargewichtsstandards sind links angezeichnet. **S**: 80 μl des Überstands nach der Inkubation mit der Calmodulin-Sepharose 4B; **W1-W5**: je 80 μl der Waschfraktionen mit Ca^{2+} -Puffer; **H1-H3**: je 80 μl der Waschfraktionen mit Ca^{2+} -Puffer "hoch Salz"; **E1+E2**: je 80 μl der Eluatfraktionen.

Bindung des Calcineurin Holoenzym an eine Ni^{2+} -NTA Matrix

Bei Bindung des Komplexes aus Calcineurin A und rekombinantem Calcineurin B an eine Ni^{2+} -NTA Matrix wurden ebenfalls beide Untereinheiten nach Inkubation des Ansatzes mit Imidazol-haltigem Puffer gemeinsam eluiert (Abb. 4 A und B, Spur E1 und E2). Das Holoenzym war in diesem Fall über den Histidin-"Tag" des rekombinanten Calcineurin B an

die Matrix gebunden. Abb. 4 B zeigt außerdem, dass die Ni^{2+} -NTA Matrix mit der eingesetzten Calcineurin B Menge überladen war, da bereits im Überstand ungebundenes Calcineurin B sowie Calcineurin A vorhanden war (Abb. 4 A und B, Spur S). Bei dem im Überstand nachgewiesenen Calcineurin A handelt es sich vermutlich um Protein, welches an das überschüssige Calcineurin B gebunden war. Ein Kontrollansatz zeigte, dass Calcineurin A nicht an die Ni^{2+} -NTA Matrix binden konnte (nicht gezeigt).

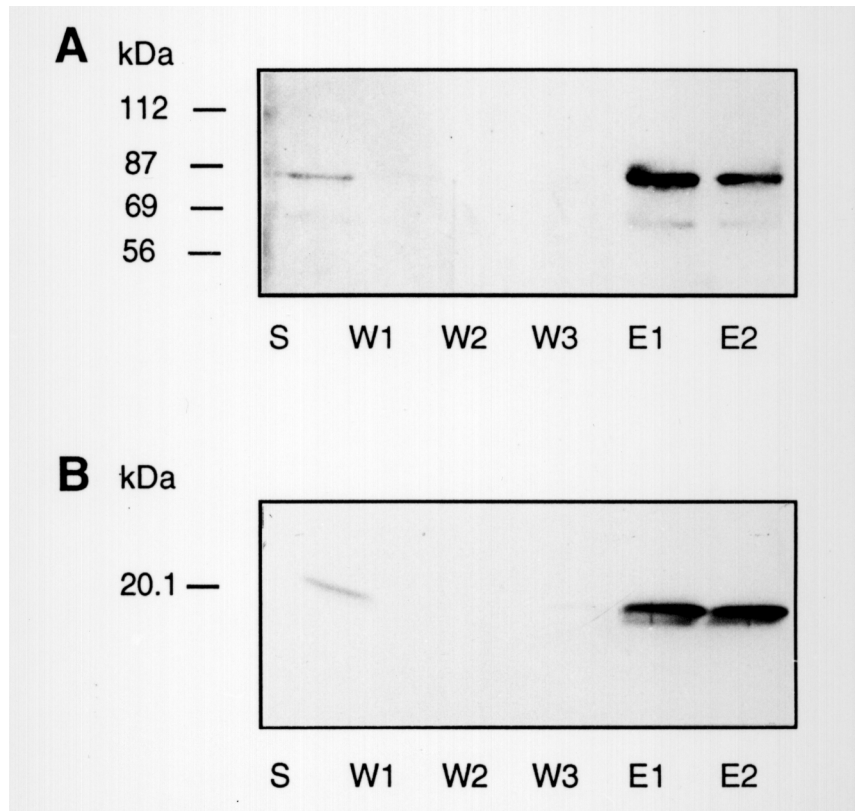


Abb. 4: Western Blot Analyse der Bindung des Komplexes aus *Dictyostelium* Calcineurin A und rekombinatem Calcineurin B an eine Ni^{2+} -NTA Matrix

0.17 μM *Dictyostelium* Calcineurin A und 0.66 μM rekombinantes Calcineurin B wurden nach einstündiger Vorinkubation bei 4° C in 90 μl Ni^{2+} -NTA Bindepuffer zu 10 μl einer äquilibrierten Ni^{2+} -NTA Matrix gegeben und 1 h bei 4° C inkubiert. Der Ansatz wurde dreimal mit 80 μl Ni^{2+} -NTA Bindepuffer gewaschen. Gebundenes Protein wurde in zwei Schritten mit je 80 μl Ni^{2+} -NTA Elutionspuffer eluiert. Nach jedem Zentrifugationsschritt wurden 80 μl Überstand abgenommen, mit 5 x GSB versetzt und für die SDS-Gelelektrophorese vorbereitet. Jeweils 80 μl der Proben wurden auf einem 9%-igen Gel für den Nachweis von Calcineurin A bzw. auf einem 15%-igen Gel für den Nachweis von Calcineurin B aufgetrennt und auf Nitrocellulose-Membranen übertragen. In **A** wurde die Nitrocellulose nach dem Proteintransfer mit 1:5000 verdünntem Calcineurin A Antiserum, in **B** mit 1:5000 verdünntem Calcineurin B Antiserum behandelt. Die Positionen der Molekulargewichtsstandards sind links angezeichnet. **S**: 80 μl des Überstands nach der Inkubation mit der Ni^{2+} -NTA Matrix; **W1-W3**: je 80 μl der Waschfraktionen; **E1 + E2**: je 80 μl der Eluatfraktionen.

Phosphataseaktivität des Calcineurin Holoenzym

Die Phosphataseaktivität des Calcineurin Holoenzym wurde im Vergleich zu der Aktivität von gereinigtem Calcineurin A bestimmt. Als Substrate wurden das chromogene Substrat *p*-Nitrophenylphosphat (pNPP) und das R_{II} Phosphopeptid eingesetzt.

Verwendung von pNPP als Substrat

In Abwesenheit von Calmodulin erhöhte Calcineurin B die basale Phosphataseaktivität von Calcineurin A nur geringfügig (mit Calcineurin B: $582 \pm 14 \text{ nmol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$ vs. ohne Calcineurin B: $544 \pm 22 \text{ nmol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$; Abb. 5 A; Säulen 1 und 3) aber dennoch signifikant (Student's t-Test: $p \leq 0.05$). Die Zugabe von Calmodulin stimulierte die Calcineurin A Aktivität (Abb. 5 A, vgl. Säulen 1 und 2) bzw. die Aktivität des Holoenzym aus Calcineurin A und Calcineurin B (Abb. 5 A, vgl. Säulen 3 und 4) jeweils 2-3-fach. Die Calmodulin-stimulierte Phosphataseaktivität des Calcineurin Holoenzym war im Vergleich zu der von Calcineurin A jedoch nur um einen Faktor von 1.2 erhöht (Abb. 5 A, Säulen 2 und 4).

Im Fall des chromogenen Substrats pNPP hatte die Anwesenheit der regulatorischen Untereinheit Calcineurin B somit keinen deutlichen Einfluss auf die Calmodulin-stimulierte Aktivität von Calcineurin A.

Verwendung des R_{II} Phosphopeptids als Substrat

Bei pNPP handelt es sich um ein Substrat, welches von vielen Phosphatasen dephosphoryliert werden kann, da in den meisten Fällen keine Substraterkennung notwendig ist. Aus diesem Grund wurde zusätzlich das für Rinder Calcineurin als spezifisches Peptidsubstrat beschriebene R_{II} Phosphopeptid getestet (Blumenthal et al., 1986). Dabei handelt es sich um einen 19 Aminosäure langen Bereich der regulatorischen Untereinheit vom Typ II der cAMP-abhängigen Proteinkinase. Das Peptid besitzt nur eine einzige Phosphorylierungsstelle.

Im Gegensatz zu den Phosphatasetests mit dem Substrat pNPP wurde bei Einsatz des R_{II} Phosphopeptids in Gegenwart von Calcineurin B eine deutliche Aktivitätssteigerung sowohl der Basalaktivität als auch der Calmodulin-stimulierten Phosphataseaktivität gemessen. Nach Zugabe von Calcineurin B wurde bereits die basale Phosphataseaktivität von Calcineurin A 13-fach erhöht (Abb. 5 B, vgl. Säulen 1 und 3). Zugabe von Calmodulin erhöhte die Aktivität von Calcineurin A sowie die des Holoenzym jeweils 2-3-fach (Abb. 5 B, Säulen 1 und 2, und Säulen 3 und 4). Die Calmodulin-stimulierte Aktivität von Calcineurin

A steigerte sich in Anwesenheit von Calcineurin B um den Faktor 9.2 (Abb. 5 B, Säulen 2 und 4). Das R_{II} Phosphopeptid scheint somit ein weitaus spezifischeres Substrat für *Dictyostelium* Calcineurin zu sein als pNPP.

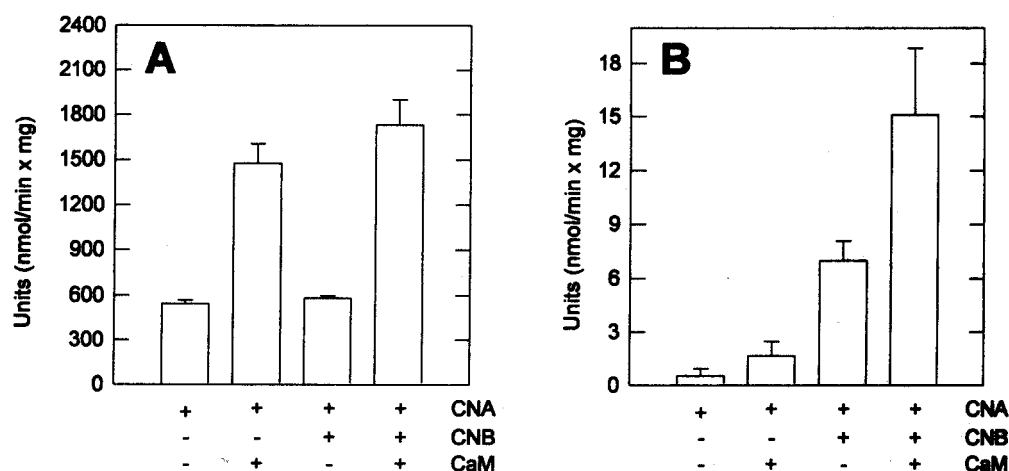


Abb. 5: Phosphataseaktivität des Calcineurin Holoenzym und von Calcineurin A

Die Daten repräsentieren den Mittelwert \pm Standardabweichung von zwei (pNPP) bzw. drei (R_{II} Phosphopeptid) unabhängig durchgeführten Experimenten. Alle Phosphatasetests wurden in 2- und 3-fach Bestimmungen durchgeführt. **A:** 60 nM Calcineurin A bzw. 60 nM Calcineurin A und B wurden in An- oder Abwesenheit von 1 μ M Rinder-Calmodulin inkubiert. Die Reaktion wurde 1 h nach Zugabe von 20 mM pNPP abgestoppt und die Absorption bei 405 nm gemessen. **B:** 180 nM Calcineurin A bzw. 180 nM Calcineurin A und B wurden in An- oder Abwesenheit von 1 μ M Rinder-Calmodulin inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 35 μ M R_{II} Peptid gestartet und nach 40 min abgestoppt. Die Absorption wurde 30 min nach dem Abstoppen bei 620 nm bestimmt. Als Kontrollen dienten jeweils Ansätze ohne Calcineurin.

Antikörper gegen *Dictyostelium* Calcineurin B erkennen zwei Calcineurin B Proteinisoformenten in *Dictyostelium discoideum*

Für die Herstellung von Calcineurin B Antiserum wurde ein Kaninchen mit dem rekombinanten Calcineurin B immunisiert. Das Antiserum wurde zunächst auf spezifische Epitoperkennung getestet (Abb. 6). Auf einem SDS-Polyacrylamidgel wurden dafür verschiedene Mengen an rekombinanten Calcineurin B, roher *Dictyostelium* Wildtyp Ax2 Extrakt, sowie als Negativkontrollen *E. coli* Extrakt und BSA aufgetrennt. Neben Antiserum

Verdünnungen von 1:5000, 1:20.000 und 1:100.000 wurde auch affinitätsgereinigtes Antiserum in verschiedenen Verdünnungen getestet.

Rekombinante Calcineurin B Mengen von 10, 50 und 100 ng wurden deutlich bei 1:5000 und 1:20.000 Verdünnungen des Antiserums erkannt (Abb. 6 A bzw. B, Spur 1-3). 10 ng Protein war bei einer Antiserum Verdünnung von 1:100.000 nicht mehr detektierbar (nicht gezeigt).

Bei der Reinigung des rekombinanten Calcineurin B war zusätzlich ein Protein mit apparentem Molekulargewicht von ca. 40 kDa angereichert worden (vgl. Abb. 2). Bei einer Antiserum Verdünnung von 1:5000 ist erkennbar, dass gegen dieses Protein ebenfalls Antikörper produziert worden waren (Abb. 6 A, Spur 1-3). Diese Proteinbande wurde nicht in *E. coli* Extrakt detektiert (Abb. 6 A, Spur 4). Außerdem wurde bei dieser Verdünnung eine weitere, kleinere Proteinbande detektiert. Hierbei könnte es sich um ein Abbauprodukt von Calcineurin B handeln. Als Negativkontrollen wurden 1 µg BSA und 3 µg roher *E. coli* Extrakt auf dem Gel aufgetrennt. Während BSA bei keiner der getesteten Serumverdünnungen detektiert wurde (Abb. 6 A und B, jeweils Spur 6), wurden in rohem *E. coli* Extrakt drei Proteinbanden von ca. 10, 20 und 30 kDa detektiert (Abb. 6 A, Spur 4). Diese Proteine wurden aber auch vom Nullserum des Kaninchens erkannt (nicht gezeigt) und somit von bereits im Serum vorhandenen Antikörpern.

In rohem Extrakt von *Dictyostelium* Ax2 Zellen wurden bei Antiserum Verdünnungen von 1:5000 und 1:20.000 zwei Proteine von ca. 18 und 20.5 kDa detektiert (Abb. 6 A und B, jeweils Spur 5), die beide auch spezifisch vom affinitätsgereinigten Antiserum erkannt wurden (vgl. Abb. 6 C). Diese beiden Calcineurin B Isoformen werden im folgenden als CNB_L (L=large) und CNB_S (S=small) bezeichnet. Im Extrakt von *Dictyostelium* Zellen wurde außerdem sehr schwach ein weiteres, 30 kDa großes Protein erkannt. Dabei handelte es sich vermutlich um ein weiteres EF-Hand Calcium-Bindeprotein, gegen welches das Antiserum eine Kreuzreaktion zeigte.

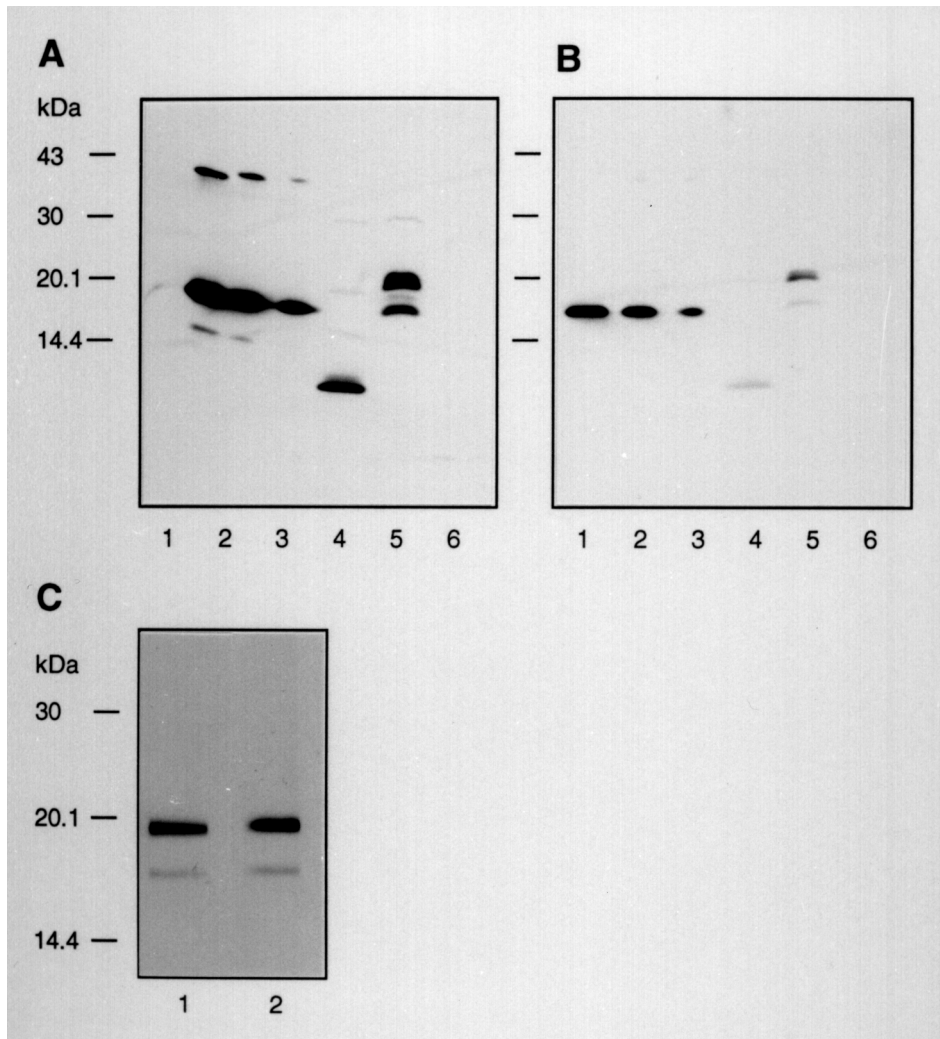


Abb. 6: Test des Calcineurin B Antiserums

Rekombinantes Calcineurin B, roher *Dictyostelium discoideum* Wildtyp Ax2 Extrakt, roher *E. coli* Extrakt und BSA wurden auf 15%-igen SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt und für die folgenden Western Blots auf Nitrocellulose-Membranen übertragen. Die Nitrocellulose wurde in **A** mit 1:5000 verdünntem Calcineurin B Antiserum behandelt, in **B** mit 1:20.000 verdünntem Calcineurin B Antiserum. **1, 2 und 3**: 100, 50 bzw. 10 ng rekombinantes Calcineurin B; **4**: 3 µg *E. coli* Extrakt; **5**: 100 µg *Dictyostelium* Ax2 Extrakt t_6 ; **6**: 1 µg BSA. **C**: Für den Test des affinitätsgereinigten Antiserums wurden auf einem präparativen 15%-igen SDS-Polyacrylamidgel 100 µg *Dictyostelium* Wildtyp Ax2 Extrakt pro 0.7 cm aufgetrennt und auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. 0.7 cm breite Streifen der Nitrocellulose wurden mit verschiedenen Verdünnungen des affinitätsgereinigten Antiserums bzw. zum Vergleich mit nicht-affinitätsgereinigtem Antiserum behandelt. **1**: affinitätsgereinigtes Calcineurin B Antiserum der Verdünnung 1:100; **2**: Calcineurin B Antiserum 1:20.000.

Expression der Calcineurin B Proteinisoformen während der Differenzierung und in den verschiedenen Zelltypen

Regulation der Calcineurin B Expression während der Differenzierung

Die Expression der beiden Calcineurin B Proteinisoformen wurde während der Differenzierung von einzelligen Amöben bis hin zum fertig ausgebildeten Fruchtkörper untersucht.

Die Expression der 20.5 kDa CNB_L Isoform blieb während der gesamten Differenzierung konstant (Abb. 7 A). Dagegen war die Expression der 18 kDa CNB_S Isoform deutlich entwicklungsreguliert. Während den ersten vier Stunden der Differenzierung war nur eine geringe Menge dieser Isoform vorhanden. Die darauffolgende verstärkte Expression korrelierte mit dem Beginn der Aggregation. Im weiteren Verlauf der Entwicklung blieb die Menge der CNB_S Isoform, ebenso wie die der CNB_L Isoform, auf hohem Niveau (s. auch Spur 1 in Abb. 7 B für den Zeitpunkt t₂₄).

Calcineurin B Expression in Stielzellen und in Sporen

Im folgenden wurde untersucht, ob eine der beiden Calcineurin B Isoformen spezifisch in nur einem der beiden terminal differenzierten Zelltypen - Stiele oder Sporen - exprimiert wird. Dafür wurden reife Fruchtkörper in die beiden Zelltypen aufgetrennt. Weiterhin wurde die Mutante O5TS untersucht, die nach einer Erhöhung der Temperatur während der Differenzierung von 23° C auf 26.5° C nur noch Sporen ausbildet, sowie die Mutante *stKA*⁻. Das Gen *stKA* ist vermutlich ein Transkriptionsfaktor und wird normalerweise stark in Präsporenzellen exprimiert. *stKA*⁻ Zellen bilden nur noch Stielzellen aus (Chang et al., 1996).

Beide Calcineurin B Isoformen wurden sowohl in Stielzellen als auch in Sporen von Wildtyp Ax2 Zellen exprimiert (Abb. 7 B, Spur 2 und 3). In der sporogenen und in der Stielzell-Mutante wurden ebenfalls beide Isoformen detektiert (Abb. 7 B, Spur 4 und 6). Somit handelt es sich nicht um eine zelltypspezifische Expression einer der beiden Calcineurin B Isoformen. Von der Mutante O5TS wurde zusätzlich zu der Probe, die aus Zellen gewonnen wurde, die bei 26.5° C inkubiert worden waren, eine Probe von vegetativen und differenzierten Zellen nach 24 h aufgetragen. Da bei diesen Ansätzen die Temperatur nicht erhöht wurde, waren diese Zellen vergleichbar mit Wildtyp Zellen (Abb. 7 B, Spur 5: t₀ und Spur 7: t₂₄).

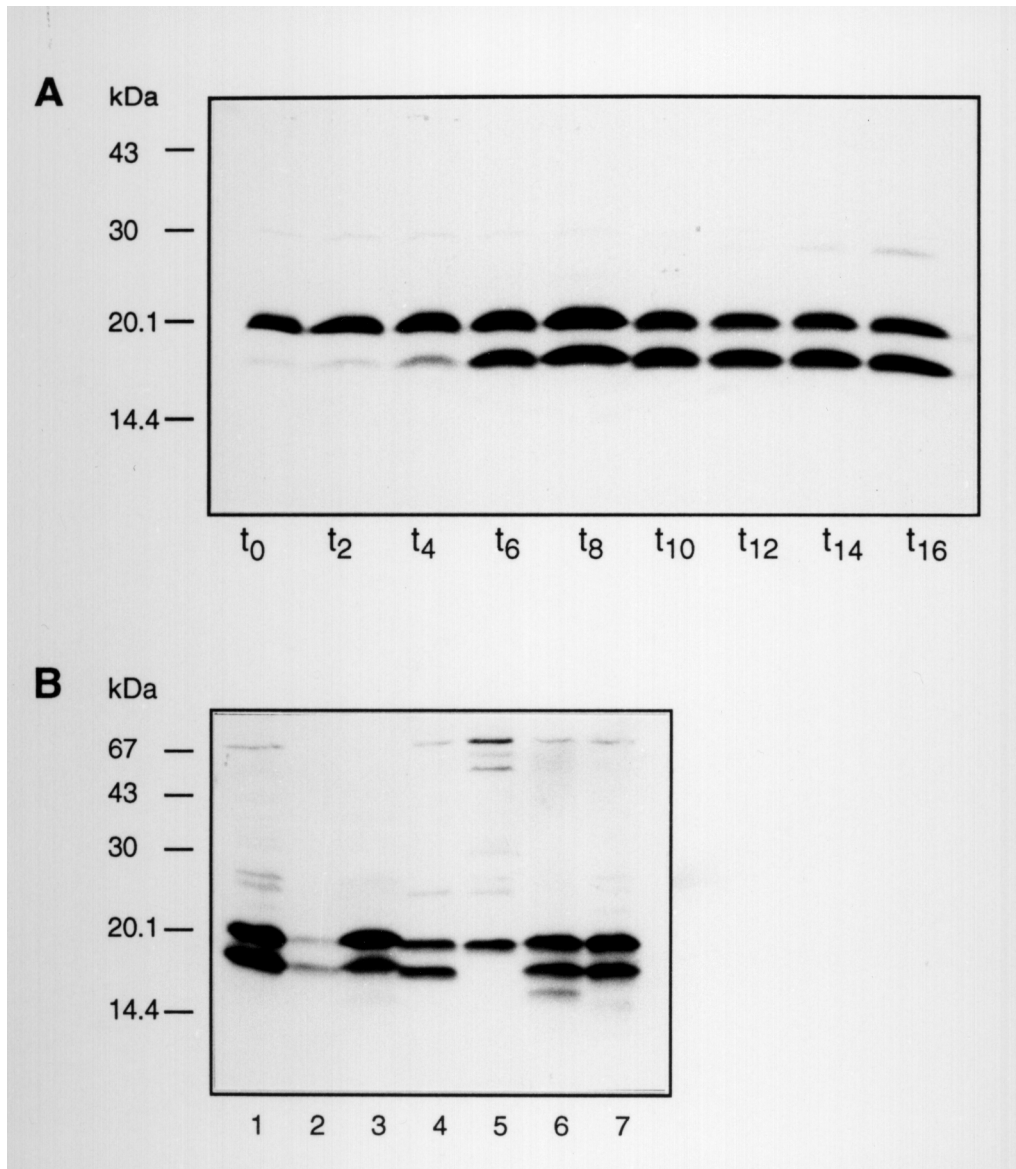


Abb. 7: Entwicklungsabhängige und zelltypspezifische Expression der Calcineurin B Isoformen

Gezeigt sind Western Blots, die mit 1:5000 verdünntem Calcineurin B Antiserum behandelt wurden. **A:** Expression der Calcineurin B Isoformen über den Verlauf der Differenzierung. Jeweils 1 ml gewaschene Wildtyp Ax2 Zellen (2×10^7 Z/ml) wurden auf HABP Nitrocellulosefilter ausgebracht und bei 23°C inkubiert. Alle 2 h wurden die Zellen von einem Filter mit SP-Puffer abgespült, sedimentiert, mit 2 x GSB versetzt und gekocht. Die Probe der vegetativen Zellen (t₀) wurde direkt den gewaschenen Zellen entnommen. Auf einem 15%-igen SDS-Polyacrylamidgel wurden jeweils 50 µg Gesamtprotein aufgetrennt und für den anschliessenden Western Blot auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. Die Angabe t_x zeigt den Zeitpunkt der Probenentnahme an. **B:** Expression der Calcineurin B Isoformen in Stielzellen und in Sporen. Nach dem Ernten der Fruchtkörper wurden durch kräftiges Vortexen und anschliessender Zentrifugation die Stiele von den Sporen aufgetrennt und in 2 x GSB, 2% 2-Mercaptoethanol gekocht. Die Inkubationstemperatur der Mutante O5TS wurde für die Ausbildung des sporogenen Phänotyps ab dem "slug" Stadium auf 26.5°C erhöht. *stkA*⁻ Zellen wurden wie Wildtyp Ax2 Zellen behandelt. Jeweils 50 µg Gesamtprotein wurden auf einem 15%-igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und für den anschliessenden Western Blot auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. **1:** Wildtyp Ax2 t₂₄; **2:** Wildtyp Ax2 Stielzellen; **3:** Wildtyp Ax2 Sporen; **4:** *stkA*⁻ t₂₂; **5:** O5TS Zellen, t₀; **6:** O5TS Sporen, 2 Tage nach der Temperaturerhöhung auf 26.5°C; **7:** O5TS Zellen, t₂₄ bei 23°C.

Nachweis eines einzigen Calcineurin B Gens in *Dictyostelium discoideum*

In *Drosophila melanogaster* wurden zwei Calcineurin B Isoformen nachgewiesen, die das Produkt zweier unabhängiger Calcineurin B Gene sind (Warren et al., 1996). Ein Southern Blot wurde angefertigt, um zu überprüfen, ob die zwei Calcineurin B Isoformen von *Dictyostelium discoideum* ebenfalls das Produkt zweier Gene sind oder ob es nur ein Gen gibt und ein anderer Mechanismus für das Entstehen der beiden Proteinisoformen verantwortlich ist. Genomische DNA wurde dazu mit Restriktionsenzymen verdaut, die entweder dreimal, einmal oder nicht in der bis dahin bekannten Calcineurin B Sequenz schnitten. Bei Verdau von genomischer DNA mit den Restriktionsenzymen HinD III und Sal I, welche beide nicht in der Calcineurin B Sequenz schneiden, wurde eine DNA Bande detektiert (Abb. 8, Spur 1 und 2). Bei Verwendung der Enzyme Xmn I, Bcl I und Kpn I, die jeweils einmal in der Calcineurin B Sequenz schneiden, waren zwei DNA Banden nachweisbar (Abb. 8, Spur 3-5). Bei einem Verdau mit dem Restriktionsenzym Eco RI, für welches es drei Erkennungssequenzen in der Calcineurin B Sequenz gibt, wurden drei Banden detektiert (Abb. 8, Spur 6). Die erwartete vierte Bande des Verdau mit Eco RI hatte eine Größe von nur 87 bp und konnte in diesem Gel nicht nachgewiesen werden. Daraus wurde geschlossen, dass in *Dictyostelium discoideum* nur ein Gen für Calcineurin B existiert. Das Gen wird im folgenden als "*cnb1*" bezeichnet.

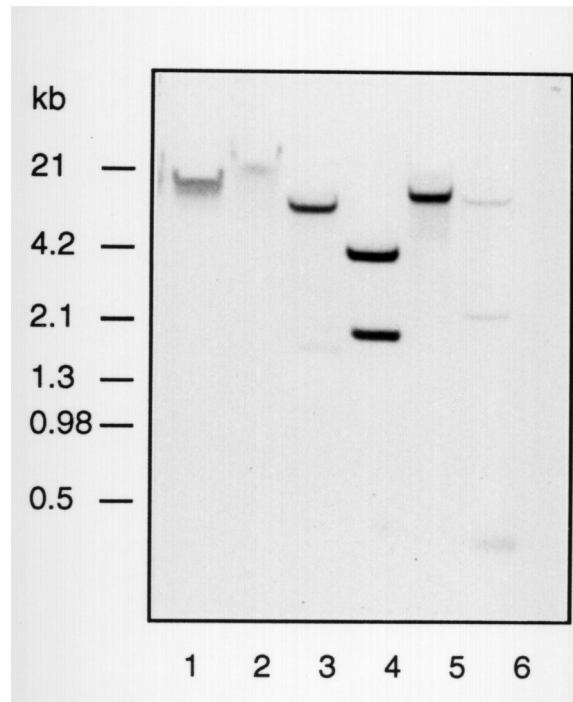


Abb. 8: Nachweis des Calcineurin B Gens *cnb1* mittels Southern Blot

Gezeigt ist einer von zwei unabhängigen Southern Blots, die beide dasselbe Ergebnis erbrachten. Je Ansatz wurden 15 µg genomische *Dictyostelium* DNA mit einem Restriktionsenzym verdaut, welches mit einer definierten Häufigkeit im Gen schneidet. Die DNA wurde anschliessend auf einem 1%-igen Agarosegel aufgetrennt und über Kapillarität auf eine Nytran Nylon-Membran übertragen. Der Nachweis der Calcineurin B Genfragmente erfolgte durch Hybridisierung mit einer Digoxigenin-markierten Sonde aus genomischer Calcineurin B DNA. Verwendete Restriktionsenzyme waren 1: Hind III; 2: Sal I; 3: Xmn I; 4: Bcl I; 5: Kpn I; 6: Eco RI.

Entwicklungsabhängige Expressionsregulation der Calcineurin B mRNA Isoformen

Es wurde geprüft, wieviel Calcineurin B mRNA Transkripte in den *Dictyostelium* Zellen vorhanden sind, und ob deren Expression über den Verlauf der Entwicklung reguliert wird.

Zwei Calcineurin B mRNA Isoformen von ca. 700 und 1000 Basen wurden detektiert, die beide spezifisch mit der Digoxigenin-markierten Calcineurin B cDNA-Sonde hybridisierten (Abb. 9). Da es sich um zwei definierte Banden handelte, die nicht diffus ineinander übergingen, wurde angenommen, dass die 700 Basen mRNA nicht ein Abbauprodukt der 1000 Basen mRNA ist, sondern dass es sich um zwei Calcineurin B mRNA Isoformen handelt. Im folgenden werden diese als *cnb1_L* (1000 Basen) und *cnb1_S* (700 Basen) mRNA bezeichnet.

Die Expression der beiden Transkripte war entwicklungsabhängig reguliert. Während in vegetativen Zellen (t_0) beide Transkripte in etwa derselben Menge in den Zellen vorhanden waren, nahm die Menge der *cnb1_S* mRNA Isoform im Verlauf der Entwicklung stark zu. Gleichzeitig nahm die *cnb1_L* mRNA derart ab, dass sie ab dem Beginn der Aggregation nach ca. 6-8 h der Entwicklung bis zur Ausbildung fester Aggregate nach ca. 12 h nicht mehr detektierbar war. Dieser Effekt ist noch gravierender unter der Berücksichtigung, dass zu den Zeitpunkten t_2 und t_4 in Abb. 9 nur etwa die Hälfte der mRNA Menge im Vergleich zu den anderen Zeitpunkten aufgetragen wurde. Während die *cnb1_L* mRNA sehr deutlich bei t_2 und t_4 detektierbar war, war sie ab t_8 trotz der doppelten Gesamt-RNA Menge nicht mehr nachweisbar. Diese Beobachtung wurde auch durch ein im folgenden Abschnitt beschriebenes Experiment bestätigt, bei dem die mRNA Isoformen indirekt über eine reverse Transkriptase-Reaktion nachgewiesen wurden (Abb. 10 A). Nach ca. 12 h Entwicklungszeit wurde die *cnb1_L* mRNA Isoform wieder detektiert und gegen Ende der Differenzierung war die Verteilung der beiden mRNA Isoformen wieder wie in vegetativen Zellen (nicht gezeigt). Zur Kontrolle der aufgetragenen mRNA-Gesamt mengen wurden in anderen Experimenten dieselben mRNA Mengen derselben Präparation eingesetzt. Die Calcineurin B cDNA-Sonde wurde dafür mit der cDNA-Sonde der Protein-Disulfidisomerase (PDI) gemischt, deren Expression über den Verlauf der Entwicklung konstant bleibt (Monnat et al., 1997). Diese Experimente bestätigten das in Abb. 9 gezeigte Expressionsprofil der beiden Calcineurin B mRNA Isoformen (s. auch Abb. 10 B).

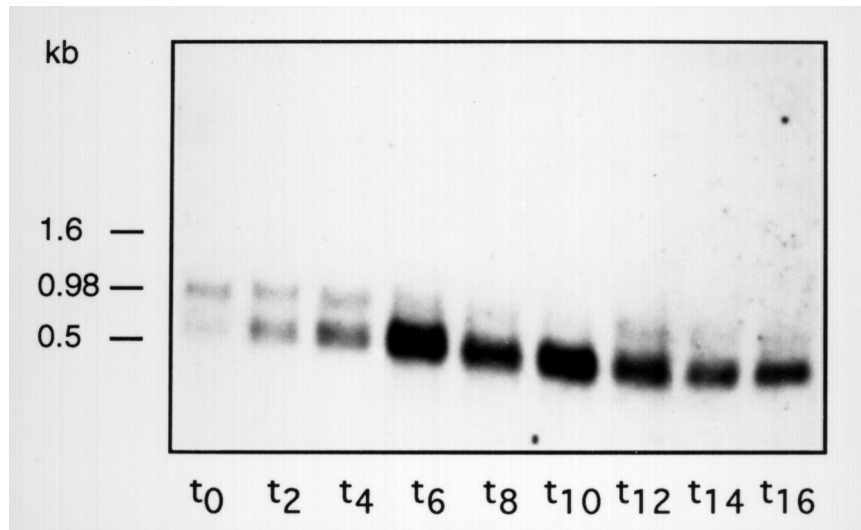


Abb. 9: Entwicklungsabhängige Regulation der Calcineurin B mRNA Isoformen *cnb1_L* und *cnb1_S*

10-20 µg Gesamt-RNA wurden auf einem 1.2%-igen Formaldehyd-haltigen Agarosegel aufgetrennt und über Kapillarität auf eine Nytran Nylon-Membran übertragen. Der Nachweis der Calcineurin B mRNA Isoformen erfolgte mit einer Digoxigenin-markierten Calcineurin B cDNA-Sonde. Die Zeitpunkte der Probenentnahmen sind mit t_x bezeichnet.

Isolierung und Charakterisierung der Calcineurin B cDNA Isoformen

Isolierung der Calcineurin B cDNA Isoformen

Für die Isolierung der kompletten Calcineurin B cDNA Isoformen wurde die Methode des 5' RACE angewandt. Für die cDNA Synthese wurde das Oligonukleotid "GSP1 CNB rev" erstellt, welches komplementär zum 3' Ende der Calcineurin B cDNA ist. Zwei cDNA Isoformen mit apparenten Größen von 600 und 800 bp wurden synthetisiert (Abb. 10 A). Die cDNA Synthese wurde sowohl mit Gesamt-RNA von vegetativen, als auch mit Gesamt-RNA von aggregierenden Zellen durchgeführt (Abb. 10 A, t_0 bzw. t_8). Während zum Zeitpunkt t_0 beide cDNA Isoformen synthetisiert wurden, fand bei t_8 nur noch die Synthese der *cnb1_S* cDNA Isoform statt. Dies bestätigte den Befund, dass die *cnb1_L* mRNA Isoform in aggregierenden Zellen nicht detektierbar ist. In Abb. 10 B ist zum Vergleich ein Northern Blot gezeigt, der die Expression der Calcineurin B mRNA Isoformen in vegetativen und aggregierenden Zellen zeigt. Für die Überprüfung der aufgetragenen RNA Menge wurde die Calcineurin B cDNA-Sonde mit der Digoxigenin-markierten cDNA der Proteindisulfid-Isomerase gemischt. Dabei handelt es sich um ein ca. 1.5 kb großes Transkript für ein im

endoplasmatischen Retikulum lokalisiertes "Haushaltsprotein", dessen Expression über die Entwicklung hinweg konstant bleibt (Monnat et al., 1997).

Die amplifizierten cDNA Isoformen waren etwas kleiner als die im Northern Blot detektierten mRNA Isoformen, da die 3' nicht-translatierte Region der jeweiligen mRNA aufgrund des gewählten Oligonukleotids nicht amplifiziert wurde (vgl. Abb. 10 A und B).

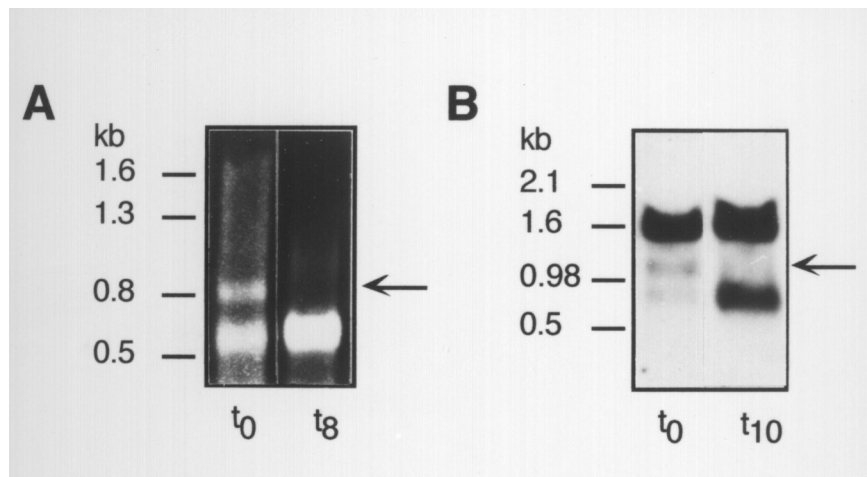


Abb. 10: Expression der Calcineurin B cDNA und mRNA Isoformen in vegetativen und aggregierenden Zellen

Die Synthese der Calcineurin B cDNA Isoformen wurde mit Hilfe des "5' RACE Kits" (Gibco BRL) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. **A:** 0.7%-iges Agarosegel, welches die amplifizierten cDNA Isoformen zum Zeitpunkt t_0 und t_8 zeigt. Die synthetisierte cDNA wurde in einer darauffolgenden PCR mit den Oligonukleotiden "GSP1 CNB rev BamH I" und "5' RACE AAP" amplifiziert. **B:** Northern Blot mit jeweils 20 μ g Gesamt-RNA der Entwicklungszeitpunkte t_0 und t_{10} . Zur Kontrolle der aufgetragenen Gesamt-RNA Menge wurde die Calcineurin B cDNA-Sonde mit der Digoxigenin-markierten, 1.6 kb großen cDNA der Proteindisulfid-Isomerase gemischt. Die Pfeile geben jeweils die Position der *cnb1_L* cDNA (A) bzw. der *cnb1_L* mRNA (B) an.

Vergleich der Sequenzen der *cnb1* cDNA Isoformen

Die amplifizierten cDNA Isoformen wurden aus dem Agarosegel eluiert und in das Plasmid pUC19 kloniert. Die am 5' Ende längsten cDNA Klone wurden, wie bereits beschrieben, durch das Eco RI-spezifische Bandenmuster identifiziert. In Abb. 11 ist die Nukleotidsequenz und die daraus abgeleitete Aminosäuresequenz der *cnb1_L* cDNA Isoform gezeigt. Die 5' nicht-translatierte Sequenz der *cnb1_L* cDNA Sequenz weist in jedem Leseraster Stopkodons auf. Das erste AUG verfügt mit einem Adenin an Position -3 und einem Guanin an Position +4 über eine sehr starke Konsensus-Sequenz für die Initiation

der Translation (Kozak, 1986). Ein von dieser cDNA abstammendes Protein hätte eine berechnete Größe von 20.7 kDa, was der apparenten Größe der CNB_L Isoform entspricht.

Von den insgesamt 45 identifizierten *cnb1_S* cDNA Klonen wurden 10 sequenziert. Die Sequenzanalyse ergab, dass sich die beiden Calcineurin B cDNA Isoformen *cnb1_L* und *cnb1_S* lediglich am 5' Ende unterscheiden. In Abb. 11 ist das 5' Ende von einer der beiden *cnb1_S* cDNAs markiert (➤), die den längsten 5' Bereich aufwies. Bei keiner der sequenzierten *cnb1_S* cDNAs konnte das erste Startkodon oder die 5' nicht-translatierte Region der *cnb1_L* cDNA nachgewiesen werden. An dieser Stelle fand sich immer der Poly-G Anker der 5' RACE "TdT-Tailing" Reaktion. Ob die Sequenzen der längsten so isolierten *cnb1_S* cDNAs mit dem Triplet GGA oder erst mit dem Nukleotid A beginnen, konnte deshalb nicht genau festgelegt werden. Die *cnb1_S* cDNA unterscheidet sich also von der *cnb1_L* cDNA nur darin, dass die 5' nicht-translatierte Region, sowie höchstens die ersten fünf Nukleotide der *cnb1_L* cDNA fehlen (zur Übersicht s. auch Abb. 13 auf S. 74). Das erste AUG der *cnb1_S* mRNA (Nukleotide 247-249) weist eine schwache Konsensus-Sequenz für die Initiation der Translation auf (Kozak, 1986). Bei einem Start der Translation ab diesem AUG ist ein Protein der berechneten Größe von 18.9 kDa zu erwarten, was der apparenten Größe der CNB_S Isoform entspricht. Die "scanning"-Hypothese, wonach das erste, sich in einem guten Kontext befindende AUG als Startkodon verwendet wird (Übersicht in (Kozak, 1989) und (Kozak, 1999)), unterstützt die Annahme, dass es sich bei diesem AUG um das Startkodon der *cnb1_S* mRNA handelt.

Der Vergleich der cDNA Isoformen führte zu dem Schluss, dass der Bereich zwischen dem ersten und zweiten AUG translatierte Sequenz für die *cnb1_L* mRNA und nicht-translatierte Sequenz für die *cnb1_S* mRNA sein muss. Der hohe AT-Gehalt dieses Sequenzabschnitts von 78.6% spricht für die Annahme, dass dieser Bereich bei der Translation der *cnb1_S* mRNA Isoform als 5' nicht-translatierte Region dienen könnte.

```

1                               31
ttt tta att tat taa taa aca acc ctt att ttt gca acc aat att tga tta acc aaa aaa
61                               91
aaa aaa acc caa tcc gag att tta gct cca aaa aaa aaa aaa aat aca gca gtt tat aaa
121                              151
aat att att tta ata att aaa aaa aaa aaa aaa acc aca caa caa acc aaa aaa ata aaa
181                               > 211/4
ata aaa ata aaa aaa aaa aaa ATG GGA AAT CAA CAT TCA TTA TTA AAT AAA GAA CAA TTA
                               M G N Q H S L L N K E Q L

241/14      >>                               >>>
GAA CAA ATG AAA GAT AAT AGT AGT TTT TCA GAA GCA GAA CTT AAA AAA TTA TAT AGA AGA
E Q M K D N S S F S E A E L K K L Y R R

301/34                               331/44
TTC CAA ATG TTG GAT AAA GAT GGG TCA GGT ACA TTA ACA ACT GAT GAA TTC TTA TCT ATA
F Q M L D K D G S G T L T T D E F L S I

361/54                               391/64
CCA GAT TTA GCA TTA AAC CCA CTT TTA GAA AGA GTT ATT CAA ATC TTT GAT CAA AAT AAA
P D L A L N P L L E R V I Q I F D Q N K

421/74                               451/84
GAT AAT GAA ATT GAA TTC TCT GAA TTT GTT GGT ACA CTT GCA ACA CTC TCC CAT AAA GGT
D N E I E F S E F V G T L A T L S H K G

481/94                               511/104
ACA AAA GAA GAT AAA TTA AAA TTC CTT TTC CAA ATT TAT GAT ATT GAT TGT GAT GGA TTT
T K E D K L K F L F Q I Y D I D C D G F

541/114                               571/124
ATT AGT AAT GGT GAA TTA TTC CAA GTT TTA AAA ATG ATG GTT GGT ACC AAT TTA AAT GAT
I S N G E L F Q V L K M M V G T N L N D

601/134                               631/144
GTA CAA CTT CAA CAA ATT GTT GAT AAA TCT ATT ATT GAA GGT GAT TAT GAT AAA GAT GGT
V Q L Q Q I V D K S I I E G D Y D K D G

661/154                               691/164      <<
AAA ATT TCA TTT GAT GAA TTC ATT CAT ATG ATT GTT AAT CAA GAA GGA ATA GAA GAA AAA
K I S F D E F I H M I V N Q E G I E E K

721/174                               751
CTT AGC GTA AAT TGG TCA GAA TAA aat aaa ata aaa taa aat tat att aca aaa aaa aaa
L S V N W S E *
781
aaa aaa aaa aaa aaa a

```

Abb. 11: Nukleotid- und übersetzte Aminosäuresequenz der *cnb1_L* cDNA Isoform

Insgesamt fünf unabhängig über PCR erhaltene Calcineurin B Sequenzen, sowie die von der Universität in Tsukuba veröffentlichte Calcineurin B cDNA Sequenz wurden in einem Nukleotid-Sequenzvergleich auf PCR bedingte Fehler überprüft und aneinander angeglichen. Gezeigt ist die korrigierte, endgültige Nukleotidsequenz, sowie die daraus abgeleitete Aminosäuresequenz. Die 3' nicht-translatierte Region wurde der Calcineurin B Sequenz des cDNA Sequenzierprojekts der Universität in Tsukuba entnommen. Translatierte Sequenz ist in Fettdruck dargestellt. Die unterstrichenen Bereiche kennzeichnen die Sequenzabschnitte, die für die vier EF-Hand Calcium-Bindedomänen kodieren. Der vermutete Start der *cnb1_S* cDNA Isoform ist mit (>) gekennzeichnet. (>>) und (<<) begrenzen die Sequenz des rekombinanten Calcineurin B und (>>>) den Beginn der von der Universität in Tsukuba veröffentlichten Calcineurin B Sequenz.

Vergleich der Aminosäuresequenzen von *Dictyostelium Calcineurin B* mit Calcineurin B Sequenzen aus anderen Organismen

Die *cnb1_L* und *cnb1_S* cDNA Sequenzen wurden in die Aminosäuresequenzen übersetzt und mit Calcineurin B Sequenzen aus anderen Organismen verglichen (Tabelle 1 und Abb. 12).

Die Sequenz von *Naegleria gruberi* zeigte mit 77.7% Homologie und 54.4% Identität die größte Übereinstimmung mit der CNB_L Sequenz. *Dictyostelium* Calmodulin wies mit einer Identität von 25.5% und Homologie von 52.2% Werte auf, die im Bereich der bekannten Daten anderer Organismen lagen (Klee & Cohen, 1988).

Ein Sequenzvergleich der CNB_S Isoform (nicht gezeigt) mit diesen Calcineurin B Sequenzen zeigte sehr ähnliche Übereinstimmungen (s. Tabelle 1). Die Aminosäuresequenz von *Naegleria gruberi* wies auch hier die höchste Identität (55.7%) und Homologie (78.8%) auf.

<i>D.discoideum</i>	Identität (%)		Homologie (%)	
	CNB _L	CNB _S	CNB _L	CNB _S
<i>Naegleria gruberi</i>	54.4	55.7	77.7	78.8
<i>Drosophila melanogaster</i>	51.1	52.7	70.6	73.9
<i>Rattus norvegicus</i>	50	53.3	72.7	75.7
<i>Neurospora crassa</i>	50	52.7	71.1	75.2
Human	48.3	52.7	70.6	76.9
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	41.6	46.1	67.7	75.7
Calmodulin (<i>D.discoideum</i>)	25.5	29.1	52.2	57.6

Tabelle 1: Aminosäuresequenzvergleich der CNB_L und CNB_S Calcineurin B Isoformen mit Calcineurin B Sequenzen aus anderen Organismen

Die Sequenzen der Calcineurin B Isoformen CNB_L und CNB_S wurden einzeln mit den Calcineurin B Sequenzen aus anderen Organismen, sowie mit der Calmodulin Sequenz aus *D. discoideum* (Clarke, Bazari & Kayman, 1980) verglichen.

Ein Vergleich der EF-Hand Calcium-Bindedomänen der einzelnen Calcineurin B Sequenzen mit den EF-Hand Domänen der CNB_L Isoform zeigte für die ersten Domänen eine gute Konservierung mit 53% bis 70% Identität und 75% bis 85% Homologie, aber eine weitaus geringere Konservierung für die zweiten Domänen. Diese wiesen lediglich

Identitäten zwischen 30% und 47% und Homologien von 69.2% auf. Am besten konserviert waren die dritten und vierten Calcium-Bindedomänen mit Identitäten zwischen 60% und 93% sowie Homologien zwischen 84% und 93%. Die einzelnen Domänen waren somit sehr viel besser konserviert als die vier Domänen von *Dictyostelium* Calcineurin B zueinander (23% Identität, 46% Homologie).



D.d CNB _L	-----MGNQHSLLNKEQLEQMKDNSS	21
N.g.	-----MGTNTSSLRPEEVEEMQKGTN	21
R.n.	MEQGTDLQSQIFFPTEKNFWKKGKDHFRQNKYPFSRELYNLIFADRKGNESYPLEMCSH	60
Human	-----MGNEASYPLEMCSH	14
D.m.	-----MGNETSLPMDMCSN	14
S.c.	-----MGAAPSKIIVDGLLEDTN	17
N.c.	-----MGNTTSSVDPDNIVQGSN	17
	: :	
D.d CNB _L	FSEAELKKLYRRFQMLDKDGSGLTTTDEFSLIPDLALNPLLERRVIQIFDQNKDNEIEFSE	81
N.g.	FTQKEIKKLYKRFFKLDKDGNGTISKDEFMLIPELAVNPLVKRVISIFDENGDGSVNFKE	81
R.n.	FDADEIKRLGKRFFKLDLNSGSLSVVEEFMSLPQLQONPLVQRVIDIFDTDGNGEVDFKE	120
Human	FDADEIKRLGKRFFKLDLNSGSLSVVEEFMSLPQLQONPLVQRVIDIFDTDGNGEVDFKE	74
D.m.	FDADEIRRLGKRFRKLDLNSGALSIDEFMSLPQLQONPLVQRVIDIFDADGNGEVDFKE	74
S.c.	FDRDEIERLRKRFMKLDRDSSGSIDKNEFMSIPGVSSNPLAGRIMEVFADNSGDVDFQE	77
N.c.	FDREEVDRLRKRFMKLDKDNSGTIEREEFLSLPQISTNPLATRMIAIFDENGGGDVDFQE	77
	* * : * : ** * * * * : : : * : * * * * : : * : : * *	
D.d CNB _L	FVGTLATLSHGKTKEDKLFQIYDIDCDGFISNGELFQVLKMMVGTNLNDVQLQQIVD	141
N.g.	FIAALSVFNAQGDKQRKLEFAFKVYDIDGDGYISNGELFTVLKMMVGNNLSDVQLQQIVD	141
R.n.	FIEGVSQFSVKGDKQKLRFAFRIYDMDKDGYSNGELFQVLKMMVGNNLKDQQLQQIVD	180
Human	FIEGVSQFSVKGDKQKLRFAFRIYDMDKDGYSNGELFQVLKMMVGNNLKDQQLQQIVD	134
D.m.	FIQGVSVRVDKLSKLRFAFRIYDMDNDGYISNGELFQVLKMMVGNNLKDQQLQQIVD	134
S.c.	FITGLSIFSGRGSKDEKLRFAFKIYDIDKDGFIISNGELFIVLKIMVGSNLDDEQLQQIVD	137
N.c.	FVSGLSAFSRKGNKEQKLRFAFKVYDIDRDGYISNGELFIVLKMMVGSNLDQQLQIVD	137
	* : : : * * * * * : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	

D.d CNB _L	KSIIIEGDYDKDGKISFDEFIHMIVNQEGIEEKLSVNWSE	180
N.g.	KTILEADEDGDGKISFEEFAKTL SHQD -LENKMTIRL--	177
R.n.	KTIINADKDGGRISFEEFCAVVGGLD-IHKKMVVDV--	216
Human	KTIINADKDGGRISFEEFCAVVGGLD-IHKKMVVDV--	170
D.m.	KTICFADKDEDGKISFDEFCSVVGNTD-IHKKMVVDV--	170
S.c.	RTIVENDSDGDGRLSFEEFKNAIETTEVAKSLTLQYDV-	175
N.c.	KT <u>IMEADLDKDGKISFEEFTKM</u> VENTDVSMSTLDQF--	174
	::* * * **::**:* :	:

Abb. 12: Vergleich der Aminosäuresequenz der *D. discoideum* CNB_L Isoform mit Calcineurin B Sequenzen aus anderen Organismen

Die Vergleiche der Calcineurin B Sequenzen wurden mit dem Programm "clustalW" durchgeführt (<http://www2.ebi.ac.uk/clustalw/>). **D.d. CNB_L**: *Dictyostelium discoideum*, CNB_L Isoform; **N.g.**: *Naegleria gruberi* (Remillard et al., 1995); **R.n.**: *Rattus norvegicus* (Chang et al., 1994); **D.m.**: *Drosophila melanogaster* X-chromosomal lokalisiertes Gen *dCnB1* (Warren et al., 1996); **S.c.**: *Saccharomyces cerevisiae* (Kuno et al., 1991); **N.c.**: *Neurospora crassa* (Tropschug, 1997). Die Sequenz für humanes Calcineurin B wurde Guerini und Mitarbeiter (1989) entnommen. (*): Identische Aminosäuren; (:): homologe Aminosäuren. Die EF-Hand Calcium-Bindedomänen sind unterstrichen. Der N-Terminus der CNB_S Isoform ist mit einem Pfeil (↓) gekennzeichnet.

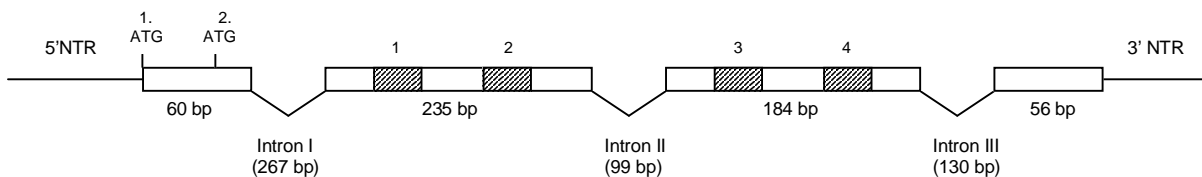
Sequenz und Struktur des Calcineurin B Gens *cnb1*

Das Calcineurin B Gen *cnb1* wurde über einen PCR Ansatz isoliert. Bedingt durch die verwendeten Oligonukleotide wurde die Sequenz ohne die 3' nicht-kodierende Region isoliert. Die Genstruktur ist in Abb. 13 schematisch dargestellt, die *cnb1* Nukleotidsequenz ist auf Seite 111 im Anhang gezeigt.

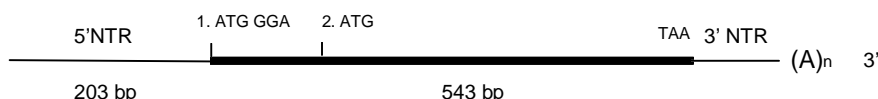
Die Sequenz weist drei Introns mit Längen von 267, 99 und 130 bp auf, die von den *Dictyostelium* Konsensus-Spleißsequenzen am 5' Ende (GTAAGT (A/T)_n) und am 3' Ende ((A/T)_n A/T ATAG) flankiert werden. Im Vergleich zu den 3' Spleißsequenzen weichen die 5' Spleißsequenzen etwas von der beschriebenen Konsensus-Sequenz ab (Csank, Taylor & Martindale, 1990; Grant et al., 1990). Die Längen sowie der durchschnittliche AT-Gehalt der Introns von 92% liegen im Bereich der bekannten Daten von *Dictyostelium* Introns (Csank et al., 1990).

Zusammenfassend kann davon ausgegangen werden, dass es ein einziges Gen (*cnb1*) für Calcineurin B in *Dictyostelium discoideum* gibt, aus dem zwei mRNA Isoformen (*cnb1_S* und *cnb1_L*) und zwei Proteinisoformen (CNB_S und CNB_L) hervorgehen. Die *cnb1_S* mRNA unterscheidet sich lediglich darin von der *cnb1_L* mRNA, dass die 5' nicht-translatierte Sequenz sowie maximal die ersten fünf Nukleotide der *cnb1_L* mRNA fehlen (s. auch Abb. 13).

***cnb1* Gen**



***cnb1_L*-cDNA**



***cnb1_S*-cDNA**



Calcineurin B Proteinisoformen

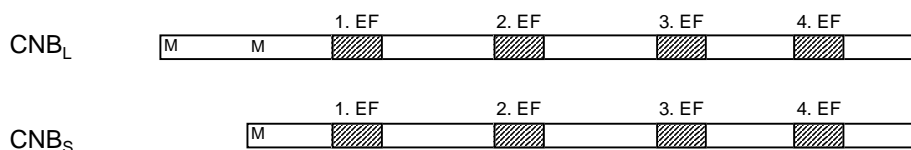


Abb. 13: Schematische Darstellung des *cnb1* Gens, der isolierten Calcineurin B cDNA Isoformen, sowie der daraus resultierenden Proteinisoformen

Die schraffierten Bereiche im *cnb1* Gen stellen die Sequenzabschnitte dar, die auf der mRNA für die EF-Hand Calcium-Bindedomänen (1.-4. EF) kodieren.

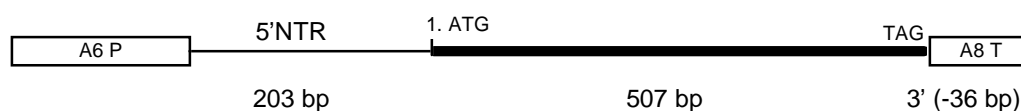
Expression von am 3' Ende verkürzten *cnb1_L* cDNA Isoformen in *Dictyostelium discoideum*

Die bisher erhaltenen Ergebnisse führten zu der Vermutung, dass entweder alternative Promotoren bei der Transkription verwendet werden, oder dass ein völlig anderer Mechanismus für die Entstehung der *cnb1_S* mRNA verantwortlich ist. Die Möglichkeit der Verwendung alternativer Promotoren wurde im folgenden untersucht. Dafür wurde die *cnb1_L* cDNA einmal mit der Calcineurin B-spezifischen 5' nicht-translatierten Region und einmal ohne diese Region in *Dictyostelium* Ax2 Zellen exprimiert.

Die Sequenzvergleiche der cDNA Isoformen sowie die Ergebnisse des Northern Blots ließen vermuten, dass die *cnb1_S* mRNA alternativ dazu auch durch Prozessieren der *cnb1_L* mRNA entstehen könnte. Diese Hypothese wurde gleichzeitig überprüft.

Zwei unterschiedliche Konstrukte wurden hergestellt (Abb. 14). Für das Konstrukt pDNeoll-*cnb1_L*+5' NTR Δ3' wurde die *cnb1_L* cDNA inklusive der 5' nicht-translatierten Region in das Plasmid pDNeoll eingefügt. Die Expression unterlag der Kontrolle des konstitutiv aktiven Aktin 6 Promotors. In der 5' nicht-translatierten Region der *cnb1_L* cDNA Isoform befanden sich in jedem Leseraster mehrere Stopkodons. Dadurch war das erste mögliche Startkodon für die Translation das erste AUG der *cnb1_L* mRNA. Für das zweite Konstrukt pBsrH-*cnb1_L* Δ 5'NTR Δ3' wurde die *cnb1_L* cDNA ohne die 5' nicht-translatierte Region in das Plasmid pBsrH eingebracht. Die Expression unterlag der Kontrolle des Aktin 15 Promotors. Das Plasmid verfügte über kein eigenes Startkodon, so dass das erste mögliche Startkodon bei der Translation ebenfalls das erste AUG der *cnb1_L* mRNA war. Um die zusätzlichen mRNA und Proteinisoformen von den endogenen unterscheiden zu können, wurde die *cnb1_L* cDNA jeweils am 3' Ende um 36 bp verkürzt.

pDNeoll- cnb1_L + 5'NTR Δ3'



pBsrH- cnb1_L Δ5'NTR Δ3'

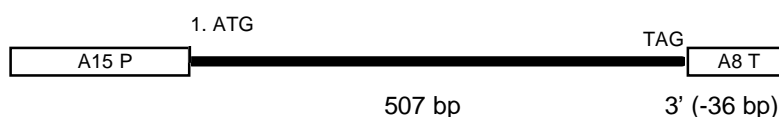


Abb. 14: Schematische Darstellung der Konstrukte pDNeoll-*cnb1_L*+5' NTR Δ3' und pBsrH-*cnb1_L* Δ 5'NTR Δ3'

Die *cnb1_L* cDNA wurde mit bzw. ohne die 5' nicht-translatierte Region und am 3' Ende um 36 bp verkürzt in das Plasmid pDNeoll bzw. pBsrH eingebracht (s. Text). Zur besseren Übersicht sind nur die für die Expression benötigten Abschnitte des jeweiligen Plasmids dargestellt.

Im Vergleich zu Wildtyp Ax2 Zellen (Abb. 15 A, Spur 1 und 2) wurden in Zellen, die das Konstrukt pDNeoll-*cnb1_L*+5' NTR Δ3' erhalten hatten, zusätzlich zu den endogenen, zwei weitere Calcineurin B Proteinisoformen exprimiert (Abb. 15 A, Spur 3 und 4, Pfeile).

Die apparenten Größen dieser zusätzlichen Calcineurin B Isoformen stimmten mit den berechneten Größen von 19.3 und 17.7 kDa überein. Auch wenn das Konstrukt pBsrH-*cnb1_L* Δ5' NTR Δ3' in die Zellen eingebracht worden war, konnten zwei zusätzliche Proteine dieser Größen mit dem Calcineurin B Antiserum detektiert werden (Abb. 15 A, Spur 5 und 6, Pfeile).

In beiden Fällen wurden auch zwei zusätzliche Calcineurin B mRNA Isoformen nachgewiesen. Abb. 15 B zeigt einen Northern Blot, der mit Gesamt-RNA aus Zellen angefertigt wurde, die das Konstrukt pDNeoll-*cnb1_L*+5' NTR Δ3' durch Transformation erhalten hatten. Das Signal der endogenen *cnb1_L* mRNA war nicht detektierbar. Im Fall des Konstruktes pBsrH-*cnb1_L* Δ 5'NTR Δ3' waren die zusätzlichen mRNA Isoformen etwa gleich groß wie die endogenen (nicht gezeigt).

Das Experiment zeigte, dass beide mRNA Isoformen auch unter der Kontrolle eines Aktin Promotors und unabhängig von der An- oder Abwesenheit der Calcineurin B-spezifischen 5' nicht-translatierten Region entstehen können. Dies bedeutet, dass die Calcineurin B mRNA Isoformen nicht durch Verwendung zweier alternativer, Calcineurin B spezifischer Promotoren entstehen. Beide Calcineurin B mRNA Isoformen entstanden zudem, obwohl cDNA exprimiert wurde. Dies zeigt, dass die *cnb1_S* mRNA nicht während des Spleißens entsteht.

Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass die *cnb1_S* mRNA durch einen bisher unbekanntem Mechanismus aus der *cnb1_L* mRNA entsteht. Die Calcineurin B-spezifische 5' nicht-translatierte Region wird nicht für diesen Prozess benötigt. Die gesamte Information für die Prozessierung muss somit auf der translatierten Sequenz der *cnb1_L* cDNA zu finden sein.

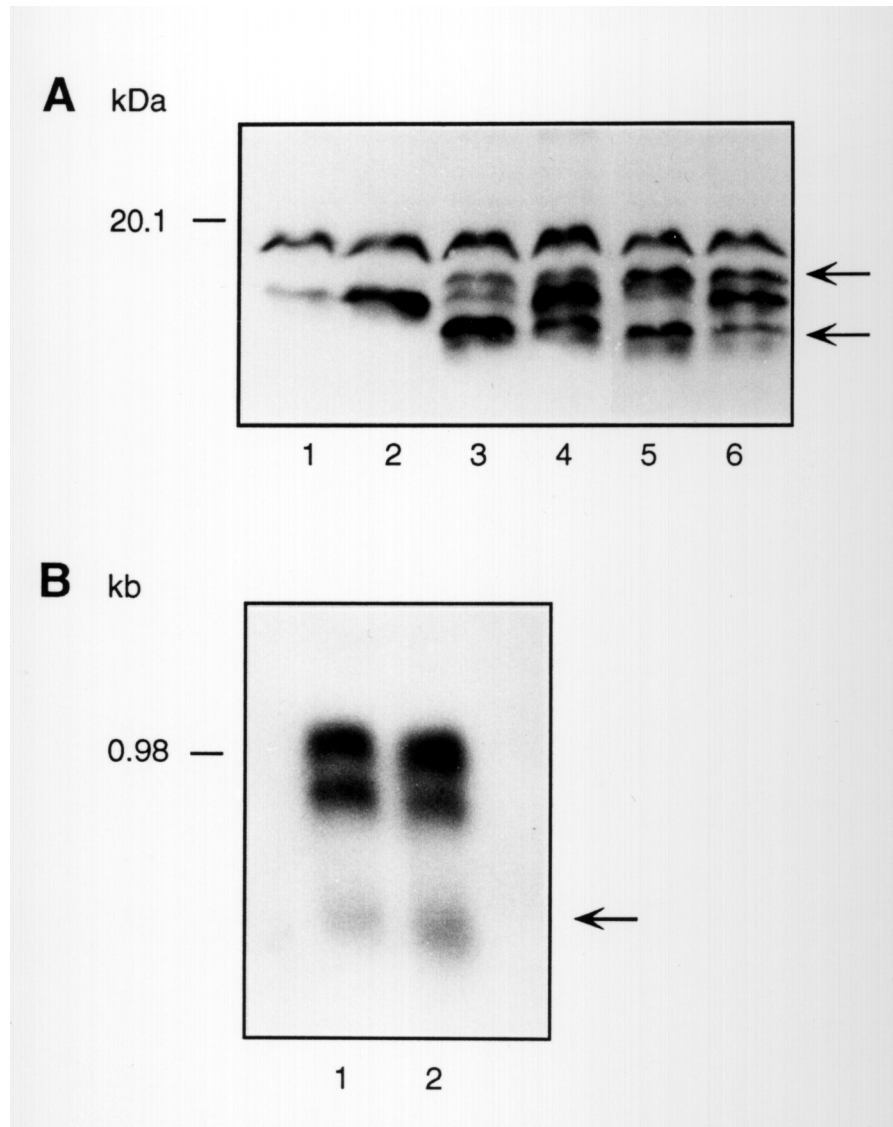


Abb. 15: Expression der *cnb1_L* cDNA Isoform mit oder ohne die 5' nicht-translatierte Region in *Dictyostelium* Ax2 Zellen

In **A** ist ein Western Blot gezeigt. Jeweils 50 µg Zellextrakt wurden auf einem 20%-igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. Die Membran wurde mit 1:5000 verdünntem Calcineurin B Antiserum behandelt. **1** und **2**: Wildtyp Ax2 Zellen, t_0 bzw. t_8 ; **3** und **4**: Wildtyp Ax2 Zellen transformiert mit dem Konstrukt pDNeoll-*cnb1_L*+5' NTR $\Delta 3'$, t_0 bzw. t_8 ; **5** und **6**: Wildtyp Ax2 Zellen transformiert mit dem Konstrukt pBsrH-*cnb1_L* $\Delta 5'$ NTR $\Delta 3'$, t_0 bzw. t_8 . **B** zeigt einen Northern Blot. 30µg Gesamt-RNA von Wildtyp Ax2 Zellen, in die das Konstrukt pDNeoll-*cnb1_L*+5'NTR $\Delta 3'$ eingebracht worden war, wurden auf einem 2%-igen, Formaldehyd-haltigen Agarosegel aufgetrennt und über Kapillarität auf eine Nytran Nitrocellulose-Membran übertragen. Für eine bessere Auftrennung wurde MS-Agarose (Boehringer, Mannheim) verwendet. Der Nachweis der Calcineurin B mRNA Isoformen erfolgte mit einer Digoxigenin-markierten Calcineurin B cDNA-Sonde. **1**: t_0 ; **2**: t_8 . Der Pfeil weist auf die endogene *cnb1_S* mRNA hin.

Einfluss der mRNA Sekundärstruktur auf die Prozessierung der *cnb1_L* mRNA

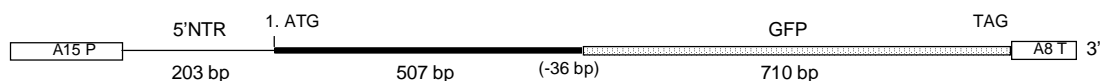
Die Sekundärstruktur einer mRNA ist ein wichtiger Faktor sowohl für ihre Stabilität als auch für ihren Abbau. So benötigen z.B. bestimmte Endonukleasen spezifische mRNA Sekundärstrukturen, um an definierten Stellen schneiden zu können (Higgins, 1991). Im folgenden wurde deshalb untersucht, ob eine Änderung der Sekundärstruktur der *cnb1_L* mRNA einen Einfluss auf das Entstehen der *cnb1_S* mRNA hat.

Fünf verschiedene Konstrukte wurden hergestellt, in denen verschieden lange cDNA-Fragmente des "grün fluoreszierenden Proteins" (GFP) am 3' Ende, am 5' Ende oder innerhalb der *cnb1_L* cDNA im Leseraster eingefügt wurden. Die einzelnen Konstrukte sind zur besseren Übersicht jeweils schematisch dargestellt.

Anfügen von GFP cDNA-Fragmenten an das 3' Ende der *cnb1_L* cDNA

Zwei unterschiedliche Konstrukte wurden hergestellt, in denen die GFP cDNA jeweils an das 3' Ende der *cnb1_L* cDNA angefügt wurde (Abb. 16). Für das Konstrukt pDdA15gfp-*cnb1_L*+5' NTR Δ3' wurde die *cnb1_L* cDNA inklusive der 5' nicht-translatierten Region und am 3' Ende um 36 bp verkürzt in das Plasmid pDdA15gfp eingebracht. Für das zweite Konstrukt pDdA15gfp-*cnb1_L* Δ5' NTR +3' wurde die *cnb1_L* cDNA ohne die 5' nicht-translatierte Region aber mit komplettem 3' Ende ebenfalls in das Plasmid pDdA15gfp eingebracht.

pDdA15gfp- cnb1_L + 5'NTR Δ 3'



pDdA15gfp- cnb1_L Δ 5'NTR + 3'

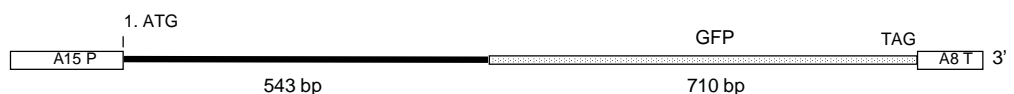


Abb. 16: Schematische Darstellung der Konstrukte pDdA15gfp-*cnb1_L*+5'NTR Δ3' und pDdA15gfp-*cnb1_L* Δ5' NTR +3'

An das 3' Ende der *cnb1_L* cDNA mit bzw. ohne die 5' nicht-translatierte Region wurde ein GFP Fragment angefügt (s. Text). Zur besseren Übersicht sind nur die für die Expression benötigten Abschnitte des jeweiligen Plasmids dargestellt.

Auf einem Northern Blot mit Gesamt-RNA aus *Dictyostelium* Ax2 Zellen, in die das Konstrukt pDdA15gfp-*cnb1_L*+5' NTR Δ3' eingebracht worden war, war sowohl bei t_0 als auch bei t_8 nur eine zusätzliche mRNA detektierbar (Abb. 17 A, Spur 1 und 2). Die apparente

Größe dieser mRNA von 1.6 kb entsprach der erwarteten Größe einer Fusion aus der *cnb1_L* und der GFP mRNA. Die endogenen Calcineurin B mRNA Isoformen waren nur schwach sichtbar (s. Pfeil in Abb. 17 A für die *cnb1_S* mRNA). Bei Behandlung des Blots mit einer Digoxigenin-markierten GFP cDNA-Sonde wurde ebenfalls nur diese mRNA detektiert (Abb. 17 B, Spur 2), die in Wildtyp Ax2 Zellen nicht sichtbar war (Abb. 17 B, Spur 1). Es handelt sich somit um ein spezifisches Signal.

Auch wenn das Konstrukt pDdA15gfp-*cnb1_L* Δ 5' NTR +3' in die Zellen eingebracht wurde, ließ sich sowohl mit der Calcineurin B- als auch mit der GFP-Sonde nur eine zusätzliche mRNA detektieren, die etwas kleiner als 1.6 kb war (Abb. 17 C und D). Diese zusätzliche mRNA war in Wildtyp Ax2 Zellen ebenfalls nicht nachweisbar (Abb. 17 D, Spur 1). Das Anfügen einer GFP cDNA an das 3' Ende der *cnb1_L* mRNA bewirkte somit eine Hemmung der *cnb1_S* mRNA Entstehung. Die Annahme, dass die *cnb1_S* mRNA durch Prozessieren der *cnb1_L* mRNA entsteht, wird dadurch bekräftigt.

In beiden Fällen war auch nur ein einzelnes, ca. 45 kDa großes Fusionsprotein in den Zellen nachweisbar. Während das Fusionsprotein des Konstruktes pDdA15gfp-*cnb1_L* Δ 5' NTR +3' sehr gut in den Zellen exprimiert wurde (Abb. 19 B, Spur 5 und 6), war das Fusionsprotein des Konstruktes pDdA15gfp-*cnb1_L*+5' NTR Δ 3' kaum nachweisbar (Abb. 19 B, Spur 3 und 4). Bei der Bande, die direkt unterhalb der in Abb. 19 B in Spur 4 detektierten Fusionsbande sichtbar ist, kann es sich nicht um das zweite Fusionsprotein handeln, da dieses Protein nicht von einem GFP-Antikörper erkannt wurde (nicht gezeigt).

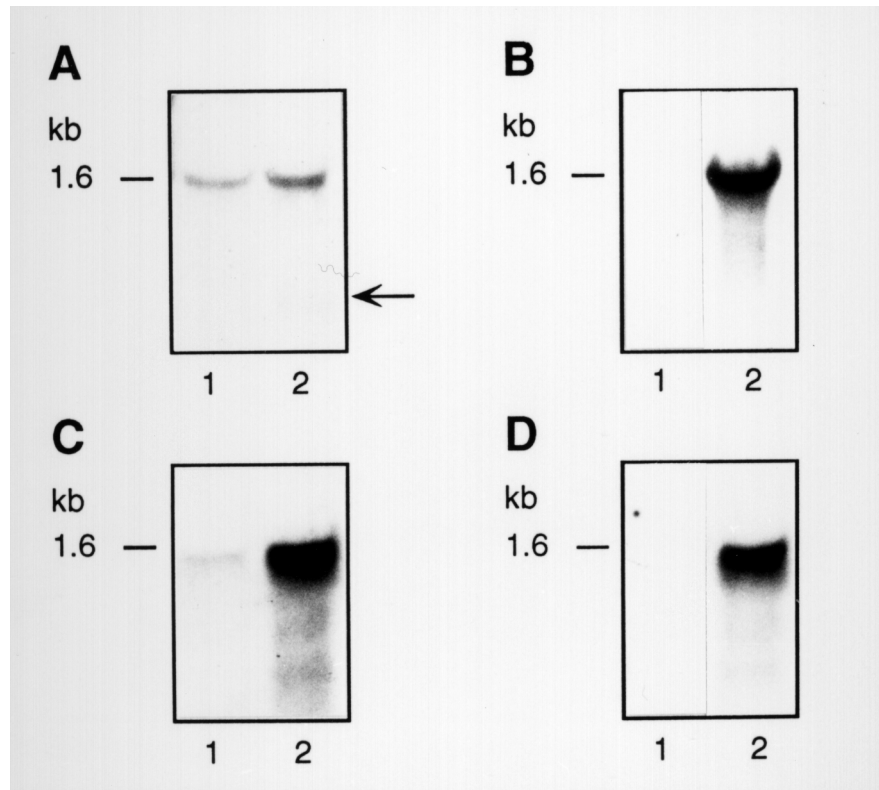


Abb. 17: Northern Blot Analyse von Zellen, die *cnb1_L* cDNAs exprimieren, denen am 3' Ende eine GFP cDNA angefügt wurde

Es sind Northern Blots gezeigt. Jeweils 15 µg Gesamt-RNA wurden auf einem 1.5%-igen Formaldehyd-haltigen Agarosegel aufgetrennt und über Kapillarität auf eine Nytran Nylon-Membran übertragen. Der Nachweis der Calcineurin B mRNA Isoformen erfolgte mit einer Digoxigenin-markierten Calcineurin B cDNA-Sonde (**A und C**) bzw. mit einer Digoxigenin-markierten GFP cDNA-Sonde (**B und D**). Aufgetrennt wurde Gesamt-RNA aus **A 1** und **A 2**: Wildtyp Ax2 Zellen transformiert mit dem Konstrukt pDdA15gfp-*cnb1_L*+5' NTR Δ3', *t*₀ bzw. *t*₈; **B 1**: Wildtyp Ax2 Zellen, *t*₀; **B 2**: Wildtyp Ax2 Zellen transformiert mit dem Konstrukt pDdA15gfp-*cnb1_L*+5' NTR Δ3', *t*₀; **C 1** und **C 2**: Wildtyp Ax2 Zellen transformiert mit dem Konstrukt pDdA15gfp-*cnb1_L* Δ5' NTR + 3', *t*₀ bzw. *t*₈; Die aufgetragenen Gesamt-mRNA Mengen wurden spektrophotometrisch bestimmt und nicht unter Einsatz einer Kontroll-Sonde überprüft. In **C 1** wurde vermutlich weniger Gesamt-RNA aufgetragen als in **C 2**; **D 1**: Wildtyp Ax2 Zellen, *t*₀; **D 2**: Wildtyp Ax2 Zellen transformiert mit dem Konstrukt pDdA15gfp-*cnb1_L* Δ 5' NTR + 3', *t*₀.

Einfügen von GFP cDNA-Fragmenten innerhalb der *cnb1_L* cDNA

Das Anfügen von GFP cDNA-Fragmenten an das 3' Ende der *cnb1_L* mRNA führte zu einer Hemmung der Prozessierung. Im folgenden wurde untersucht, ob die Prozessierbarkeit der *cnb1_L* mRNA von deren Gesamtlänge abhing, oder ob die Position der angefügten GFP-Fragmente ausschlaggebend war. Dafür wurden zwei weitere Konstrukte hergestellt, in denen jeweils ein 417 bp (GFP1) bzw. 720 bp (GFP2) großes

GFP cDNA-Fragment direkt vor die Sequenz für die zweite EF-Hand Calcium-Bindedomäne in das Konstrukt pDNeoll-*cnb1_L*+5' NTR Δ 3' eingefügt wurde (Abb. 18).

pDNeoll-*cnb1_L* + 5'NTR Δ 3' + GFP 1



pDNeoll-*cnb1_L* + 5'NTR Δ 3' + GFP 2

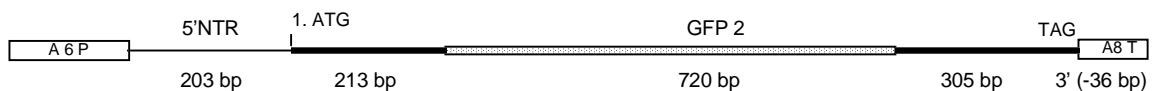


Abb. 18: Schematische Darstellung der Konstrukte pDNeoll-*cnb1_L*+5'NTR Δ 3'+GFP1 und pDNeoll-*cnb1_L*+5'NTR Δ 3'+GFP2

Ein 417 bp bzw. 720 bp großes GFP-Fragment wurde im Leseraster in die *cnb1_L* cDNA eingefügt (s. Text). Zur besseren Übersicht sind nur die für die Expression benötigten Abschnitte des jeweiligen Plasmids dargestellt.

Dictyostelium Zellen, die diese Konstrukte durch Transformation erhalten hatten, wurden auf die Expression der Fusions-mRNA Isoformen untersucht (Abb. 19 A). Bei Behandlung des Northern Blots mit Digoxigenin-markierter GFP-Sonde war in beiden Fällen neben der Fusions-mRNA aus der *cnb1_L* und der GFP mRNA eine zusätzliche kleinere mRNA Isoform erkennbar (Abb. 19 A; Spuren 3-6). Somit fand die Prozessierung in beiden Fällen statt. Im Fall der Fusion mit dem Fragment GFP1 waren zwei zusätzliche mRNAs von ca. 1410 und 1150 Basen sichtbar (Abb. 19 A, Spur 3 und 4, t_0 bzw. t_8). Im Fall der Fusion mit dem Fragment GFP2 konnten ebenfalls zwei zusätzliche mRNA Isoformen von ca. 1720 und 1450 Basen nachgewiesen werden (Abb. 19 A, Spur 5 und 6, t_0 bzw. t_8). Als Kontrolle wurde Gesamt-RNA von Wildtyp Ax2 Zellen aufgetragen. Die von der GFP-Sonde detektierten mRNA Isoformen wurden in Wildtyp Ax2 Zellen nicht detektiert und waren somit spezifisch (Abb. 19 A, Spur 1 und 2, t_0 bzw. t_8).

Eine Behandlung des Blots mit Digoxigenin-markierter Calcineurin B cDNA-Sonde erbrachte dasselbe Ergebnis (Abb. 19 A, Spuren 7-9). Die endogenen Calcineurin B mRNA Isoformen wurden nur schwach detektiert. Zu sehen ist jedoch das verstärkte Auftreten der *cnb1_S* Isoform zum Zeitpunkt t_8 (Abb. 19 A, Spur 9, Pfeil). Sowohl bei dem mit der GFP cDNA-Sonde behandelten Blot als auch bei dem mit der Calcineurin B cDNA-Sonde behandelten Blot war sichtbar, dass die kleine Fusions-mRNA zum Zeitpunkt t_8 stärker

vorhanden war als zum Zeitpunkt t_0 . Dies entsprach der Regulation der endogenen *cnb1_S* mRNA. Im Gegensatz zur Regulation der endogenen *cnb1_L* mRNA wurde die Fusions-mRNA aus der *cnb1_L* mRNA und der GFP1 bzw. GFP2 mRNA zum Zeitpunkt t_8 genauso gut wie zum Zeitpunkt t_0 detektiert. Dies lässt sich dadurch erklären, dass sich die Transkription unter der Kontrolle eines konstitutiv aktiven Aktin Promotors und nicht unter der Kontrolle des Calcineurin B Promotors befand.

Auf Proteinebene war zusätzlich zu den endogenen Isoformen jeweils nur ein Fusionsprotein von ca. 30 kDa (Abb. 19 B, Spur 7 und 8: Fusion mit GFP1) bzw. 45 kDa (Abb. 19 B, Spur 9 und 10: Fusion mit GFP2) erkennbar. In Abb. 19 B ist sichtbar, dass die Expression beider Fusionsproteine entwicklungsabhängig verstärkt wurde. Dies lässt vermuten, dass hier die Fusionsproteine aus CNB_S und GFP1 bzw. -2 erkennbar sind. Die Expression des Fusionsproteins aus CNB_L und GFP1 bzw. -2 war eventuell nur schwach oder das Protein war instabil. Eine weitere Möglichkeit ist, dass die beiden Fusionsproteine aufgrund des geringen Größenunterschieds von 2 kDa nicht aufgetrennt wurden.

Abb. 19: Northern und Western Blot Analyse von Zellen, die Konstrukte erhalten hatten, in denen GFP cDNA-Fragmente an verschiedene Bereiche der *cnb1_L* cDNA angefügt worden waren

A zeigt Northern Blots mit Gesamt-RNA von Zellen, die *cnb1_L* cDNAs exprimieren, in die unterschiedlich große GFP cDNA-Fragmente eingefügt worden waren. Jeweils 15 µg Gesamt-RNA wurden auf einem 1.5%-igen Formaldehyd-haltigen Agarosegel aufgetrennt und über Kapillarität auf eine Nytran Nylon-Membran übertragen. Der Nachweis der Fusions-mRNA Isoformen erfolgte mit einer Digoxigenin-markierten GFP cDNA-Sonde (**1-6**) bzw. mit einer Digoxigenin-markierten Calcineurin B cDNA-Sonde (**7-9**). Aufgetrennt wurde Gesamt-RNA aus: **1** und **2**: Wildtyp Ax2 Zellen, t_0 bzw. t_8 ; **3** und **4**: Wildtyp Ax2 Zellen transformiert mit dem Konstrukt pDNeoll-*cnb1_L*+5' NTR Δ 3'-GFP1, t_0 bzw. t_8 ; **5** und **6**: Wildtyp Ax2 Zellen transformiert mit dem Konstrukt pDNeoll-*cnb1_L*+5' NTR Δ 3'-GFP2, t_0 bzw. t_8 ; **7** und **9**: Wildtyp Ax2 Zellen transformiert mit dem Konstrukt pDNeoll-*cnb1_L*+5' NTR Δ 3'-GFP1, t_0 bzw. t_8 ; **8**: Wildtyp Ax2 Zellen transformiert mit dem Konstrukt pDNeoll-*cnb1_L*+5' NTR Δ 3'-GFP2, t_0 . Die auf den Blots sichtbare ca. 2 kb große mRNA wurde sowohl von der Calcineurin B- als auch von der GFP-Sonde detektiert. Vermutlich handelt es sich um eine sehr prominente mRNA, an die die cDNA-Sonden unspezifisch binden. **B** zeigt einen Western Blot. Jeweils 50 µg Gesamtprotein wurden auf einem 15%-igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf eine Protran Nitrocellulose-Membran übertragen. Der Blot wurde mit 1:250 verdünntem, affinitätsgereinigtem Calcineurin B Antiserum behandelt. **1** und **2**: Wildtyp Ax2 Zellen, t_0 bzw. t_8 ; **3** und **4**: Wildtyp Ax2 Zellen transformiert mit dem Konstrukt pDdA15 gfp-*cnb1_L*+5' NTR Δ 3', t_0 bzw. t_8 ; **5** und **6**: Wildtyp Ax2 Zellen transformiert mit dem Konstrukt pDdA15 gfp-*cnb1_L* Δ 5'NTR +3', t_0 bzw. t_8 ; **7** und **8**: Wildtyp Ax2 Zellen transformiert mit dem Konstrukt pDNeoll-*cnb1_L*+5'NTR Δ 3'-GFP1, t_0 bzw. t_8 ; **9** und **10**: Wildtyp Ax2 Zellen transformiert mit dem Konstrukt pDNeoll-*cnb1_L*+5'NTR Δ 3'-GFP2, t_0 bzw. t_8 .

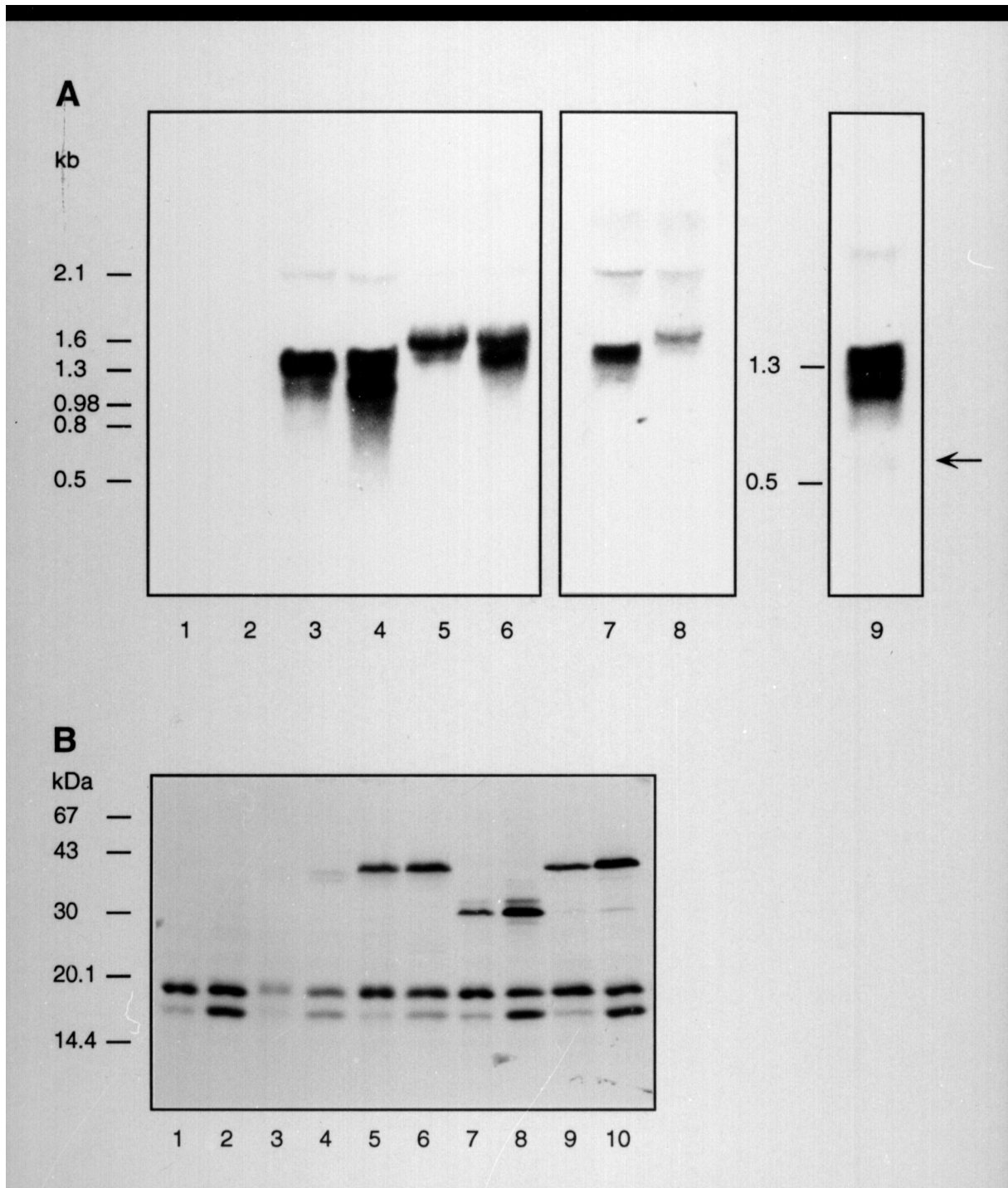


Abb. 19: Northern und Western Blot Analyse von Zellen, die Konstrukte erhalten hatten, in denen GFP cDNA-Fragmente an verschiedene Bereiche der *cnb1_L* cDNA angefügt worden waren
(Legende s. Seite 82)

Anfügen eines GFP cDNA-Fragments an das 5' Ende der *cnb1_L* cDNA

Im folgenden Experiment wurde untersucht, welchen Einfluss translatierte anstelle von nicht-translatierter Sequenz vor dem ersten AUG der *cnb1_L* mRNA auf die Prozessierung dieser mRNA hat. Dafür wurde anstelle der Calcineurin B 5' nicht-translatierten Region eine GFP cDNA an das 5' Ende der *cnb1_L* cDNA angefügt. Im Fall der Prozessierung dieser Fusions-mRNA würde eine zusätzliche mRNA entstehen, welche dieselbe Größe hätte wie die endogene *cnb1_S* mRNA. Um die zusätzliche mRNA von der endogenen unterscheiden zu können, wurde deshalb die zu klonierende *cnb1_L* cDNA am 3' Ende um 36 bp verkürzt. Bei einer Prozessierung der Fusions-mRNA waren somit zusätzlich zu den endogenen Calcineurin B mRNA Isoformen zwei mRNAs von ca. 1.6 und 0.7 kb zu erwarten. Das Konstrukt pDNeogfp-*cnb1_L* Δ 5'NTR Δ 3' ist in Abb. 20 schematisch dargestellt.

pDNeogfp-*cnb1_L* Δ 5'NTR Δ 3'

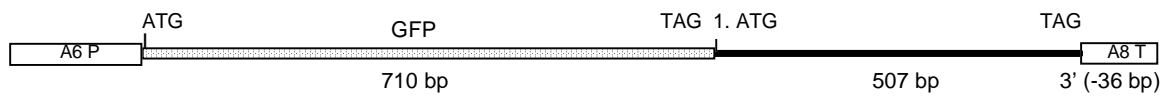


Abb. 20: Schematische Darstellung des Konstrukts pDNeogfp-*cnb1_L* Δ 5'NTR Δ 3'

Anstelle der Calcineurin B-spezifischen 5' nicht-translatierten Sequenz wurde ein GFP cDNA Fragment an das 5' Ende der *cnb1_L* cDNA angefügt (s. Text). Zur besseren Übersicht sind nur die für die Expression benötigten Abschnitte des Plasmids dargestellt.

Die mRNA Expression von Zellen, in die dieses Konstrukt eingebracht worden war, ist in Abb. 21 A gezeigt. Bei Behandlung des Northern Blots mit Digoxigenin-markierter Calcineurin B cDNA-Sonde war in Proben der Zeitpunkte t_0 und t_8 nur eine zusätzliche mRNA detektierbar, die mit ca. 1.6 kb die erwartete Größe der Fusion aus der *cnb1_L* und der GFP mRNA hatte (Abb. 21 A, Spur 2 und 3). Bei einer Prozessierung dieser mRNA sollte die daraus entstehende kleine mRNA in etwa die Größe der endogenen *cnb1_S* mRNA haben (s. Pfeil). Zum Zeitpunkt t_0 war jedoch keine mRNA dieser Größe detektierbar. Zum Zeitpunkt t_8 war sowohl in Wildtyp Ax2, als auch in den transformierten Zellen nur die endogene *cnb1_S* mRNA detektierbar (Abb. 21 A, Spur 1 und 3, Pfeil). Dies bedeutet, dass durch das Anfügen einer GFP mRNA an das 5' Ende der *cnb1_L* mRNA die Prozessierung ebenfalls gehemmt wird.

Bedingt durch die verwendete Klonierungsstelle im Plasmid pDNeogfp befand sich am 3' Ende der GFP cDNA ein Stopkodon. Falls die Fusions-mRNA prozessiert würde, sollte deshalb nur das von der prozessierten Fusions-mRNA abstammende Protein von ca. 16.5 kDa mit Calcineurin B Antiserum detektierbar sein. Abb. 21 B zeigt, dass in Zellen, die das Konstrukt pDNeogfp-*cnb1_L* Δ 5'NTR Δ 3' erhalten hatten, kein Protein dieser Größe exprimiert wurde (Abb. 21 B, Spur 2, t_0). Ein Protein dieser Größe war auch zum Entwicklungszeitpunkt t_8 nicht nachweisbar (nicht gezeigt). Dieses Ergebnis bestätigt, dass bei einer Fusion der GFP mRNA an das 5' Ende der *cnb1_L* mRNA die Prozessierung gehemmt wird.

Als Vergleich wurde Extrakt von Wildtyp Ax2 Zellen (Abb. 21 B; Spur 1), sowie eine Probe der Zellen aufgetragen, die mit dem Konstrukt pDNeoll-*cnb1_L*+5' NTR Δ3' transformiert worden waren. In diesen Zellen wurde als zweites, zusätzliches Protein ebenfalls ein 16.5 kDa großes Protein exprimiert (Abb. 21 B, Spur K, Pfeil und Abb. 15 A auf S. 77).

Abb. 21: Northern und Western Blot Analyse von Zellen, welche eine *cnb1_L* cDNA exprimierten, der am 5' Ende eine GFP cDNA angefügt worden war

In **A** ist ein Northern Blot gezeigt, der mit einer Digoxigenin-markierten Calcineurin B cDNA-Sonde behandelt wurde. Jeweils 15 µg Gesamt-RNA wurden auf einem 1.5%-igen, Formaldehydhaltigen Agarosegel aufgetrennt und über Kapillarität auf eine Nytran Nylon-Membran übertragen.

1: Wildtyp Ax2, t_8 ; **2** und **3:** Wildtyp Ax2 Zellen transformiert mit dem Konstrukt pDNeogfp-*cnb1_L* Δ 5' NTR Δ 3', t_0 bzw. t_8 . **B** zeigt einen Western Blot. Jeweils 50 µg Gesamtprotein wurden auf einem 20%-igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und für den nachfolgenden Western Blot auf eine Protran Nitrocellulose-Membran übertragen. Der Blot wurde mit 1:6000 verdünntem Calcineurin B Antiserum behandelt. **1:** Wildtyp Ax2 Zellen, t_0 ; **2:** Wildtyp Ax2 Zellen, transformiert mit dem Konstrukt pDNeogfp-*cnb1_L* Δ 5' NTR Δ 3', t_0 ; **K:** Wildtyp Ax2 Zellen, transformiert mit dem Konstrukt pDNeoll-*cnb1_L*+5' NTR Δ 3', t_0 .

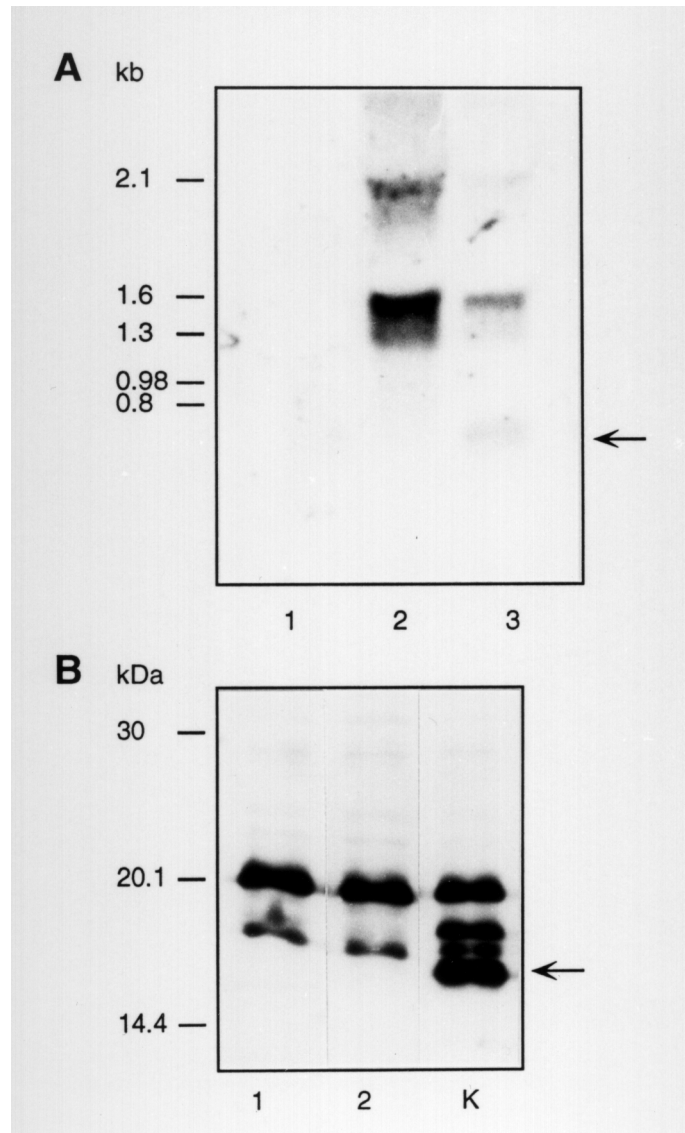


Abb. 21: Northern und Western Blot Analyse von Zellen, welche eine *cnb1_L* cDNA exprimierten, der am 5' Ende eine GFP cDNA angefügt worden war (Legende s. Seite 85)

Vergleich der mRNA Sekundärstrukturen

Die Experimente zeigten, dass durch eine Veränderung der Sekundärstruktur der *cnb1_L* mRNA die Prozessierung beeinflusst werden konnte. Die mRNA Sekundärstrukturen wurden deshalb mit dem Programm "mfold" (Version 2.3) von Zuker und Turner (Washington University, School of Medicine, St. Louis, USA) bei Standardbedingungen von 1 M NaCl und 23° C berechnet und verglichen.

Sekundärstruktur der *cnb1_L* mRNA

Die mRNA Sekundärstruktur der *cnb1_L* mRNA wurde inklusive der 5' und 3' nicht-translatierten Sequenzen berechnet. Bei der 3' nicht-translatierten Sequenz handelte es sich um die prozessierte und polyadenylierte Form. Das verwendete Programm berechnet für eine mRNA immer mehrere mögliche Sekundärstrukturen, die unterschiedliche freie Energien (dG) aufweisen. Die Sekundärstruktur ist umso stabiler, je niedriger der Wert der freien Energie ist. Die für die Sekundärstrukturen der *cnb1_L* mRNA erhaltenen Werte der freien Energien waren sehr ähnlich. Die Sekundärstrukturen unterschieden sich z.T. jedoch erheblich voneinander. Abb. 22 zeigt die stabilste Sekundärstruktur dieser mRNA unter den angegebenen Standardbedingungen. Bei dieser Struktur handelt es sich zudem um die auffälligste der möglichen Strukturen. Die Berechnungen ergaben in ca. der Hälfte aller Fälle diese Struktur. Direkt vor dem Startkodon (s. Pfeil) bildet die Calcineurin B 5' nicht-translatierte Region einen linearen Einzelstrangbereich in Form einer großen "Schlaufe" aus. Weiterhin hybridisiert die Region bei 570 Basen, die im Protein für die Sequenz "..QVLKMM.." kodiert, direkt mit dem Bereich des Startkodons.

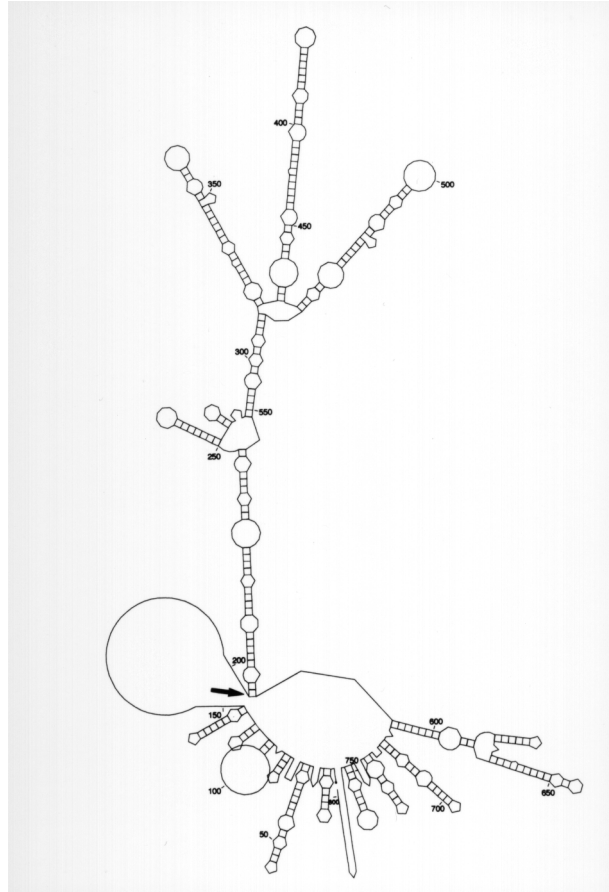


Abb. 22: Sekundärstruktur der *cnb1_L* mRNA Isoform

Die mRNA Sekundärstruktur wurde bei Standardbedingungen von 1 M NaCl und 23° C mit dem Programm "mfold" Version 2.3 von Zuker und Turner (Washington University, School of Medicine, St. Louis, USA) berechnet. Die stabilste Sekundärstruktur der *cnb1_L* mRNA mit 5' und 3' nicht-translatierter Region ist gezeigt. Die 3' nicht-translatierte Sequenz wurde der Calcineurin B Sequenz des cDNA Sequenzierprojekts der Universität Tsukuba entnommen. Die Position des ersten AUG Kodons der Sequenz ist mit einem Pfeil gekennzeichnet.

Vergleich der mRNA Sekundärstrukturen der von den verschiedenen Konstrukten abstammenden mRNAs mit der Sekundärstruktur der *cnb1_L* mRNA

Die Sekundärstrukturen der verschiedenen Konstrukte wurden inklusive der nicht-translatierten Bereiche der Aktin Promotoren und Terminatoren berechnet. Die translatierten Aktin 6 und Aktin 15 Promotorbereiche wurden der Arbeit von Hori und Mitarbeiter (1994) entnommen. Die Poly(A) Schwänze von neu synthetisierten *Dictyostelium* mRNAs verfügen im Durchschnitt über 110-115 Adenine, deren Länge sich durch Alterung der mRNA auf ca. 65 Adenine verkürzt (Palatnik, Storti & Jacobson, 1979; 1980; 1981). Um eine theoretisch

prozessierte und polyadenylierte Aktin 8 Terminator Sequenz zu erhalten, wurde deshalb an die Polyadenylierungsstelle der Aktin 8 Terminator Sequenz (McKeown et al., 1982) eine Kette von 70 Adeninen angefügt.

Auch die berechneten Sekundärstrukturen der von den verschiedenen Konstrukten abstammenden mRNAs unterschieden sich z.T. erheblich voneinander. Auffallend war jedoch, dass die prägnante Struktur der stabilsten *cnb1_L* mRNA Sekundärstruktur (Abb. 22), neben weiteren Strukturen auch bei denjenigen mRNAs auftrat, bei denen die Prozessierung stattfand. Diese Sekundärstruktur bildete sich im Fall der mRNAs, bei denen die GFP mRNA am 3' oder 5' Ende angefügt worden war, nicht aus. Diese mRNAs wurden auch nicht prozessiert. Auch bei der am 3' Ende verkürzten mRNA des Konstrukts pDNeoll-*cnb1_L+5' NTR Δ3'* trat diese Struktur auf. Im Fall der am 3' Ende verkürzten mRNA des Konstrukts pBsrH-*cnb1_L Δ 5'NTR Δ3'* wurde ebenfalls eine sehr ähnliche Struktur vorausgesagt.

Die mRNA Sekundärstrukturvorhersagen sowie die Ergebnisse der Northern Blots ließen den Schluss zu, dass die Sekundärstruktur der Calcineurin B mRNA einen Anteil an dem Prozessierungsmechanismus hat. Es muss allerdings bedacht werden, dass die Berechnungen unter der Annahme durchgeführt wurden, dass sich die mRNA in 1 M NaCl und in Abwesenheit möglicher RNA-Bindeproteine befand. Deshalb können sich die Strukturen *in vivo* von den berechneten Strukturen unterscheiden.

Calcineurin B Expression in verschiedenen zellulären Schleimpilzen

Um Aufschluss über die Entstehung des Prozessierungsmechanismus zu erhalten, wurde die Calcineurin B Expression in verschiedenen Spezies von zellulären Schleimpilzen untersucht. In Abb. 23 ist zu sehen, dass nicht in allen der untersuchten Schleimpilzarten beide Calcineurin B Isoformen exprimiert werden. Neben *Dictyostelium firmibasis*, *Dictyostelium purpureum* und *Dictyostelium mucoroides* (Abb. 23 Spur 2, 3 bzw. 6) zeigten auch *Dictyostelium sphaerocephalum*, *Dictyostelium dimigraphorum* und *Dictyostelium citrinum* zwei Calcineurin B Proteinisoformen derselben Größe, wie die in *Dictyostelium discoideum* Ax2 detektierten Calcineurin B Isoformen (D.d. Ax2 in Abb. 23 Spur 1, andere sind nicht gezeigt). In *Dictyostelium minutum* wurde hingegen nur ein einzelnes Calcineurin B Protein von ca. 20.5 kDa exprimiert (Abb. 23, Spur 4). Auch in *Polysphondylium*

violaceum wurde nur ein Calcineurin B Protein exprimiert, welches etwas kleiner als die CNB_L Isoform war (Abb. 23, Spur 5).

Dieser Western Blot zeigte, dass die Prozessierung der *cnb1_L* mRNA Isoform spezifisch nur in bestimmten *Dictyostelium* Arten stattfindet. In *Dictyostelium minutum* ebenso wie in *Polysphondylium violaceum*, die evolutiv betrachtet beide weiter von den anderen *Dictyostelium* Arten entfernt sind (R. Mutzel, persönliche Mitteilung), scheint dieser Mechanismus nicht vorhanden zu sein.

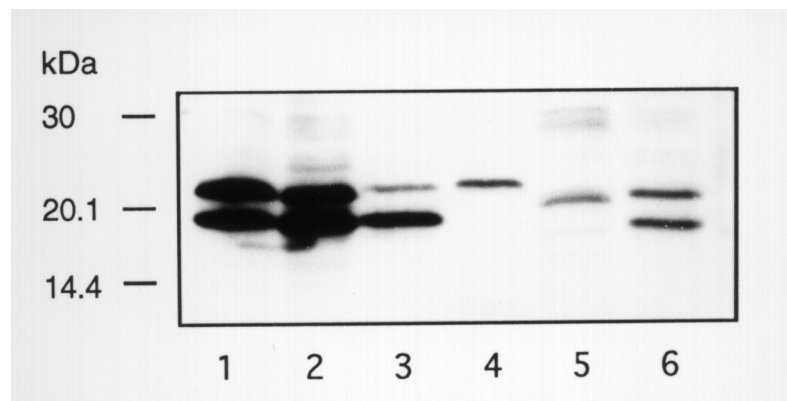


Abb. 23: Calcineurin B Expression in verschiedenen zellulären Schleimpilzen

Die Extrakte der verschiedenen Schleimpilze wurden von kulminierenden Zellen hergestellt und freundlicherweise von A. Bäuerle überlassen. Abgesehen von *Dictyostelium discoideum* Ax2 Zellen wurden jeweils 40 µl Zellextrakt auf einem 15%-igen SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und für den anschließenden Western Blot auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. Die Membran wurde mit 1:6000 verdünntem Calcineurin B Antiserum behandelt. **1:** 50 µg Gesamtprotein aus *D. discoideum* Ax2 Zellen, t₈; **2:** *D. firmibasis*; **3:** *D. purpureum*; **4:** *D. minutum*; **5:** *Polysphondylium violaceum*; **6:** *D. mucoroides*

Versuche zur Überexpression von Calcineurin B

Dictyostelium Zellen, die Calcineurin A überproduzieren, weisen bezüglich des Wachstums und der Entwicklung keinen veränderten Phänotyp auf (Hellstern et al., 1997). Dies lässt sich dadurch erklären, dass Calcineurin B für die spezifische Substraterkennung erforderlich ist und Calcineurin A allein nicht die Substrate erkennt. Um einen Einblick in die Funktion von Calcineurin in *Dictyostelium* zu erhalten, wurde deshalb versucht Mutanten herzustellen, die sowohl Calcineurin A als auch Calcineurin B überproduzieren.

Expression der kompletten Calcineurin B cDNA Isoformen in Wildtyp Ax2 und in Calcineurin A überproduzierenden Zellen

In den Calcineurin A überproduzierenden Stamm Tr E1 (Hellstern et al., 1997) wurden nachträglich die Konstrukte pHEX-*cnb1_S* bzw. pHEX-*cnb1_L* eingebracht. Die Zelllinien wurden als CNOP A+CNB_S und CNOP A+CNB_L bezeichnet. Zur Kontrolle wurden Tr E1 Zellen mit dem "leeren" Plasmid transformiert. Eine im Vergleich zu den Kontrollzellen verstärkte Expression der CNB_S oder CNB_L Isoform konnte jedoch in keiner der Zelllinien nachgewiesen werden (Abb. 24 A), obwohl die Zellen weiterhin Calcineurin A überproduzierten (nicht gezeigt). Eine Überprüfung der cDNA Sequenzen zeigte keine PCR bedingten Fehler, die zu einem verfrühten Abbruch der Translation geführt haben könnten. Möglicherweise erzeugte die verstärkte Expression der kompletten Calcineurin B Isoformen einen hohen Selektionsdruck, so dass nur solche Zellen selektioniert wurden, die keine verstärkte Expression von Calcineurin B aufwiesen.

Expression eines N- und C-terminal verkürzten Calcineurin B

Da eine Überexpression der kompletten Calcineurin B Proteinisoformen nicht stattfand, wurde untersucht, ob stattdessen ein N- und C-terminal verkürztes Calcineurin B in den Zellen exprimiert wird. Dafür wurde ein Calcineurin B cDNA Fragment (Nukleotide 247-705) in das *Dictyostelium* Expressionsplasmid pBsrH eingebracht. *Dictyostelium* Ax2 Zellen sowie der Calcineurin A überproduzierende Stamm Tr E1 (Hellstern et al., 1997) wurden mit diesem Konstrukt (pBsrH-CNB) transformiert und ihr Phänotyp während der Entwicklung untersucht. Die erhaltenen Zelllinien wurden als Ax2-CNB und CNOP A+B bezeichnet. Als Vergleichszellen dienten Ax2 bzw. Tr E1 Zellen, die mit dem "leeren" Plasmid transformiert worden waren.

Die Expression des verkürzten, ca. 16 kDa großen Calcineurin B, fand statt (Abb. 24 B). Dies zeigte, dass *Dictyostelium* Zellen, wie bei der Translation der *cnb1_S* mRNA angenommen, das erste AUG der *cnb1_S* mRNA bei der Translation als Initiationskodon verwenden können. Die exprimierte Proteinmenge war im Vergleich zu den endogenen Mengen jedoch nicht sehr groß und entsprach sowohl in den Ax2-CNB Zellen (Abb. 24, Spur 1) als auch in den CNOP A+B Zellen (Abb. 24, Spur 2) ungefähr der Menge der exprimierten CNB_L Isoform. Im Verlauf der Differenzierung wiesen beide Zelltypen im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollzellen jedoch keinen veränderten Phänotyp auf (nicht gezeigt).

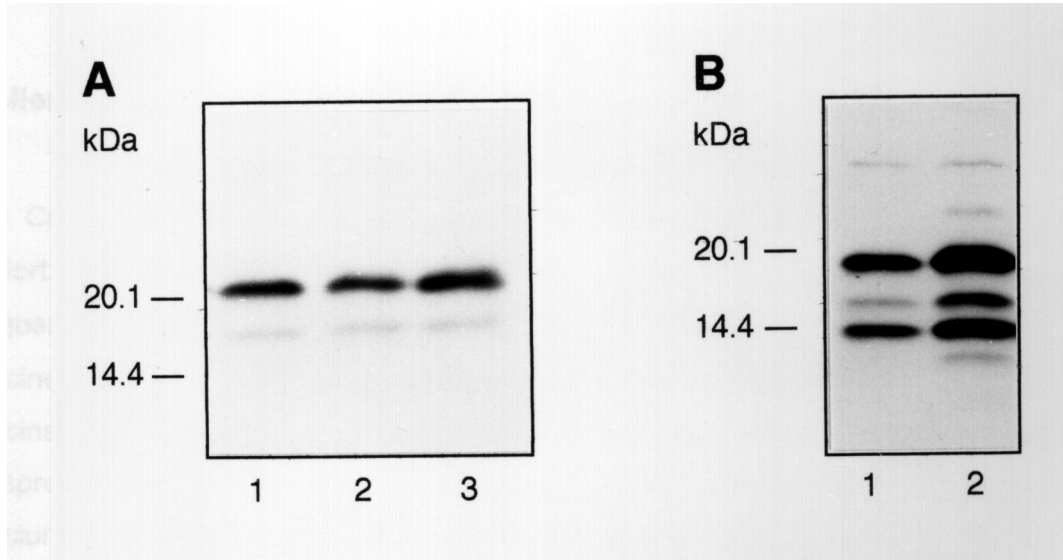


Abb. 24: Versuche zur Überexpression von Calcineurin B in *Dictyostelium* Ax2 und Tr E1 Zellen

In *Dictyostelium* Ax2 bzw. Tr E1 Zellen wurden die Konstrukte pBsrH-CNB, pHEX-*cnb1_S* bzw. pHEX-*cnb1_L* eingebracht. Je 50 µg Gesamtprotein von vegetativen Zellen (t_0) wurde auf 15%igen SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt und für die nachfolgenden Western Blots auf Nitrocellulose-Membranen übertragen. Die Membranen wurden jeweils mit 1:5000 verdünntem Calcineurin B Antiserum behandelt. Die Größen der Molekulargewichtsstandards sind jeweils links angezeichnet. **A:** 1: *Dictyostelium* Ax2; 2: CNOP A+CNB_S; 3: CNOP A+CNB_L; **B:** 1: Ax2-CNB; 2: CNOP A+B.

Diskussion

Isolierung des Calcineurin B Gens sowie der cDNA Isoformen

Über einen PCR Ansatz mit zwei Calcineurin B-spezifischen Oligonukleotiden wurde das Calcineurin B Gen *cnb1* inklusive der 5', aber ohne die 3' nicht-kodierende Region isoliert. Die abgeleitete Aminosäuresequenz zeigte große Homologie zu Calcineurin B Sequenzen anderer Organismen. Die größte Homologie und Sequenzidentität wurde zu Calcineurin B aus *Naegleria gruberi* festgestellt. Die EF-Hand Calcium-Bindedomänen der Calcineurin B Proteine der verschiedenen Organismen wiesen mehr Homologie zu den entsprechenden Domänen von *Dictyostelium* Calcineurin B auf als die vier EF-Hand Calcium-Bindedomänen von Calcineurin B untereinander.

Southern Blots bestätigten, dass *Dictyostelium discoideum* Ax2 Zellen über ein einziges Calcineurin B Gen verfügen. Drei Introns mit Längen von 267, 99 und 130 bp sind in der Sequenz vorhanden, die von 5' und 3' Konsensus-Spleißsequenzen (Csank et al., 1990; Grant et al., 1990) flankiert werden. Das erste Intron trennt den 5' Bereich von der Sequenz ab, die für die erste und zweite EF-Hand Calcium-Bindedomäne kodiert. Das zweite Intron befindet sich zwischen den ersten beiden EF-Hand Domänen und dem Bereich, der für die dritte und vierte EF-Hand Calcium-Bindedomäne kodiert. Das dritte Intron der *cnb1* Sequenz liegt nahe des 3' Endes des *cnb1* Gens.

Auch die Calcineurin B Gene anderer Organismen weisen ein oder mehrere Introns auf. Vor allem die Position des ersten Introns der *cnb1* Sequenz ist sehr gut konserviert, was auf eine wichtige Funktion dieses Introns hindeutet. Dieses Intron ist an dieser Position auch im Calcineurin B Gen *CNB1* aus *Naegleria gruberi* (Remillard et al., 1995), *dCnB2* aus *Drosophila melanogaster* (Warren et al., 1996) sowie im einzigen Calcineurin B Gen aus *Saccharomyces cerevisiae* (Cyert & Thorner, 1992) und aus humanem Gewebe (Wang et al., 1996) vorhanden.

Zwei Calcineurin B cDNA Isoformen von ca. 600 und 800 bp wurden mit dem 5' RACE System isoliert und als *cnb1_s* (S=small) bzw. *cnb1_L* (L=large) cDNA Isoform bezeichnet (s. auch S. 98). Die isolierte *cnb1_L* cDNA verfügt über eine 203 bp lange 5' nicht-translatierte Region sowie über eine 543 bp lange translatierte Sequenz. Die 3' nicht-translatierte Sequenz wurde aufgrund der bei der PCR eingesetzten Oligonukleotide nicht isoliert. Die translatierte Sequenz der *cnb1_L* cDNA entspricht der kodierenden Sequenz des

cnb1 Gens. Der Bereich um das erste ATG der *cnb1_L* cDNA weist eine sehr starke Konsensus-Sequenz für die Initiation der Translation auf (Kozak, 1986).

Reinigung und biochemische Charakterisierung von Calcineurin B

Ein Calcineurin B cDNA Abschnitt (Nukleotide 250-705) wurde in das *E. coli* Expressionsplasmid pQE30 eingebracht. Ausgehend von diesem Konstrukt wurde in *E. coli* Zellen ein Calcineurin B Fusionsprotein mit 6 N-terminalen Histidinen exprimiert. Die Proteinreinigung des N- und C-terminal verkürzten Proteins, welches alle vier EF-Hand Calcium-Bindedomänen sowie die vermutete Bindestelle für Calcineurin A enthielt (Watanabe, Perrino & Soderling, 1996), erfolgte über eine einstufige Affinitätschromatographie an einer Ni²⁺-NTA Matrix. Die Reinigung war mit ca. 3 mg Protein pro Liter Zellkultur sehr effizient und bis auf ein kontaminierendes Protein von ca. 40 kDa sauber. Das unter denaturierenden Bedingungen gereinigte und daraufhin renaturierte Calcineurin B wurde für die Herstellung von Antiserum verwendet und auf biochemischer Ebene charakterisiert.

Bindung des Calcineurin Holoenzym an Calmodulin-Sepharose 4B und an eine Ni²⁺-NTA Matrix

Nach Mischen von rekombinantem Calcineurin B mit *Dictyostelium* Calcineurin A und anschließender Inkubation mit Calmodulin-Sepharose 4B oder einer Ni²⁺-NTA Matrix eluierten in beiden Fällen beide Untereinheiten gemeinsam von der Säule. Dies bedeutet, dass sich ein Calcineurin-Holoenzym ausgebildet hatte, welches sowohl über die Calmodulin-Bindestelle von Calcineurin A an Calmodulin-Sepharose 4B als auch über den Histidin-"Tag" von Calcineurin B an die Ni²⁺-NTA Matrix binden konnte. Die Interaktion von Calcineurin B mit Calcineurin A war zudem sehr stark und konnte auch in Anwesenheit von 1 M NaCl im Waschpuffer nicht aufgelöst werden.

Abgeleitet von Daten für Rattenhirn Calcineurin B liegt der vermutete Interaktionsbereich von *Dictyostelium* Calcineurin B mit der katalytischen Untereinheit Calcineurin A in einem hydrophoben Bereich um die Aminosäuren Valin₁₂₂ und Leucin₁₂₃, zwischen der dritten und vierten EF-Hand Calcium-Bindedomäne (Watanabe et al., 1996) (die Positionsangaben der Aminosäuren beziehen sich dabei auf die *Dictyostelium* CNB_L Isoform). Der N-terminale Histidin-"Tag" maskierte offensichtlich weder diesen Bereich, noch störte er die korrekte Faltung des Proteins.

Calcineurin B erhöht die Phosphataseaktivität gegenüber dem R_{II} Phosphopeptid, nicht jedoch gegenüber pNPP

In Phosphatasetests mit dem chromogenen Substrat pNPP steigerte Calcineurin B die Basalaktivität von *Dictyostelium* Calcineurin A nur geringfügig. Dies ist auch für rekombinantes Ratten Calcineurin A gezeigt worden (Perrino et al., 1992). Die Calmodulin-stimulierte Aktivität von Calcineurin A erhöhte sich in Anwesenheit von Calcineurin B ebenfalls nur 1.2-fach. Diese geringe Steigerung der Calmodulin-stimulierten *Dictyostelium* Calcineurin A Aktivität durch rekombinantes *Dictyostelium* Calcineurin B zeigt, dass *Dictyostelium* Calcineurin A das Substrat pNPP unabhängig von der Calcineurin B Untereinheit erkannte. Bei Phosphatasetests mit Säuger Calcineurin A wird im Vergleich hierzu eine 4-fache Steigerung der Calmodulin-stimulierten Aktivität in Anwesenheit von Calcineurin B beschrieben (Perrino et al., 1992).

Bei Verwendung des für Rinder Calcineurin spezifischen R_{II} Phosphopeptidsubstrats (Blumenthal et al., 1986) konnte hingegen eine deutliche Steigerung der Aktivität durch Zugabe von Calcineurin B gemessen werden. Im Vergleich zum chromogenen Substrat pNPP handelt es sich bei dem R_{II} Phosphopeptid für *Dictyostelium* Calcineurin ebenso wie für Säuger Calcineurin um ein recht spezifisches *in vitro* Substrat. Bei Einsatz dieses Substrats erhöhte Calcineurin B die Basalaktivität von Calcineurin A bereits um den Faktor 13. Auch die Calmodulin-stimulierte Aktivität von Calcineurin A wurde in Anwesenheit von Calcineurin B 9.2-fach erhöht. Diese Werte liegen im gleichen Bereich wie die für Säuger Calcineurin bekannten Daten (Perrino et al., 1992).

Die Calmodulin-stimulierte Aktivität des Holoenzym gegenüber dem R_{II} Phosphopeptid betrug im Vergleich zur Aktivität gegenüber dem chromogenen Substrat pNPP nur 0.9%. Gleiche Beobachtungen wurden auch für rekombinantes *Neurospora crassa* Calcineurin A gemacht (Higuchi et al., 1991).

Entwicklungsabhängige Regulation der Calcineurin B Expression

Die entwicklungsabhängige Calcineurin B Expression wurde sowohl auf der Ebene der Transkription als auch auf der Ebene der Translation untersucht.

Antiserum gegen rekombinantes *Dictyostelium* Calcineurin B erkannte in rohem Extrakt von Wildtyp Ax2 Zellen zwei Proteine mit apparenten Größen von 18 und 20.5 kDa. Diese Calcineurin B Isoformen wurden als CNB_S und CNB_L Isoformen bezeichnet. Im

Gegensatz zur CNB_L Isoform, deren Expression in vegetativen und in differenzierenden Zellen konstant blieb, war die Expression der CNB_S Isoform deutlich entwicklungsabhängig reguliert. In vegetativen Zellen und in Zellen zu Beginn der Entwicklung war nur eine geringe CNB_S Menge in den Zellen nachweisbar. Mit Beginn der Aggregation nach ca. 6-8 h Entwicklungszeit nahm die Expression stark zu und blieb bis zum Ende der Differenzierung auf hohem Niveau.

Übereinstimmend mit dieser Beobachtung wurden auf einem Northern Blot mit Gesamt-RNA aus *Dictyostelium Ax2* Zellen zwei Calcineurin B mRNA Isoformen (*cnb1_S* und *cnb1_L*) mit ca. 700 und 1000 Basen nachgewiesen. Als Größenstandard für den Northern Blot wurde ein DNA Marker verwendet, da sich dieser im Vergleich zu einem RNA Marker auf einem Formaldehyd-haltigen Gel deutlicher auftrennt. Da die elektrophoretische Mobilität von DNA in Formaldehyd-haltigen Agarosegelen größer als die von RNA ist (Sambrook et al., 1989), sind die Calcineurin B mRNA Isoformen *in vivo* vermutlich etwas kleiner als 700 und 1000 Basen. Die berechneten Größen der von diesen beiden mRNA Isoformen abstammenden Proteine entsprechen den apparenten Größen der auf einem Western Blot detektierten Proteine CNB_S und CNB_L. Daraus wurde geschlossen, dass die beiden Proteine das Produkt dieser mRNA Isoformen sind.

Die Expression der mRNA Isoformen war ebenfalls entwicklungsabhängig reguliert. In vegetativen Zellen waren gleiche Mengen beider Isoformen vorhanden. Die Abnahme der *cnb1_L* mRNA ging einher mit einer Zunahme der *cnb1_S* mRNA. Die *cnb1_L* mRNA war ab dem Beginn der Aggregation (ab ca. 6-8 h der Entwicklung) bis zur Ausbildung fester Aggregate (ab ca. 12 h) nicht mehr nachweisbar. Gleichzeitig nahm die Menge der *cnb1_S* mRNA stark zu. Im weiteren Verlauf der Differenzierung war die *cnb1_L* mRNA erst wieder mit abnehmender *cnb1_S* mRNA Menge detektierbar und beide Isoformen lagen bei der Ausbildung der Fruchtkörper wieder in ungefähr denselben Mengen wie in vegetativen Zellen vor. Daraus wurde abgeleitet, dass die *cnb1_S* mRNA aus der *cnb1_L* mRNA entstehen muss.

Obwohl die *cnb1_L* mRNA zwischen 6 und 12 h der Entwicklung nicht detektierbar war, war die CNB_L Isoform in konstanten Mengen über den gesamten Verlauf der Entwicklung in den Zellen vorhanden. Im Fall der *cnb1_S* mRNA korrelierte der Anstieg der mRNA Menge mit der verstärkten Expression der CNB_S Isoform zu Beginn der Aggregation. Während die *cnb1_S* mRNA jedoch gegen Ende der Differenzierung wieder abnahm, blieb die CNB_S Menge ab dem Zeitpunkt der Aggregation auf hohem Niveau. Dies zeigt, dass beide Proteine sehr stabil sind.

Der Nachweis von zwei Calcineurin B mRNA Isoformen spricht gegen die Möglichkeit, dass die CNB_S Isoform durch eine posttranslationale Modifikation aus der CNB_L Isoform entsteht. Die Beobachtung, dass zwischen 6 und 12 h der Differenzierung die *cnb1_L* mRNA nicht nachweisbar war, die Menge des CNB_L Proteins aber konstant blieb, spricht ebenfalls gegen diese Möglichkeit. Wenn die CNB_S Isoform durch Proteolyse der CNB_L Isoform entstehen würde, so müsste die CNB_L Menge mit zunehmender CNB_S Menge abnehmen, da eine Neusynthese des Proteins aufgrund der geringen *cnb1_L* mRNA Menge nicht ausreichend gewährleistet wäre. Für den Nachweis, dass nicht eine N-terminale Proteolyse der CNB_L Isoform für das Entstehen der CNB_S Isoform verantwortlich ist, sondern dass die CNB_S Isoform auch dann entsteht, wenn die CNB_L Isoform nicht exprimiert wird, ist folgendes Experiment geplant. Zellen, die das Konstrukt pDNeoll-*cnb1_L*+5'NTR Δ3' erhalten hatten, exprimierten zusätzlich zu den endogenen, zwei weitere mRNA und Proteinisofomen (s. Abb. 15 auf S. 77 der Ergebnisse und nächster Abschnitt). In dieses Konstrukt wird zwischen dem ersten und zweiten ATG ein Stopkodon (TAA) eingefügt (Abb. 25).

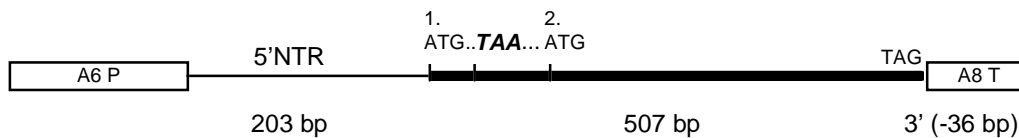


Abb. 25: Schematische Darstellung des Konstrukts pDNeoll-*cnb1_L*+5'NTR Δ3' (+TAA)

In die *cnb1_L* cDNA soll zwischen das erste und zweite ATG der Sequenz ein artifizielles Stopkodon im offenen Leseraster eingefügt werden (s. Text). Zur besseren Übersicht sind nur die für die Expression relevanten Bereiche des Konstrukts gezeigt.

Voraussetzung ist, dass dieses Stopkodon nicht die Prozessierung der *cnb1_L* mRNA stört und dass zusätzlich zu den endogenen, auch in diesem Fall zwei zusätzliche mRNA Isoformen entstehen. Auf einem Western Blot sollte jedoch nur die zusätzliche CNB_S Isoform nachweisbar sein, da die CNB_L Isoform aufgrund des Stopkodons nicht exprimiert werden kann. Dies würde bestätigen, dass die CNB_S Isoform nicht durch Proteolyse der CNB_L Isoform entsteht.

Die Calcineurin B cDNA Isoformen unterscheiden sich nur am 5' Ende

Um zu klären, durch welchen Mechanismus ausgehend von einem Gen zwei mRNA und Proteinisofomen entstehen, wurden die cDNA Isoformen mittels 5' RACE isoliert. Die

Sequenzanalyse ergab, dass sich die beiden cDNAs lediglich am 5' Ende unterscheiden. Der *cnb1_S* cDNA fehlen im Vergleich zur *cnb1_L* cDNA maximal die ersten fünf Nukleotide der translatierten Sequenz sowie die 5' nicht-translatierte Region. Die gesamte restliche Sequenz ist identisch. Alle isolierten *cnb1_S* cDNAs wiesen immer das zweite, aber nie das erste ATG der *cnb1* Gensequenz auf. Dies führte zu dem Schluss, dass es sich bei der *cnb1_S* cDNA um eine verkürzte Form der *cnb1_L* cDNA handelt. Die Beobachtung, dass mit abnehmender *cnb1_L* mRNA Menge die *cnb1_S* mRNA Menge zunahm, unterstützt diese Vermutung ebenfalls. Um dies zu überprüfen, wurden zwei Konstrukte (pDNeoll-*cnb1_L*+5'NTR Δ3' und pBsrH-*cnb1_L* Δ5'NTR Δ3') hergestellt und in *Dictyostelium Ax2* Zellen eingebracht. Die Konstrukte enthielten die am 3' Ende verkürzte *cnb1_L* cDNA mit oder ohne die 5' nicht-translatierte Region. Dies erlaubte gleichzeitig, den Einfluss dieser Region auf das Erscheinen der *cnb1_S* mRNA und der CNB_S Isoform zu untersuchen. Die Expression unterlag der Kontrolle des Aktin 6 bzw. Aktin 15 Promotors. Die translatierten Bereiche der Aktin-Promotoren zeigen keine Übereinstimmungen mit der 5' nicht-translatierten Region der *cnb1_L* mRNA. Daraus wurde geschlossen, dass die Aktin Promotoren nicht die Funktion des Calcineurin B Promotors in Bezug auf das Entstehen der *cnb1_S* mRNA übernehmen können.

In beiden Fällen ließen sich zusätzlich zu den endogenen Calcineurin B mRNA und Proteinisoformen jeweils zwei weitere Isoformen mit den erwarteten Größen nachweisen. Diese Ergebnisse lassen folgende Schlüsse zu:

- 1.) Die *cnb1_S* mRNA entsteht durch das Prozessieren der reifen *cnb1_L* mRNA
- 2.) Die 5' nicht-translatierte Region der *cnb1_L* mRNA ist nicht an diesem Mechanismus beteiligt. Die Prozessierung findet auch in Anwesenheit einer Aktin-spezifischen 5' nicht-translatierten Region statt.
- 3.) Die gesamte Information für die Prozessierung und somit für das Entstehen der *cnb1_S* mRNA ist auf der translatierten Sequenz der *cnb1_L* mRNA zu finden.

Das erste mögliche Startkodon der *cnb1_S* mRNA ist das zweite ATG der kodierenden Sequenz des *cnb1* Gens. Die Konsensus-Sequenz für die Initiation der Translation ist mit einem Cytosin an Position -3 und einem Adenin an Position +4 suboptimal. Das zweite AUG der *cnb1_S* Sequenz weist ebenfalls keine optimale Konsensus-Sequenz auf. Zwei Gründe sprechen dafür, dass das erste AUG der *cnb1_S* mRNA auch das Startkodon dieser mRNA ist:

- Die CNB_S Isoform hat eine apparente Größe von ca. 18 kDa. Bei einem Translationsstart am ersten AUG der *cnb1_S* Sequenz ist ein Protein von 18.9 kDa zu erwarten, beim Start am zweiten AUG ein Protein von nur 16.5 kDa.

- Laut der "scanning"-Hypothese bindet die 40S ribosomale Untereinheit an die 7-Methyl-Guanosin-Kappe am 5' Ende der mRNA und wandert dann stromabwärts in Richtung 3' Ende, bis sie auf das erste AUG Kodon stößt. Befindet sich das Kodon innerhalb einer guten Konsensus-Sequenz für die Initiation der Translation, so lagert sich die 60S ribosomale Untereinheit an, das AUG wird als Startkodon festgelegt und die Translation startet (Übersicht in (Kozak, 1989) und (Kozak, 1999)). Da das zweite AUG keine bessere Konsensus-Sequenz als das erste AUG aufweist, wird davon ausgegangen, dass es sich beim ersten AUG der *cnb1_S* Sequenz auch um das Startkodon dieser mRNA handelt. Dass dieses AUG als Startkodon von *Dictyostelium* Zellen akzeptiert wird, wurde gezeigt. Das Konstrukt pBsrH-CNB, welches für die Überexpression des N- und C-terminal verkürzten Calcineurin B in Ax2 Zellen eingebracht worden war, enthielt die *cnb1_S* cDNA ab diesem ATG und war am 3' Ende um 36 bp verkürzt. Das Protein wurde exprimiert und wies die erwartete Größe von 16 kDa auf. Somit kann zu den oben genannten Schlussfolgerungen eine weitere hinzugefügt werden:

4.) Der Bereich zwischen dem ersten und zweiten ATG der *cnb1* Sequenz ist im Fall der *cnb1_L* mRNA translatierte Sequenz. Bei der *cnb1_S* mRNA handelt es sich jedoch um 5' nicht-translatierte Sequenz.

Während sich das Startkodon der *cnb1_L* mRNA innerhalb einer sehr guten Konsensus-Sequenz für die Initiation der Translation befindet, weist das Startkodon der *cnb1_S* mRNA nur eine suboptimale Konsensus-Sequenz auf. Dadurch ist erklärbar, dass in vegetativen Zellen viel weniger CNB_S als CNB_L Isoform vorhanden ist, obwohl beide mRNA Isoformen in vergleichbaren Mengen vorhanden sind.

Ein neuer Mechanismus der mRNA Prozessierung?

Die erhaltenen Daten sprechen für einen ungewöhnlichen Mechanismus der mRNA Prozessierung. Um die Hypothese zu unterstützen, dass keiner der herkömmlichen Mechanismen, wie die Verwendung alternativer Promotoren bei der Transkription, interne Initiation der Translation, Spleißen der *cnb1_L* mRNA, eine Prozessierung des 5' Bereichs

der *cnb1_L* mRNA mit Beteiligung des Poly(A) Schwanzes oder mRNA Degradation für das Entstehen der *cnb1_S* mRNA verantwortlich ist, werden diese im folgenden diskutiert.

1) Verwendung alternativer Promotoren

Durch die Verwendung von alternativen Promotoren können ausgehend von einem Gen mehrere mRNA Isoformen entstehen. Dies wäre im vorliegenden Fall denkbar, kann aber aufgrund der experimentellen Daten ausgeschlossen werden. Im Konstrukt pBsrH-*cnb1_L Δ5'NTR Δ3'* war die *cnb1_L* cDNA ohne die 5' nicht-translatierte Region ab dem ersten ATG der Sequenz enthalten. Die Expression unterlag der Kontrolle des Aktin 15 Promotors. In *Dictyostelium Ax2* Zellen, die dieses Konstrukt erhalten hatten, wurden zusätzlich zu den endogenen zwei weitere mRNA und Proteinisoformen nachgewiesen. Die *cnb1_S* mRNA entstand also, obwohl die Transkription hier nicht dem Calcineurin B Promotor unterlag und obwohl die Calcineurin B-spezifische 5' nicht-translatierte Region gegen die Aktin 15-spezifische 5' nicht-translatierte Region ausgetauscht worden war. Wie bereits diskutiert, weisen diese Regionen keine Sequenzhomologien zueinander auf. Dies zeigt, dass der Prozessierungsmechanismus unabhängig vom verwendeten Promotor stattfindet.

2) Interne Initiation der Translation

Bei interner Initiation der Translation entstehen ausgehend von einer mRNA durch die Verwendung unterschiedlicher Startkodons mehrere Proteinisoformen. Zwei Gründe sprechen dagegen, dass dieser Mechanismus für das Entstehen der beiden Isoformen verantwortlich ist:

- 1.) Dieser Mechanismus geht von nur einer mRNA aus. Im vorliegenden Fall wurden aber zwei Calcineurin B mRNA Isoformen nachgewiesen. Die berechneten Molekulargewichte der von diesen mRNA Isoformen abstammenden Proteine stimmen zudem mit den auf einem Western Blot detektierten Calcineurin B Isoformen überein, so dass davon ausgegangen wird, dass die Proteine von diesen beiden mRNAs abstammen.
- 2.) Verschiedene GFP cDNA-Fragmente wurden an unterschiedliche Bereiche der *cnb1_L* cDNA angefügt und die resultierenden Konstrukte in *Dictyostelium Ax2* Zellen eingebracht. Nicht in allen Fällen wurden zwei zusätzliche mRNA Isoformen nachgewiesen. Interne Initiation hätte aber auch bei den *cnb1_L* mRNAs stattfinden müssen, denen am 3' Ende ein GFP-Fragment angefügt worden war.

3) Spleißen, alternatives Spleißen und autokatalytisches Spleißen

Die isolierte *cnb1* Gensequenz weist drei Introns auf, die in der *cnb1_L* cDNA nicht vorhanden sind. Spleißen des primären Transkripts findet somit statt. Konstitutives Spleißen, durch das alle Introns entfernt werden, erzeugt nur die *cnb1_L* mRNA, nicht aber die *cnb1_S* mRNA. Die experimentellen Daten sprechen ebenfalls gegen diesen Mechanismus. Die in *Dictyostelium Ax2* eingebrachten Konstrukte enthielten Calcineurin B cDNA, die aus bereits gespleißter mRNA revers transkribiert worden war. Trotzdem wurden in fast allen Fällen zusätzlich zu den endogenen zwei weitere mRNA Isoformen nachgewiesen. Dies zeigt, dass die *cnb1_S* mRNA nach dem Spleißen entstehen muss.

Die folgenden Gründe sprechen auch gegen alternatives und autokatalytisches Spleißen. Wenn die *cnb1_S* mRNA durch alternatives Spleißen entstehen würde, müsste ein Intron direkt nach dem ersten ATG der *cnb1* Sequenz vorhanden sein. Dann wäre es möglich, dass das erste AUG Kodon als Exon entfernt wird ("exon scipping"). An dieser Position befindet sich jedoch kein Intron. Zusätzlich kann ausgeschlossen werden, dass das gesamte erste Exon durch alternatives Spleißen entfernt wird, da sich die *cnb1_S* mRNA maximal in den ersten fünf Nukleotiden von der Sequenz der *cnb1_L* mRNA unterscheidet. Das erste Exon der *cnb1* Sequenz umfasst aber 60 Nukleotide. Zudem müsste in beiden Fällen am 5' Ende der *cnb1_S* mRNA nicht-translatierte Sequenz der *cnb1_L* mRNA vorhanden sein.

Die *cnb1_S* mRNA könnte auch durch die Verwendung einer alternativen 3' Spleißstelle beim Entfernen eines 5' nicht-kodierenden Exon entstehen. Dies wird z.B. für die Calcineurin B mRNA Isoform CNB α 2 im Hodengewebe von Ratten vermutet (Chang et al., 1994). Dagegen spricht folgender Befund: Die Prozessierung der *cnb1_L* mRNA fand auch dann statt, wenn anstelle der Calcineurin B-spezifischen 5' nicht-translatierten Region eine Aktin-spezifische 5' nicht-translatierte Region vorhanden war (Konstrukt pBsrH *cnb1_L* Δ 5' NTR Δ 3'). Auch in diesem Fall hätte zudem nicht-translatierte Sequenz der *cnb1_L* mRNA am 5' Ende der *cnb1_S* mRNA vorhanden sein müssen.

Gegen autokatalytisches Spleißen spricht, dass das Erscheinen der *cnb1_S* mRNA vom Entwicklungsstand der Zellen abhängig war. Da bei diesem Spleißmechanismus keine Proteine beteiligt sind, sollte dieser Mechanismus aber konstitutiv sein.

4) Einfluss des Poly(A) Schwanzes

Reife mRNAs verfügen am 3' Ende über einen Poly(A) Schwanz, der bei *Dictyostelium* mRNAs ca. 65 Basen lang ist (Palatnik et al., 1979, 1980, 1981). Ein

"spezieller" Poly(A) Schwanz könnte unter Zuhilfenahme weiterer Faktoren, an der 5' Prozessierung der *cnb1_L* mRNA und somit an der Entstehung der *cnb1_S* mRNA beteiligt sein. Dagegen spricht jedoch folgender Befund. Sämtliche Calcineurin B Konstrukte, die in *Dictyostelium* Zellen eingebracht wurden, verfügten über einen Aktin 8 Terminator und die mRNAs somit über eine 3' nicht-translatierte Region, die spezifisch für Aktin 8, aber nicht für Calcineurin B war. Wenn ein unspezifischer Poly(A) Schwanz allein schon ausreichen sollte, hätten die mRNAs aller Konstrukte prozessiert werden müssen. Dies war aber nicht der Fall. mRNAs, die am 3' oder am 5' Ende die GFP mRNA angefügt hatten, wurden nicht prozessiert.

5) Gezielte Degradation der *cnb1_L* mRNA

Zwei Hauptwege der mRNA Degradation sind in Eukaryonten beschrieben. Einer der beiden Mechanismen ist abhängig vom Entfernen des Poly(A) Schwanzes, der andere ("nonsense-mediated mRNA decay") findet unabhängig davon statt.

Das schrittweise Verkürzen des Poly(A) Schwanzes und das anschließende Entfernen der 7-Methyl-Guanosin-Kappe vom 5' Ende der mRNA ist ein Signal des deadenylierungsabhängigen mRNA Abbaus (Tuite, 1996). Ein darauffolgender 5'→3' exonukleolytischer Abbau könnte die 5' nicht-translatierte Region der *cnb1_L* mRNA, sowie mindestens die Nukleotide A und U an Position +1 und +2 entfernen. Ein partieller Abbau wäre hierfür gefordert. Unter der Annahme, dass der Mechanismus des "nonsense-mediated mRNA decay" zur Entstehung der *cnb1_S* mRNA führt, hätte die *cnb1_S* mRNA zwar einen Poly(A) Schwanz, die Degradation am 5' Ende dürfte aber ebenfalls nur partiell sein. Die beschriebenen mRNA Abbauwege führen aber immer zu einem vollständigen mRNA Abbau. Außerdem wird in beiden Fällen die 7-Methyl-Guanosin-Kappe entfernt. Untersuchungen von Dottin und Mitarbeiter (1976) zeigen, dass auch *Dictyostelium* mRNAs über eine 7-Methyl-Guanosin-Kappe am 5' Ende verfügen, die geringe Unterschiede zu den Kappen von Säuger mRNAs aufweisen. Die erhaltenen Daten sprechen dafür, dass die Translation der *cnb1_S* mRNA stattfindet. Deshalb muss diese mRNA über eine Kappe am 5' Ende verfügen, da eine Initiation der Translation ohne Beteiligung der 7-Methyl-Guanosin-Kappe nur bei Prokaryonten und Picorna-Viren, wie z. B. dem Polio-Virus beschrieben ist (Übersicht in (Kozak, 1999)). Zudem ist degradierte RNA auf einem Gel als "Schmier" sichtbar. Beide Calcineurin B mRNA Isoformen waren im Northern Blot jedoch als definierte Banden sichtbar, die nicht diffus ineinander übergingen. Diese Gründe sprechen gegen die

Möglichkeit, dass die *cnb1_S* mRNA durch einen herkömmlichen mRNA-Degradationsmechanismus entsteht.

Mögliche Faktoren des *cnb1_L* mRNA Prozessierungsmechanismus

Herkömmliche Mechanismen, die für die Entstehung mehrerer mRNA Isoformen ausgehend von einem Gen in Frage kommen, können aufgrund der experimentellen Daten ausgeschlossen werden. Für die Entstehung der *cnb1_S* mRNA muss ein gezielter, partieller Abbau der *cnb1_L* mRNA gefordert werden, aus dem eine funktionelle mRNA hervorgeht. Dieser Mechanismus muss zudem entwicklungsabhängig reguliert sein.

1) Ist die Prozessierung der *cnb1_L* mRNA an die Translation gekoppelt?

Der partielle Abbau der β° -thalassämischen β -Globin mRNAs ähnelt dem Mechanismus der *cnb1_S* mRNA Entstehung. Wie in der Einleitung beschrieben, entstehen hier ausgehend von einer fehlerhaften mRNA drei kleinere mRNA Zwischenformen, die sich durch unterschiedlich lange 5' Bereiche unterscheiden. Wie im Fall der Calcineurin B *cnb1_S* mRNA Isoform wird davon ausgegangen, dass die kleineren β -Globin mRNA Zwischenformen aus der großen mRNA entstehen, da die kleineren mRNA Abbauprodukte zunehmen, wenn die Menge der großen mRNA abnimmt (Lim et al., 1989).

Die β -Globin mRNA Abbauprodukte besitzen sowohl eine 7-Methyl-Guanosin-Kappe (Lim & Maquat, 1992) als auch einen Poly(A) Schwanz (Lim et al., 1989). Diese Kriterien müssen auch für die *cnb1_S* mRNA erfüllt sein. Im Gegensatz zur *cnb1_S* mRNA wird im Fall der β -Globin mRNA Abbauprodukte jedoch angenommen, dass diese nicht translatiert werden (Lim & Maquat, 1992). Die *cnb1_S* mRNA könnte die 7-Methyl-Guanosin-Kappe während des Prozessierungsmechanismus durch eine Art Spleißen oder nach deren *de novo* Synthese im Cytoplasma erhalten, wie es für die β -Globin mRNA Abbauprodukte vermutet wird (Lim & Maquat, 1992).

Lim und Mitarbeiter (1989; 1992) gehen davon aus, dass die Entstehung der kleineren mRNAs abhängig ist von der unvollständigen Translation der β° -thalassämischen β -Globin mRNA, da die kleinen Transkripte nur im Cytoplasma, aber nie im Kern nachweisbar sind. In *Dictyostelium discoideum* scheinen Transkription und Translation räumlich nicht deutlich voneinander abgegrenzt zu sein. Mangiarotti (1999) zeigt, dass in den Zellkernen von *Dictyostelium discoideum* Ribosomen vorhanden sind, die aktiv Protein synthetisieren. Weiterhin findet der bereits diskutierte "nonsense-mediated mRNA decay" in *Dictyostelium* Zellen nicht an cytoplasmatischen Ribosomen, sondern ebenfalls an

nukleären Ribosomen statt (Mangiarotti, 1999). Aus diesem Grund kann alleine durch getrenntes Untersuchen von Kern- und cytoplasmatischer mRNA nicht festgestellt werden, ob die Entstehung der *cnb1_S* mRNA von der Translation der *cnb1_L* mRNA abhängig ist.

2) Einfluss der *cnb1_L* mRNA Sekundärstruktur

Unterschiedliche Konstrukte wurden hergestellt, in denen GFP cDNA-Fragmente an verschiedene Bereiche der *cnb1_L* cDNA angefügt wurden. Mit Hilfe dieser Konstrukte sollte untersucht werden, ob eine veränderte *cnb1_L* mRNA Sekundärstruktur einen Einfluss auf die Prozessierung hat. Die von diesen Konstrukten stammenden mRNAs wurden nur dann prozessiert, wenn die GFP cDNA innerhalb der *cnb1_L* mRNA eingefügt worden war, nicht jedoch wenn sie an das 5' oder 3' Ende angefügt worden war. Dieses Ergebnis lässt den Schluss zu, dass die Sekundärstruktur einen Einfluss auf den Prozessierungsmechanismus hat.

Die Sekundärstrukturen der von den Konstrukten abstammenden mRNAs sowie der *cnb1_L* mRNA wurden berechnet und verglichen. Im Fall der prozessierbaren mRNAs ergaben die Berechnungen neben weiteren Strukturen immer eine sehr ähnliche, auffallende Sekundärstruktur. Diese Struktur wies einen einzelsträngigen Bereich in Form einer großen Schlaufe direkt vor dem Startkodon sowie eine dreidimensionale Struktur im Bereich dieses Kodons auf. Diese Sekundärstruktur wurde im Fall der nicht-prozessierbaren mRNAs nie vorausgesagt.

Die dreidimensionale Struktur entsteht, wenn der Sequenzbereich bei 570 Basen mit dem Bereich des Startkodons hybridisiert. Diese Struktur könnte eventuell nötig sein, um Faktoren, die an der Prozessierung beteiligt sind, in die richtige Position zu bringen. Um die Beteiligung dieser Struktur am Prozessierungsmechanismus zu untersuchen ist geplant, die Sequenz in diesem Bereich so zu verändern, dass sich der dreidimensionale Bereich nicht mehr ausbilden kann.

Die hier betrachteten Sekundärstrukturen wurden unter der Annahme bestimmter Standardbedingungen berechnet. Da *in vivo* andere Salzbedingungen vorliegen und die mRNA in einem sehr dicht gepackten Komplex mit Proteinen als "heterogenes nukleäres Ribonukleoprotein" (hnRNP) vorliegt (Dreyfuss et al., 1993) ist es möglich, dass die Sekundärstrukturen *in vivo* etwas verschieden von den berechneten Strukturen sind.

3) Beteiligung einer strukturabhängigen Nuklease?

Die Fähigkeit einer mRNA, eine bestimmte Sekundärstruktur einzunehmen ist ein wichtiger Faktor sowohl für ihre Stabilität, als auch für ihren Abbau. Endonukleasen

benötigen z.B. sowohl eine bestimmte Primär- als auch Sekundärstruktur, um spezifisch schneiden zu können (Übersicht in (Higgins, 1991)). Auch im Fall der bereits beschriebenen β° -thalassämischen β -Globin mRNA Abbauprodukte wird ein Einfluss der mRNA Sekundärstruktur auf die Prozessierung vermutet. Es wird ebenfalls ein komplexerer Mechanismus angenommen, der mRNA Sekundärstruktur und Enzyme wie z.B. strukturabhängige Endonukleasen oder 5' Exoribonukleasen einschliesst (Lim & Maquat, 1992).

Die humane "Flap"-Endonuklease Fen1 ist an der Prozessierung der Okazaki-Fragmente bei der DNA Replikation sowie an der DNA Reparatur beteiligt. Anhand von DNA Modell-Substraten wurde gezeigt, dass die "Flap"-Endonuklease entlang einzelsträngiger DNA vom 5' Ende beginnend in Richtung 3' Ende wandert. Gelangt sie an einen Doppelstrangbereich, wird der Einzelstrang als ganzes Stück abgeschnitten (Murante, Rust & Bambara, 1995). Stevens (1998) wies *in vitro* nach, 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. Die berechneten Sekundärstrukturen der prozessierbaren Calcineurin B mRNAs weisen einen solchen Einzelstrangbereich in Form einer Schlaufe direkt vor dem Startkodon auf. Denkbar wäre, dass ein Fen1-ähnliches Enzym ebenfalls vom 5' Ende der *cnb1_L* mRNA beginnend in Richtung 3' Ende wandert und am Beginn des ersten Doppelstrangs schneidet. Unter der Annahme, dass die *cnb1_L* mRNA die berechnete Sekundärstruktur *in vivo* ausbildet, würde so die 5' nicht-translatierte Region sowie das Nukleotid A an Position +1 entfernt. Das erste AUG Kodon würde somit zerstört werden. Die Vorhersage der Sekundärstruktur zeigt, dass das 5' Ende der *cnb1_L* mRNA jedoch nicht frei vorliegt. 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 (Habracken 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). Die Beteiligung eines Fen1-ähnlichen Enzyms an der Prozessierung der *cnb1_L* mRNA ist also durchaus denkbar. Fen1- und vhs-homologe cDNAs wurden im Rahmen des *Dictyostelium* cDNA Sequenzierprojekts der Universität in Tsukuba (Japan) bereits identifiziert. Ein weiterer Hinweis auf den Mechanismus könnte sich aus der Beobachtung ergeben, dass alle 5' Enden der isolierten *cnb1_S* cDNAs nach

dem 5' RACE Poly (G)-Schwanz immer mit dem Nukleotid A beginnen. Dies könnte auf eine zusätzliche Sequenzspezifität der Nuklease hindeuten.

Modell

Aufgrund der erhaltenen Daten kann ein Modell (Abb. 26) für einen neuen Mechanismus der mRNA Prozessierung abgeleitet werden:

Ausgehend von dem Calcineurin B Gen *cnb1* wird eine unreife mRNA synthetisiert, die drei Introns enthält. Im Zuge der mRNA-Reifung werden diese Introns durch konstitutives Spleißen entfernt. Bei der reifen mRNA handelt es sich um die *cnb1_L* mRNA, die über eine 5' nicht-translatierte Region verfügt und deren translatierte Sequenz der kodierenden Sequenz des *cnb1* Gens entspricht. Die reife *cnb1_L* mRNA nimmt eine spezifische Sekundärstruktur ein. Bestimmte Faktoren könnten bei der Ausbildung oder Aufrechterhaltung dieser Struktur eine Rolle spielen. Eine wichtige Beteiligung des einzelsträngigen Bereichs vor dem Startkodon, sowie des Bereichs bei 570 Basen wird bei den nachfolgenden Schritten vermutet. Die *cnb1_L* mRNA wird im weiteren Verlauf strukturabhängig und gezielt um die 5' nicht-translatierte Region sowie mindestens um die Nukleotide A und U an Position +1 und +2 verkürzt. Dabei handelt es sich um eine partielle Degradation. Die so entstandene *cnb1_S* mRNA muss eine 7-Methyl-Guanosin-Kappe erhalten. Da die *cnb1_S* mRNA Entstehung entwicklungsreguliert ist, müssen ein oder mehrere der an der Prozessierung beteiligten Faktoren im Verlauf der Entwicklung verstärkt in der Zelle vorhanden sein. Die *cnb1_L* und *cnb1_S* mRNA Isoformen dienen anschliessend bei der Translation als Vorlage für die Expression der Calcineurin B Isoformen CNB_L und CNB_S.

Da die Prozessierung auch in Abwesenheit der Calcineurin B-spezifischen 5' nicht-translatierten Region stattfindet, muss sämtliche spezifische Information für die Prozessierung auf der translatierten Sequenz der *cnb1_L* mRNA liegen. Die *cnb1_S* mRNA verwendet als 5' nicht-translatierte Region den Sequenzbereich zwischen dem ersten und zweiten ATG der *cnb1* Sequenz. Dies bedeutet, dass dieser Sequenzabschnitt im Fall der *cnb1_L* mRNA translatiert wird, im Fall der *cnb1_S* mRNA aber als 5' nicht-translatierte Region dient.

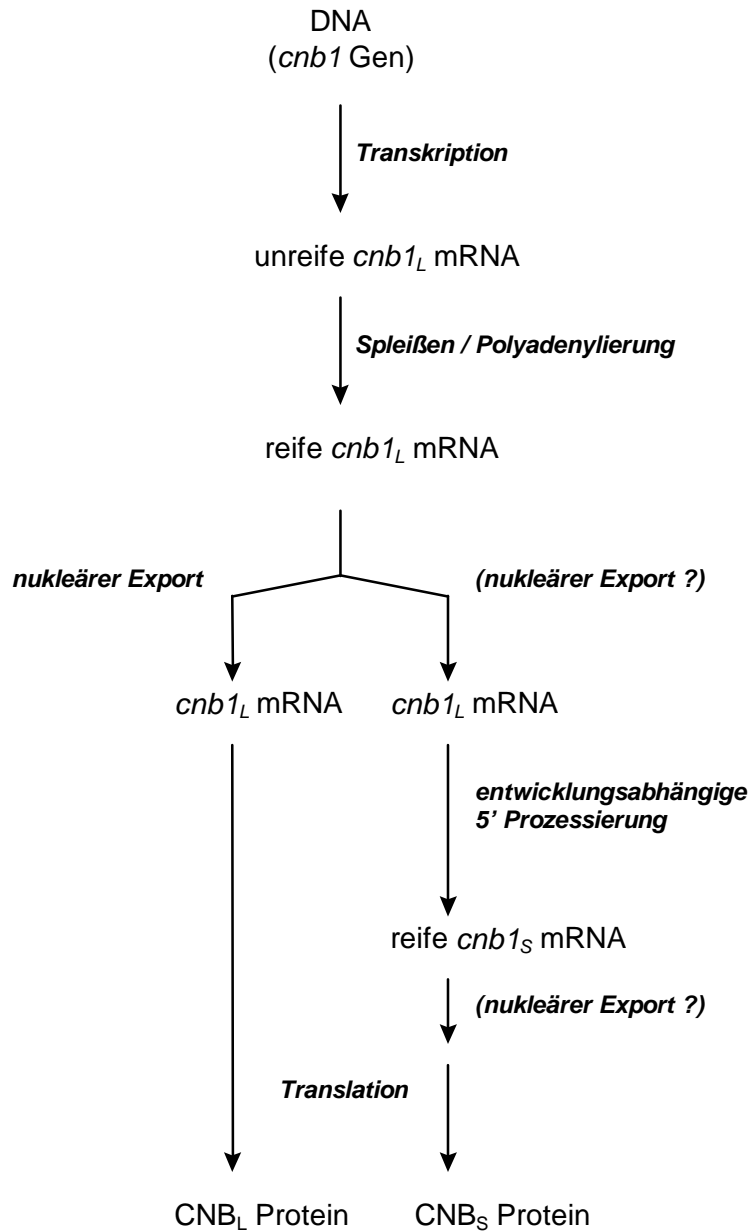


Abb. 26: Schematische Darstellung der Calcineurin B Expression in *Dictyostelium discoideum*

Mögliche Funktion der zwei Calcineurin B Proteinisofomen

Die Expression mehrerer entwicklungsabhängig regulierter Calcineurin B Protein- und mRNA-Isoformen wurde auch in *Drosophila melanogaster* (Warren et al., 1996), im Hodengewebe von Ratten (Mukai et al., 1991; Chang et al., 1994; Su et al., 1995) und Mäusen (Ueki et al., 1992) und in humanem Hodengewebe (Wang et al., 1996)

beschrieben. In Mäusen wurde parallel zur hodenspezifischen Calcineurin B Expression die verstärkte Expression einer hodenspezifischen Calcineurin A Isoform nachgewiesen. Eine wichtige Funktion des Holoenzym bei der Hodenreifung wird deshalb vermutet (Muramatsu et al., 1992; Ueki et al., 1992). Die verstärkte Expression der CNB_S Isoform in aggregierenden *Dictyostelium* Zellen korreliert ebenfalls mit dem Expressionsprofil der katalytischen Untereinheit Calcineurin A (Dammann et al., 1996). Durch die Existenz von zwei Calcineurin B Isoformen muss es in den Zellen zur Bildung von zwei verschiedenen Holoenzymen aus Calcineurin A/CNB_L bzw. Calcineurin A/CNB_S kommen. Die entwicklungsabhängige Regulation der CNB_S Isoform lässt vermuten, dass in vegetativen Zellen und in Zellen zu Beginn der Entwicklung das Calcineurin A/CNB_L Holoenzym die vorherrschende Form ist, während ab der Aggregation beide Holoenzymtypen in etwa der gleichen Verteilung zu erwarten sind.

Welche Funktionen könnten zwei verschiedene Calcineurin Holoenzyme in *Dictyostelium* Zellen haben? Das verstärkte Auftreten eines zweiten Calcineurin Holoenzym ab dem Zeitpunkt der Aggregation deutet auf eine Rolle während der Differenzierung hin. Die Vermutung, dass die CNB_S Isoform spezifisch nur in einem der beiden Zelltypen - Stiel- oder Sporenzellen - exprimiert wird, konnte jedoch nicht bestätigt werden. Sowohl in Stielen als auch in Sporen wurden beide Isoformen im gleichen Maß exprimiert. Eine Funktion von Calcineurin bei der Differenzierung ist jedoch trotzdem aufgrund der entwicklungsabhängigen Regulation beider Calcineurin Untereinheiten denkbar und betrifft wahrscheinlich beide Zelltypen gleichermaßen.

Um einen Einblick in die Funktion der beiden Holoenzyme zu erhalten, wurden *Dictyostelium* Mutanten hergestellt, die sowohl Calcineurin A als auch eine der Calcineurin B Isoformen überproduzieren sollten. Dafür wurde einerseits versucht, die komplette *cnb1_S* bzw. *cnb1_L* cDNA in Calcineurin A überproduzierenden Zellen zu exprimieren. Andererseits wurde eine am 5' und 3' Ende verkürzte *cnb1_L* cDNA ebenfalls in diesen Zellen exprimiert. Eine Expression der kompletten cDNA Isoformen wurde nicht erreicht. Möglicherweise erzeugte die verstärkte Expression der Calcineurin B Isoformen einen starken Selektionsdruck, so dass nur solche Zellen selektioniert wurden, bei denen keine verstärkte Expression des Proteins stattfand. Die Expression des N- und C-terminal verkürzten Calcineurin B in Calcineurin A überproduzierenden *Dictyostelium* Zellen wurde erreicht. Die Calcineurin B Gesamtmenge in den Zellen wurde dadurch jedoch lediglich um ca. 50% gesteigert. Im Vergleich zu den Kontrollzellen zeigten diese Zellen keinen veränderten Phänotyp bezüglich Wachstum oder Entwicklung. Da das Plasmid pBsrH eine sehr gute

Überproduktion erlaubt (Prof. Dr. H. Mac Williams, München, persönliche Mitteilung), könnte es auch in diesem Fall eine Selektion auf solche Zellen gegeben haben, die Calcineurin B nur schwach exprimieren.

Calcineurin B ist in vielen Organismen am N-Terminus myristoyliert (Aitken et al., 1982; Gordon et al., 1991). Die Konsensus-Sequenz für diese posttranslationale Modifikation ist Met-Gly-X-X-X-Ser/Thr-. Ein Glycin an Position 2 ist absolut notwendig (Resh, 1999). Die aminoternale Sequenz des CNB_L Proteins lautet M-G-N-Q-H-S- und verfügt somit über die erforderliche Konsensus-Sequenz. Ob diese Calcineurin B Isoform tatsächlich im myristoylierten Zustand vorliegt, wurde bisher nicht untersucht. Es wird davon ausgegangen, dass die CNB_S Isoform nicht myristoyliert wird, da die erforderliche Konsensus-Sequenz nicht vorhanden ist. Dieser Unterschied in der post-translationalen Modifikation der beiden Isoformen könnte einen Hinweis auf unterschiedliche Funktionen der beiden Calcineurin Holoenzyme geben. Denkbar wäre, dass der Myristoylrest bei der Erkennung unterschiedlicher Substratgruppen beteiligt ist. Ebenfalls denkbar wäre eine unterschiedliche Lokalisierung der beiden Holoenzyme innerhalb der Zelle. Für Calcineurin aus Rattenzellen wurde allerdings gezeigt, dass der Myristoylrest weder für die Assoziation des Holoenzym mit Membranen, noch für die Enzymaktivität oder Calcium-Bindung benötigt wird (Kennedy et al., 1996).

Ausblick

Folgende Punkte sind zu klären:

- 1) Es ist geplant, die an der *cnb1_L* mRNA Prozessierung beteiligten Faktoren zu isolieren. Hierfür kommt z.B. das Hefe 3-Hybrid System in Frage, mit dessen Hilfe Protein-RNA Interaktionen identifiziert werden können (SenGupta et al., 1996). Außerdem ist die Isolierung der Fen1- und vhs-homologen cDNAs aus *Dictyostelium* cDNA Banken geplant, um "knockout" Mutanten herzustellen.
- 2) Die Sekundärstruktur der *cnb1_L* mRNA nimmt wahrscheinlich eine wichtige Rolle bei der Prozessierung ein. Welcher Sequenzabschnitt unerlässlich ist, könnte getestet werden, indem die gesamte *cnb1_L* mRNA in gleich große Abschnitte aufgeteilt wird. mRNAs, die von verschiedenen Konstrukten abstammen, in denen jeweils einer dieser Abschnitte durch z.B. ein GFP cDNA-Fragment ausgetauscht wurde, könnten so auf die Prozessierbarkeit

getestet werden. Die Vermutung wäre, dass bei Austausch des Sequenzabschnittes, der den Bereich um 570 Basen einschliesst, die Prozessierung nicht mehr stattfindet.

3) Unklar ist, ob es sich um eine schrittweise Verkürzung des 5' Bereichs der *cnb1_L* mRNA handelt, oder ob ein FEN1-ähnliches Enzym den Sequenzbereich als ganzes Stück abschneidet.

4) Die *cnb1_S* mRNA muss eine 7-Methyl-Guanosin-Kappe besitzen, da ohne die Kappe keine Translation möglich ist. Ob diese während der Prozessierung durch eine Art des Spleißens, oder nach *de novo* Synthese im Cytoplasma angefügt wird, ist zu klären.

5) Durch die Verwendung eines induzierbaren Expressionsplasmids könnte der durch die Calcineurin B Überexpression ausgelöste Selektionsdruck auf wachsende Zellen umgangen werden, indem die Expression der kompletten Calcineurin B Isoformen erst während der Differenzierung induziert werden würde. Die getrennte Reinigung der beiden Holoenzyme aus *Dictyostelium* Zellen wäre so ebenfalls möglich. Durch das Anfügen eines Histidin-"Tags" an das 5' Ende der *cnb1_L* bzw. *cnb1_S* cDNA wäre gewährleistet, dass nur jeweils eine der beiden Isoformen den Histidin-"Tag" besitzt. Die Holoenzyme könnten somit getrennt voneinander über eine Ni²⁺-NTA Matrix gereinigt und kristallisiert werden. Außerdem könnte der Einfluss der Isoformen auf die Phosphataseaktivität von Calcineurin A überprüft werden.

6) Durch Inkubation der Zellen mit radioaktiv markierten Myristoylresten und anschliessender Immunpräzipitation mit Calcineurin B Antiserum könnte überprüft werden, ob die CNB_L Isoform myristoyliert vorliegt. Ein besseres Signal könnte mit Calcineurin B überproduzierenden Zellen erzielt werden. Wie bereits diskutiert, ist geplant, hierfür ein induzierbares Expressionsplasmid zu testen

Anhang

5' ttt tta att tat taa taa aca acc ctt att ttt gca acc aat att tga tta acc
aaa aaa aaa aaa acc caa tcc gag att tta gct cca aaa aaa aaa aaa aat aca gca
ggt tat aaa aat att att tta ata att aaa aaa aaa aaa aaa acc aca caa caa acc
aaa aaa ata aaa ata aaa ata aaa aaa aaa aaa ATG GGA AAT CAA CAT TCA TTA TTA
AAT AAA GAA CAA TTA GAA CAA ATG AAA GAT AAT AGT AGT Tgt atg ttt tat ata aat
ata aat ata tat ata tat aaa tat ata tat tta aat atg aaa aaa aaa taa aaa ata
aaa taa aat aaa aat aaa aaa ttt tag atg ttt aaa caa aat aaa caa aat caa ctc
cat caa aat tta aaa act ata gaa tac aca cta cct aat aat aat aat ata ata agt
aat ata gta att aat ata tta att att tgt tta aaa ata tat ata tat att ttt aca
tat att tat ata tat ata gTT TCA GAA GCA GAA CTT AAA AAA TTA TAT AGA AGA TTC
CAA ATG TTG GAT AAA GAT GGG CTA GGT ACA TTA ACA ACT GAT GAA TTC TTA TCT ATA
CCA GAT TTA GCA TTA AAC CCA CTT TTA GAA AGA GTT ATT CAA ATC TTT GAT CAA AAT
AAA GAT AAT GAA ATT GAA TTC TCT GAA TTT GTT GGT ACA CTT GCA ACA CTC TCC CAT
AAA GGT ACA AAA GAA GAT AAA TTA AAA Tgt aag att aaa act att att att att
ttt att att atc att att tat ttt aat ttt aat ttt aat ttt cta aaa aaa tta tat
ata tat ttt ata gTC CTT TTC CAA ATT TAT GAT ATT GAT TGT GAT GGA TTT ATT AGT
AAT GGT GAA TTA TTC CAA GTT TTA AAA ATG ATG GTT ~~GGT~~ ACC AAT TTA AAT GAT GTA
CAA CTT CAA CAA ATT GTT GAT AAA ACT ATT ATT GAA GGT GAT TAT GAT AAA GAT GGT
AAA ATT TCA TTT GAT GAA TTC ATT CAT gta tgt att ttt att tcg att ttt ttt tta
aaa aaa aaa aaa ata tat cca tat aat taa ata aaa att atg tta aca ttt ctc tct
ttt ttt tta tta tta att ttt aat ttt taa ttt att tat aat agA TGA TTG TTA ATC
AAG AAG GAA TAG AAG AAA AAC TTA GCG TAA ATT GGT CAG AAT AA aat aaa ata aaa
taa aat tat att aca 3'

Nukleotidsequenz des *cnb1* Gens

Gezeigt ist die Nukleotidsequenz des *cnb1* Gens aus *Dictyostelium discoideum*. Kodierende Sequenz ist in Großbuchstaben und Fettdruck dargestellt, nicht-kodierende Sequenz in Kleinbuchstaben. Die Konsensus-Spleißsequenzen sind unterstrichen. Die Sequenz ist für eine bessere Übersicht in Tripletts dargestellt, die aber nicht unbedingt gleichbedeutend mit den in der cDNA kodierenden Tripletts sind. Die 3' nicht-kodierende Sequenz wurde der Calcineurin B cDNA Sequenz entnommen.

Referenzen

- AITKEN, A., COHEN, P., SANTIKARN, S., WILLIAMS, D. H., CALDER, A. G., SMITH, A. & KLEE, C. B. (1982). Identification of the NH₂-terminal blocking group of calcineurin B as myristic acid. *FEBS Letters* **150**, 314-318.
- ANTONI, F. A., BARNARD, R. J., SHIPSTON, M. J., SMITH, S. M., SIMPSON, J. & PATERSON, J. M. (1995). Calcineurin feedback inhibition of agonist-evoked cAMP formation. *J Biol Chem* **270**, 28055-28061.
- ASAI, A., QIU, J. H., NARITA, Y., CHI, S., SAITO, N., SHINOURA, N., HAMADA, H., KUCHINO, Y. & KIRINO, T. (1999). High level calcineurin activity predisposes neuronal cells to apoptosis. *J Biol Chem* **274**, 34450-34458.
- AYOUBI, T. A. Y. & VAN DE VEN, W. J. M. (1996). Regulation of gene expression by alternative promoters. *FASEB Journal* **10**, 453-460.
- BABU, Y. S., BUGG, C. E. & COOK, W. J. (1988). Structure of calmodulin refined at 2.2Å resolution. *J Mol Biol* **204**, 191-204.
- BEALS, C. R., CLIPSTONE, N. A., HO, S. N. & CRABTREE, G. R. (1997). Nuclear localization of NF-ATc by a calcineurin-dependent, cyclosporin-sensitive intramolecular interaction. *Genes and Development* **11**, 824-834.
- BLUMBERG, D. D., COMER, J. F. & HIGINBOTHAM, K. G. (1988). A Ca²⁺-dependent signal transduction system participates in coupling expression of some cAMP-dependent prespore genes to the cell surface receptor. *Developmental Genetics* **9**, 359-369.
- BLUMBERG, D. D., COMER, J. F. & WALTON, E. M. (1989). Ca⁺⁺ antagonists distinguish different requirements for cAMP-mediated gene expression in the cellular slime mold, *Dictyostelium discoideum*. *Differentiation* **41**, 14-21.
- BLUMENTHAL, D. K., TAKIO, K., HANSEN, R. S. & KREBS, E. G. (1986). Dephosphorylation of cAMP-dependent protein kinase regulatory subunit (type II) by calmodulin-dependent protein phosphatase. *J Biol Chem* **261**, 8140-8145.
- BOGUMIL, R., NAMGALADZE, D., SCHAARSCHMIDT, D., SCHMACHTEL, T., HELLSTERN, S., MUTZEL, R. & ULLRICH, V. (2000). Inactivation of calcineurin by hydrogen peroxide and phenylarsine oxide: evidence for a dithiol-disulfide equilibrium and implications for redox regulation. *Eur J Biochem* **267**, 1407-1415.
- BONNER, J. T., CLARKE, W. W., MEELY, C. L. & SLIFKIN, M. K. (1950). The orientation to light and the extremely sensitive orientation to temperature gradients in the slime mould *Dictyostelium discoideum*. *J Cell Comp Physiol* **36**, 149-158.
- BORCK, K., BEGGS, J. D., BRAMMAR, W. J., HOPKINS, A. S. & MURRAY, N. E. (1976). The construction in vitro of transducing derivatives of phage lambda. *Mol Gen Genet* **146**, 199-207.
- BOUSSIF, O., LEZOUALC'H, F., ZANTA, M. A., MERGNY, M. D., SCHERMAN, D., DEMENEIX, B. & BEHR, J. P. (1995). A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and *in vivo*: Polyethylenimine. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**, 7297-7301.
- BRADFORD, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-254.
- BREITBART, R. E., ANDREADIS, A. & NADAL-GINARD, B. (1987). Alternative splicing: a ubiquitous mechanism for the generation of multiple protein isoforms from single genes. *Annu Rev Biochem* **56**, 467-495.
- BULLOCK, W. O., FERNANDEZ, J. M. & SHORT, J. M. (1987). XI1-Blue: a high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. *Bio Techniques* **5**, 376-378.
- CAMERON, A. M., STEINER, J. P., ROSKAMS, A. J., ALI, S. M., RONNETT, G. V. & SNYDER, S. H. (1995). Calcineurin associated with the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-FKBP12 complex modulates Ca²⁺ flux. *Cell* **83**, 463-472.

- CAMERON, A. W., NUCIFORA, F. C., JR, FUNG, E. T., LIVINGSTON, D. J., ALDAPE, R. A., ROSS, C. A. & SNYDER, S. H. (1997). FKBP12 binds the inositol 1,4,5-trisphosphat receptor at leucine-proline (1400-1401) and anchors calcineurin to this FK506-like domain. *The Journal of Biological Chemistry* **272**, 27582-27588.
- CECH, T. R. (1987). The chemistry of self-splicing RNA and RNA enzymes. *Science* **236**, 1532-1539.
- CHANG, C. D., MUKAI, H., KUNO, T. & TANAKA, C. (1994). cDNA cloning of an alternative spliced isoform of the regulatory subunit of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein phosphatase (calcineurin B α 2). *Biochim Biophys Acta* **1217**, 174-180.
- CHANG, W. T., NEWELL, P. C. & GROSS, J. D. (1996). Identification of the Cell Fate Gene *Stalky* in *Dictyostelium*. *Cell* **87**, 471-481.
- CHOMCZYNSKI, P. & SACCHI, N. (1987). Single-Step Method of RNA Isolation by Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction. *Analytical Biochemistry* **162**, 156-159.
- CLARKE, M., BAZARI, W. L. & KAYMAN, S. C. (1980). Isolation and properties of calmodulin from *Dictyostelium discoideum*. *J Bacteriol* **141**, 397-400.
- COHEN, P. & KLEE, C. B. (1988). *Calmodulin. Molecular aspects of cellular regulation*. Elsevier.
- CONDEELIS, J. S. & TAYLOR, D. L. (1977). The contractile basis of amoeboid movement. V. The control of gelation, solation and contraction in extracts from *Dictyostelium discoideum*. *J. Cell Biol.* **74**, 901-928.
- CRABTREE, G. R. & CLIPSTONE, N. A. (1994). Signal transmission between the plasma membrane and nucleus of T-lymphocytes. *Ann Rev Biochem* **63**, 1045-1083.
- CSANK, C., TAYLOR, F. M. & MARTINDALE, D. W. (1990). Nuclear pre-mRNA introns: analysis and comparison of intron sequences from *Tetrahymena thermophila* and other eukaryotes. *Nucleic Acids Research* **18**, 5133-5141.
- CUBITT, A. B., FIRTEL, R. A., FISCHER, G., JAFFE, L. F. & MILLER, A. L. (1995). Patterns of free calcium in multicellular stages of *Dictyostelium* expressing jellyfish apoaequorin. *Development* **121** (8), 2291-2301.
- CULBERTSON, M. R. (1999). RNA surveillance - unforeseen consequences for gene expression, inherited genetic disorders and cancer. *TIG* **15**, 74-79.
- CYERT, M. S. & THORNER, J. (1992). Regulatory subunit (*CNB1* Gene product) of yeast Ca²⁺/calmodulin-dependent phosphoprotein phosphatases is required for adaptation to pheromone. *Molecular and Cellular Biology* **12**, 3460-3469.
- DAMMANN, H., HELLSTERN, S., HUSAIN, Q. & MUTZEL, R. (1996). Primary structure, expression and developmental regulation of a *Dictyostelium* calcineurin A homologue. *Eur J Biochem* **238**, 391-399.
- DECKER, C. J. & PARKER, R. (1994). Mechanisms of mRNA degradation in eukaryotes. *TIBS* **19**, 336-340.
- DEVREOTES, P. N. (1982). Chemotaxis *in*: W.F.Loomis(ed), The development of *Dictyostelium discoideum*. *Academic Press New York*, 117-168.
- DOTTIN, R. P., WEINER, A. M. & LODISH, H. F. (1976). 5' terminal nucleotide sequences of the messenger RNAs of *Dictyostelium discoideum*. *Cell* **8**, 233-244.
- DREYFUSS, G., MATUNIS, M. J., PINOL-ROMA, S. & BURD, C. G. (1993). hnRNP proteins and the biogenesis of mRNA. *Annu Rev Biochem* **62**, 289-321.
- Elgadi, M. M., Smiley, J. R. (1999). Picornavirus internal ribosome entry site elements target RNA cleavage events induced by the herpes simplex virus virion host shutoff protein. *J. of Virology*, **73**, 9222-9231.
- ELLEDGE, S. J., MULLIGAN, J. T., RAMER, S. W., SPOTTSWOOD, M. & DAVIS, R. W. (1991). λ YES: A multifunctional cDNA expression vector for the isolation of genes by complementation of yeast and *Escherichia coli* mutations. *Proc Natl Acad Sci* **88**, 1731-1735.
- EUROPE-FINNER, G. N. & NEWELL, P. C. (1986). Inositol 1,4,5-trisphosphate and calcium stimulate actin polymerization in *Dictyostelium discoideum*. *J Cell Sci* **82**, 41-51.

- FENG, B. & STEMMER, P. M. (1999). Interactions of Calcineurin A, Calcineurin B and Ca^{2+} . *Biochemistry* **38**, 12481-12489.
- FORREST, M. J., JEWELL, M. E., KOO, G. C. & SIGALL, N. H. (1991). FK-506 and cyclosporin A: selective inhibition of calcium ionophore induced polymorphonuclear leucocyte degranulation. *Biochem Pharmacol* **42**, 1221-1228.
- FRANKE, J. & KESSIN, R. (1977). A defined minimal medium for axenic strains of *Dictyostelium discoideum*. *Proc Natl Acad Sci USA* **74**, 2157-2161.
- FUMIYOSHI, A. & MAEDA, Y. (1994). Precise expression of the cAMP receptor gene, *CAR1*, during transition from growth to differentiation in *Dictyostelium discoideum*. *FEBS Letters* **342**, 239-241.
- GENAZZANI, A. A., CARAFOLI, E. & GUERINI, D. (1999). Calcineurin controls inositol 1,4,5-trisphosphate type 1 receptor expression in neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**, 5797-5801.
- GERISCH, G., ALBRECHT, R., HEIZER, C., HODGKINSON, S. & MANIAK, M. (1995). Chemoattractant-controlled accumulation of coronin at the leading edge of *Dictyostelium* cells monitored using a green fluorescent protein-coronin fusion protein. *Current Biology* **5**, 1280-1285.
- GORDON, J. I., DURONIO, R. J., RUDNICK, D. A., ADAMS, S. P. & GOKEL, G. W. (1991). Protein *N*-Myristoylation. *J Biol Chem* **266**, 8647-8650.
- GOTTESMANN, S., HALPERN, E. & TRISLER, P. (1981). Role of *sulA* and *sulB* in filamentation by *lon* mutants of *Escherichia coli* K12. *J Bacteriol* **148**, 256-273.
- GRANT, C. E., BAIN, G. & TSANG, A. (1990). The molecular basis for alternative splicing of the CABP1 transcripts in *Dictyostelium discoideum*. *Nucleic Acids Research* **18**, 5457-5463.
- GUERINI, D. & KLEE, C. B. (1989). Cloning of human calcineurin A: Evidence for two isozymes and identification of a polyproline structural domain. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**, 9183-9187.
- GUERINI, D., KRINKS, M. H., SIKELA, J. M., HAHN, W. E. & KLEE, C. B. (1989). Isolation and sequence of a cDNA clone for human calcineurin B, the Ca^{2+} -binding subunit of the Ca^{2+} /calmodulin-stimulated protein phosphatase. *DNA* **8**, 675-682.
- HABRAKEN, Y., SUNG, P., PRAKASH, L. & PRAKASH, S. (1995). Structure-specific nuclease activity in yeast nucleotide excision repair protein Rad2. *J Biol Chem* **270**, 30194-30198.
- HARRINGTON, J. J. & LIEBER, M. R. (1994). Functional domains within FEN-1 and RAD2 define a family of structure-specific endonucleases: implications for nucleotide excision repair. *Genes Dev* **8**, 1344-1355.
- HELLSTERN, S. (1997). Expression, Reinigung und Charakterisierung der katalytischen Untereinheit der Ca^{2+} /Calmodulin-abhängigen Proteinphosphatase (Calcineurin A) von *Dictyostelium discoideum*. Dissertation thesis, Konstanz.
- HELLSTERN, S., DAMMANN, H., HUSAIN, Q. & MUTZEL, R. (1997). Overexpression, purification and characterization of *Dictyostelium* calcineurin A. *Res Microbiol* **148**, 335-343.
- HIGGINS, C. F. (1991). Stability and degradation of mRNA. *Curr Opin Cell Biol* **3**, 1013-1018.
- HIGUCHI, H., TAMURA, J., RATHNA GIRI, P., POLLI, J. W. & KINCAID, R. L. (1991). Calmodulin-dependent protein phosphatase from *Neurospora crassa*. Molecular cloning and expression of recombinant catalytic subunit. *J Biol Chem* **266**, 18104-18112.
- HORI, R. & FIRTEL, R. A. (1994). Identification and characterisation of multiple A/T-rich *cis*-acting elements that control expression from *Dictyostelium* actin promoters: the *Dictyostelium* actin upstream activating sequence confers growth phase expression and has enhancer-like properties. *Nucleic Acid Research* **22**, 5099-5111.
- HORN, F. & GROSS, J. (1996). A role for calcineurin in *Dictyostelium discoideum* development. *Differentiation* **60**, 269-275.
- HULTSCH, T., RODRIGUEZ, J. L., KALINER, M. A. & HOHMAN, R. J. (1990). Cyclosporin A inhibits degranulation of rat basophilic leukemia cells and human basophils:

- inhibition of mediator release without affecting PI hydrolysis and Ca^{2+} fluxes. *J Immunol* **144**, 2659-2664.
- JAMES, P., VORHERR, T. & CARAFOLI, E. (1995). Calmodulin-binding domains: just two faced or multi-faceted? *Trends Biochem Sci* **20**, 38-42.
- KAY, R. R. & WILLIAMS, J. G. (1999). The *Dictyostelium* genome project - an invitation to species hopping. *Trends in Genetics* **15**, 294-297.
- KENNEDY, M. T., BROCKMAN, H. & RUSNAK, F. (1996). Contributions of myristoylation to calcineurin structure/function. *The Journal of Biological Chemistry* **271**, 26517-26521.
- KESSEN, U. (1995). *Dictyostelium* Mutanten mit veränderter Expression des Calcineurin Gens. Diplomarbeit thesis, Universität Konstanz.
- KESSEN, U., SCHALOSKE, R., AICHEM, A. & MUTZEL, R. (1999). Ca^{2+} /Calmodulin-independent activation of calcineurin from *Dictyostelium* by unsaturated long chain fatty acids. *The Journal of Biological Chemistry* **274**, 37821-37826.
- KINCAID, R. (1993). Calmodulin-dependent protein phosphatases from microorganisms to man. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res* **27**, 1-23.
- KINCAID, R. L. (1995). Calcineurin as a pivotal Ca^{2+} -sensitive switching element in biological responses: Implications for the regulation of tau phosphorylation in Alzheimer's disease. In *Alzheimer's Disease: Lessons from Cell Biology* (ed. K. S. e. a. Kosik), pp. 88-102. Springer-Verlag, Berlin.
- KINCAID, R. L., MARTENSEN, T. M. & VAUGHAN, M. (1986). Modulation of calcineurin phosphotyrosyl protein phosphatase activity by calmodulin and protease treatment. *Biochem Biophys Res Commun* **140**, 320-328.
- KINCAID, R. L., NIGHTINGALE, M. S. & MARTIN, B. M. (1988). Characterisation of a cDNA clone encoding the calmodulin-binding domain of mouse brain calcineurin. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**, 8983-8987.
- KISSINGER, C. R., PARGE, H. E., KNIGHTON, D. R., LEWIS, C. T., PELLETIER, L. A., TEMPCZYK, A., KALISH, V. J., TUCKER, K. D., SHOWALTER, R. E., MOOMAW, E. W., GASTINEL, L. N., HABUKA, N., CHEN, X., MALDONADO, F., BARKER, J. E., BACQUET, R. & VILLAFRANCA, J. E. (1995). Crystal structure of human calcineurin and the human FKBP12-FK506-calcineurin complex. *Nature* **378**, 641-644.
- KLEE, C. B. & COHEN, P. (1988). *The calmodulin-regulated protein phosphatase*. Elsevier, Amsterdam.
- KLEE, C. B., DRAETTA, G. F. & HUBBARD, M. J. (1988). Calcineurin. *Adv. Enzymol* **61**, 149-200.
- KLEE, C. B. & KRINKS, M. H. (1978). Purification of cyclic 3',5'-nucleotide phosphodiesterase inhibitory protein by affinity chromatography on activator protein coupled to sepharose. *Biochemistry* **17**, 120-126.
- KOZAK, M. (1986). Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eucaryotic ribosomes. *Cell* **44**, 283-292.
- KOZAK, M. (1989). The scanning model for translation: an update. *J Cell Biol* **108**, 229-241.
- KOZAK, M. (1999). Initiation of translation in procaryotes and eukaryotes. *Gene* **234**, 187-208.
- KRETSINGER, R. H. (1980). Structure and evolution of calcium-modulated proteins. *CRC Crit Rev Biochem* **8**, 119-174.
- KUNO, T., TANAKA, H., MUKAI, H., CHANG, C., HIRAGA, K., MIYAKAWA, T. & TANAKA, C. (1991). cDNA cloning of a calcineurin B homolog in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical and biophysical research communications* **180**, 1159-1163.
- KUNZ, J. & HALL, M. N. (1993). Cyclosporin A, FK506 and rapamycin: more than just immunosuppression. *Trends Biochem Sci* **18**, 334-338.
- KUSPA, A., DINGERMAN, T. & NELLEN, W. (1995). Analysis of gene function in *Dictyostelium*. *Experientia* **51**, 1116-1123.

- KYHSE-ANDERSEN, J. (1984). Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Meth* **10**, 203-209.
- LACOMBE, M. L., PODGORSKI, G. J., FRANKE, J. & KESSIN, R. H. (1986). Molecular cloning and developmental expression of the cyclic nucleotide phosphodiesterase gene of *Dictyostelium discoideum*. *J Biol Chem* **261**, 16811-16817.
- LAEMMLI, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-5.
- LIM, S. K. & MAQUAT, L. E. (1992). Human β -globin mRNAs that harbor a nonsense codon are degraded in murine erythroid tissues to intermediates lacking regions of exon I or exons I and II that have cap-like structure at the 5' termini. *EMBO Journal* **11**, 3271-3278.
- LIM, S. K., MULLINS, J. J., CHEN, C. M., GROSS, K. W. & MAQUAT, L. E. (1989). Novel metabolism of several β^0 -thalassemic β -globin mRNAs in the erythroid tissues of transgenic mice. *EMBO Journal* **8**, 2613-2619.
- LIM, S. K., SIGMUND, C. D., GROSS, K. W. & MAQUAT, L. E. (1992). Nonsense codons in human β -globin mRNA result in the production of mRNA degradation products. *Molecular and Cellular Biology* **12**, 1149-1161.
- LIU, J., FARMER JR, J. D., LANE, W. S., FRIEDMAN, J., WEISSMAN, J. & SCHREIBER, S. L. (1991). Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell* **66**, 807-815.
- LIU, J. P., SIM, A. T. & ROBINSON, P. J. (1994). Calcineurin inhibition of dynamin I GTPase activity coupled to nerve terminal depolarization. *Science* **265**, 970-973.
- LOOMIS, W. F. (1975). *Dictyostelium discoideum*. A developmental system. *Academic Press Inc.*
- LOOMIS, W. F. & DEVREOTES, P. N. (1982). The development of *Dictyostelium discoideum*. *Academic Press New York*, 117-168.
- LOUIS, J. M., SAXE III, C. L. & KIMMEL, A. R. (1993). Two transmembrane signaling mechanisms control expression of the cAMP receptor gene CAR1 during *Dictyostelium* development. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**, 5969-5973.
- MAEDA, Y. & MAEDA, M. (1973). The calcium content of the cellular slime mold, *Dictyostelium discoideum*, during development and differentiation. *Exp Cell Res* **82**, 125-130.
- MALCHOW, D., BÖHME, R. & RAHMSDORF, H. J. (1981). Regulation of phosphorylation of myosin heavy chain during the chemotactic response of *Dictyostelium* cells. *Eur J Biochem* **117**, 213-218.
- MALCHOW, D., NÄGELE, B., SCHWARZ, H. & GERISCH, G. (1972). Membrane bound cAMP phosphodiesterase in chemotactically responding cells of *Dictyostelium discoideum*. *Eur J Biochem* **28**, 136-142.
- MANALAN, A. S. & KLEE, C. B. (1983). Activation of calcineurin by limited proteolysis. *Proc Natl Acad Sci USA* **80**, 4291-4295.
- MANGIAROTTI, G. (1999). Coupling of transcription and translation in *Dictyostelium discoideum* nuclei. *Biochemistry* **38**, 3996-4000.
- MANIAK, M. & NELLEN, W. (1988). A developmentally regulated membrane protein gene in *Dictyostelium discoideum* is also induced by heat shock and cold shock. *Molecular and Cellular Biology* **8**, 153-159.
- MANIAK, M. & NELLEN, W. (1990). Two separable promoters control different aspects of expression of a *Dictyostelium* gene. *Nucleic Acids Research* **18**, 3211-3217.
- MCCAFFREY, P. G., PERRINO, B. A., SODERLING, T. R. & RAO, A. (1993). NF-ATp, a T-lymphocyte DNA-binding protein that is a target for calcineurin and immunosuppressive drugs. *J Biol Chem* **268**, 3747-3752.
- McKEOWN, M. (1992). Alternative mRNA splicing. *Annu Rev Cell Biol* **8**, 133-155.

- MCKEOWN, M., HIRTH, K. P., EDWARDS, C. & FIRTEL, R. A. (1982). Examination of the regulation of the actin multigene family in *Dictyostelium discoideum*. *Prog Clin Biol Res* **85 Pt A**, 51-78.
- MEANS, A. R. (1995). *Calcium regulation of cellular function*. Raven Press, New York.
- MEANS, A. R., VANBERKUM, M. F., BAGCHI, I., LU, K. P. & RASMUSSEN, C. D. (1991). Regulatory functions of calmodulin. *Pharmacol Ther* **50**, 255-270.
- MELEFORS, Ö. & HENTZE, M. W. (1993). Translational regulation by mRNA/protein interactions in eukaryotic cells: ferritin and beyond. *BioEssays* **15**, 85-90.
- MINVIELLE-SEBASTIA, L. & KELLER, W. (1999). mRNA polyadenylation and its coupling to other RNA processing reactions and to transcription. *Curr Opin Cell Biol* **11**, 352-357.
- MOMAYEZI, M., LUMPERT, C. J., KERSKEN, H., GRAS, U., PLATTNER, H., KRINKS, M. H. & KLEE, C. B. (1987). Exocytosis induction in *Paramecium tetraurelia* cells by exogenous phosphoprotein phosphatase *in vivo* and *in vitro*: possible involvement of calcineurin in exocytotic membrane fusion. *J Cell Biol* **105**, 181-189.
- MONIAKIS, J., COUKELL, M. B. & JANIEC, A. (1999). Involvement of the Ca²⁺-ATPase PAT1 and the contractile vacuole in calcium regulation in *Dictyostelium discoideum*. *J Cell Sci* **112**, 405-414.
- MONNAT, J., HACKER, U., GEISSLER, H., RAUCHENBERGER, R., NEUHAUS, E. M., MANIAK, M. & SOLDATI, T. (1997). *Dictyostelium discoideum* protein disulfide isomerase, an endoplasmic reticulum resident enzyme lacking a KDEL-type retrieval signal. *FEBS Lett* **418**, 357-362.
- MUKAI, H., CHANG, C. D., TANAKA, H., A, I., KUNO, T. & TANAKA, C. (1991). cDNA cloning of a novel testis-specific calcineurin B-like protein. *Biochem Biophys Res Commun* **179**, 1325-1330.
- MUNRO, H. N. (1990). Iron regulation of ferritin gene expression. *Journal of Cellular Biochemistry* **44**, 107-115.
- MURAMATSU, T., RATHNA GIRI, P., HIGUCHI, S. & KINCAID, R. L. (1992). Molecular cloning of a calmodulin-dependent phosphatase from murine testis: Identification of a developmentally expressed nonneural isoenzyme. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**, 529-533.
- MURANTE, R. S., RUST, L. & BAMBARA, R. A. (1995). Calf 5' to 3' exo/endonuclease must slide from a 5' end of the substrate to perform structure-specific cleavage. *The Journal of Biological Chemistry* **270**, 30377-30383.
- NAKAMURA, T., LIU, Y., HIRATA, D., NAMBA, H., HARADA, S., HIROKAWA, T. & MIYAKAWA, T. (1993). Protein phosphatase type 2B (Calcineurin)-mediated, FK506-sensitive regulation of intracellular ions in yeast is an important determinant for adaptation to high salt stress conditions. *EMBO J* **12**, 4063-4071.
- NEWELL, P. C., MALCHOW, D. & GROSS, J. D. (1995). The role of calcium in aggregation and development of *Dictyostelium*. *Experientia* **51**, 1155-1165.
- NICHOLS, R. A., SUPPLICK, G. R. & BROWN, J. M. (1994). Calcineurin-mediated protein dephosphorylation in brain nerve terminals regulates the release of glutamate. *J Biol Chem* **269**, 23817-23823.
- PALATNIK, C. M., STORTI, R. V., CAPONE, A. K. & JACOBSON, A. (1980). Messenger RNA stability in *Dictyostelium discoideum*: Does poly (A) have a regulatory role? *J Mol Biol* **141**, 99-118.
- PALATNIK, C. M., STORTI, R. V. & JACOBSON, A. (1979). Fractionation and functional analysis of newly synthesized and decaying messenger RNAs from vegetative cells of *Dictyostelium discoideum*. *J Mol Biol* **128**, 371-395.
- PALATNIK, C. M., STORTI, R. V. & JACOBSON, A. (1981). Partial purification of a developmentally regulated messenger RNA from *Dictyostelium discoideum* by thermal elution from poly (U)-Sephadex. *J Mol Biol* **150**, 389-398.
- PEABODY, D. S. & BERG, P. (1986). Termination-Reinitiation occurs in the translation of mammalian cell mRNAs. *Molecular and cellular biology* **6**, 2695-2703.

- PERRINO, B. A., FONG, Y. L., BRICKEY, D. A., SAITOH, Y., USHIO, Y., FUKUNAGA, K., MIYAMATO, E. & SODERLING, T. R. (1992). Characterisation of the phosphatase activity of a baculovirus-expressed calcineurin A isoform. *J Biol Chem* **267**, 15965-15969.
- PINTER, K. & GROSS, J. (1995). Calcium and cell-type-specific gene expression in *Dictyostelium*. *Differentiation* **59**, 201-206.
- PODGORSKI, G. J., FRANKE, J., FAURE, M. & KESSIN, R. H. (1989). The cyclic nucleotide phosphodiesterase gene of *Dictyostelium discoideum* utilizes alternate promoters and splicing for the synthesis of multiple mRNAs. *Mol Cell Biol* **9**.
- POLESKY, A. J. M. & O'DAY, D. H. (1995). Calcineurin is involved in the chemotactic response to cAMP but not folate in *Dictyostelium discoideum*. *Mol Biol Cell (Suppl)* **6**, 91a.
- RAPER, K. B. (1935). *Dictyostelium discoideum*, a new species of slime mold from decaying forest leaves. *J Agr Res* **50**, 135-147.
- RAPER, K. B. (1940). Pseudoplasmodium formation and organization in *Dictyostelium discoideum*. *J E Mitchell Sci Soc* **56**, 241-282.
- RAPER, K. B. (1984). *The Dictyostelids*. Princeton University Press, 77-86.
- RAPER, K. B. & FENNELL, D. I. (1952). Stalk formation in *Dictyostelium*. *Bull Torrey Bot Club* **79**, 25-51.
- RASMUSSEN, C., GAREN, C., BRINING, S., KINCAID, R. L., MEANS, R. L. & MEANS, A. R. (1994). The calmodulin-dependent protein phosphatase catalytic subunit (calcineurin A) is an essential gene in *Aspergillus nidulans*. *EMBO J* **13**, 2545-2552.
- RAUCHENBERGER, R., HACKER, U., MURPHY, J., NIEWOHNER, J. & MANIAK, M. (1997). Coronin and vacuolin identify consecutive stages of a late, actin-coated endocytic compartment in *Dictyostelium*. *Current Biology* **7**, 215-218.
- REMILLARD, S. P., LAI, E. Y., LEVY, Y. Y. & C, F. (1995). A calcineurin -B-encoding gene expressed during differentiation of the amoebflagellate *Naegleria gruberi* contains two introns. *Gene* **154**, 39-45.
- RENSTRÖM, E., DING, W. G., BOKVIST, K. & RORSMAN, P. (1996). Neurotransmitter-induced inhibition of exocytosis in insulin-secreting β cells by activation of calcineurin. *Neuron* **17**, 513-522.
- RESH, M. D. (1999). Fatty acylation of proteins: new insights into membrane targeting of myristoylated and palmitoylated proteins. *Biochimica et Biophysica Acta* **1451**, 1-16.
- RIVERO, F., KÖPPEL, B., PERACINO, B., BOZZARO, S., SIEGERT, F., WEIJER, C. J., SCHLEICHER, M., ALBRECHT, R. & NOEGEL, A. (1996). The role of the cortical cytoskeleton: F-actin crosslinking proteins protect against osmotic stress, ensure cell size, cell shape and motility, and contribute to phagocytosis and development. *J Cell Sci* **109**, 2679-2691.
- SACHS, A. B. (1993). Messenger RNA degradation in eukaryotes. *Cell* **74**, 413-421.
- SACHS, A. B. & DAVIS, R. W. (1989). The poly(A) binding protein is required for poly(A) shortening and 60S ribosomal subunit-dependent translation initiation. *Cell* **58**, 857-867.
- SACHS, A. B., SARNOW, P. & HENTZE, M. W. (1997). Starting at the beginning, middle, and end: translation initiation in eukaryotes. *Cell* **89**, 831-838.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F. & MANIATIS, T. (1989). *Molecular cloning. A laboratory manual.*, 2nd Ed edition. Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, New York.
- SCHAAP, P., NEBL, T. & FISHER, P. R. (1996). A slow sustained increase in cytosolic Ca^{2+} levels mediates stalk gene induction by differentiation inducing factor in *Dictyostelium*. *EMBO Journal* **15**, 5177-5183.
- SCHLATTERER, C., GOLLNICK, F., SCHMIDT, E., MEYER, R. & KNOLL, G. (1994). Challenge with high concentrations of cyclic AMP induces transient changes in the cytosolic free calcium concentration in *Dictyostelium discoideum*. *J Cell Sci* **107**, 2107-2115.

- SENGUPTA, D. J., ZHANG, B., KRAEMER, B., POCHART, P., FIELDS, S. & WICKENS, M. (1996). A three-hybrid system to detect RNA-protein interactions *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**, 8496-8501.
- SHARP, P. A. (1994). Split genes and RNA splicing. *Cell* **77**, 805-815.
- SHIBASAKI, F., PRICE, E. R., MILAN, D. & MCKEON, F. (1996). Role of kinases and the phosphatase calcineurin in the nuclear shuttling of transcription factor NF-AT4. *Nature* **382**, 370-373.
- SONNEMANN, J., AICHEM, A. & SCHLATTERER, C. (1998). Dissection of the cAMP induced cytosolic calcium response in *Dictyostelium discoideum*: the role of cAMP receptor subtypes and G protein subunits. *FEBS Letters* **436**, 271-276.
- STELZER, A. (1992). GABA receptors control the excitability of neuronal populations. *Int Rev Neurobiol* **33**, 195-287.
- STEMMER, P. M. & KLEE, C. B. (1994). Dual calcium ion regulation of calcineurin by calmodulin and calcineurin B. *Biochemistry* **33**, 6859-6866.
- STERNFELD, J. & DAVID, C. D. (1982). Fate and regulation of anterior-like cells in *Dictyostelium* slugs. *Dev Biol* **93**, 111-118.
- STEVENS, A. (1998). Endonucleolytic cleavage of RNA at 5' endogenous stem structures by human Flap Endonuclease 1. *Biochem Biophys Res Commun* **251**, 501-508.
- STEWART, A. A., INGBRITSEN, T. S., MANALAN, A., KLEE, C. B. & COHEN, P. (1982). Discovery of Ca²⁺-and calmodulin-dependent protein phosphatase. Probable identity with calcineurin (CaM-BP₈₀). *FEBS Letters* **137**, 80-84.
- SU, Q., ZHAO, M., WEBER, E., EUGSTER, H. P. & RYFFEL, B. (1995). Distribution and activity of calcineurin in rat tissues. Evidence for post-transcriptional regulation of testis-specific calcineurin B. *Eur J Biochem* **230**, 469-474.
- SUN, L., YOUN, H. D., LOH, C., STOLOW, M., HE, W. & LIU, J. O. (1998). Cabin 1, a negative regulator for calcineurin signaling in T lymphocytes. *Immunity* **8**, 703-711.
- TANIDA, I., HASEGAWA, A., IIDA, H., OHYA, Y. & ANRAKU, Y. (1995). Cooperation of calcineurin and vacuolar H⁺-ATPase in intracellular Ca²⁺ homeostasis of yeast cells. *J Biol Chem* **270**, 10113-10119.
- TOMONO, M., TOYOSHIMA, K., ITO, M. & AMANO, H. (1996). Calcineurin is essential for DNA synthesis in Swiss 3T3 fibroblasts. *Biochem J* **317**, 675-680.
- TROPSCHUG. (1997). Calcineurin B amino acid sequence of *Neurospora crassa* directly submitted to data base NCBI. Institut für Biochemie und Molekularbiologie der Universität Freiburg.
- TSIEN, R. W. & TSIEN, R. Y. (1990). Calcium channels, stores, and oscillations. *Annu Rev Cell Biol* **6**, 715-760.
- TUITE, M. F. (1996). Death by decapitation for mRNA. *Nature* **382**, 577-579.
- UEKI, K., MURAMATSU, T. & KINCAID, R. L. (1992). Structure and expression of two isoforms of the murine calmodulin-dependent protein phosphatase regulatory subunit (calcineurin B). *Biochem Biophys Res Commun* **187**, 537-543.
- UNTERWEGER, N. & SCHLATTERER, C. (1995). Introduction of calcium buffers into the cytosol of *Dictyostelium discoideum* amoebae alters cell morphology and inhibits chemotaxis. *Cell Calcium* **17**, 97-110.
- VAN HAASSTERT, P. J. M. (1995). Transduction of the chemotactic cAMP signal across the plasma membrane of *Dictyostelium* cells. *Experientia* **51**, 1144-1154.
- VILLAFRANCA, J. E., KISSINGER, C. R. & PARGE, H. E. (1996). Protein serine/threonine phosphatases. *Curr Opin Biotechnol* **7**, 397-402.
- VINCENT, J. B. & AVERILL, B. A. (1990). Sequence homology between purple acid phosphatases and phosphoprotein phosphatases. *FEBS Letters* **263**, 265-268.
- WANG, J. H. & DESAI, R. (1977). Modulator binding protein. Bovine brain protein exhibiting the Ca²⁺-dependent association with the protein modulator of cyclic nucleotide phosphodiesterase. *J Biol Chem* **252**, 4175-4184.
- WANG, M. G., YI, H., GUERINI, D., KLEE, C. B. & MCBRIDE, O. W. (1996). Calcineurin A alpha (PPP3CA), calcineurin A beta (PPP3CB) and calcineurin B (PPP3R1) are located on

- human chromosomes 4, 10q21-q22 and 2p16-p15 respectively. *Cytogenet Cell Genet* **72**, 236-241.
- WARREN, W. D., PHILLIPS, A. M. & HOWELLS, A. J. (1996). *Drosophila melanogaster* contains both X-linked and autosomal homologues of the gene encoding calcineurin B. *Gene* **177**, 149-153.
- WATANABE, Y., PERRINO, B. A. & SODERLING, T. R. (1996). Activation of calcineurin A subunit phosphatase activity by its calcium-binding B subunit. *Biochemistry* **35**, 562-566.
- WATTS, D. J. & ASHWORTH, J. M. (1970). Growth of myxamoebae of the cellular slime mould *Dictyostelium discoideum* in axenic culture. *Journal of Biochemistry* **119**, 175-182.
- WEISS, A. & LITTMAN, D. R. (1994). Signal transduction by lymphocyte antigen receptors. *Cell* **76**, 263-274.
- WISDOM, R. & LEE, W. (1991). The protein-coding region of *c-myc* mRNA contains a sequence that specifies rapid mRNA turnover and induction by protein synthesis inhibitors. *Genes & Development* **5**, 232-243.
- WITKE, W., NELLEN, W. & NOEGEL, A. (1987). Homologous recombination in the *Dictyostelium* α -actinin gene leads to an altered mRNA and lack of protein. *EMBO J* **6**, 4143-4148.
- WRAY, W., BOULIKAS, T., WRAY, V. P. & HANCOCK, R. (1981). Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. *Anal Biochem* **118**, 197-203.
- YANISCH-PERRON, C., VIEIRA, J. & MESSING, J. (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequence of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**, 103-119.
- YAZDANBAKHSH, K., CHOI, J. W., LI, Y., LAU, L. F. & CHOI, Y. (1995). Cyclosporin A blocks apoptosis by inhibiting the DNA binding activity of the transcription factor Nur77. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**, 437-441.
- YOSHIDA, T., TODA, T. & YANAGIDA, M. (1994). A calcineurin-like gene *ppb1+* in fission yeast: mutant defects in cytokinesis, cell polarity, mating and spindle pole body positioning. *J Cell Sci* **107**, 1725-1735.
- YOUNG, R. A. & DAVIS, R. W. (1983). Efficient isolation of genes by using antibody probes. *Proc Natl Acad Sci USA* **80**.
- YUMURA, S., FURUYA, K. & TAKEUCHI, I. (1996). Intracellular free calcium responses during chemotaxis of *Dictyostelium* cells. *J Cell Sci* **109**, 2673-2678.

Ich möchte mich bedanken...

bei Herrn Prof. Dr. D. Malchow für die Möglichkeit diese Arbeit in seiner Gruppe anzufertigen und für das immer vorhandene Interesse,

bei Rupert Mutzel für die Überlassung des Themas, die vielen guten Ideen und den großen Freiraum für eigenständiges Arbeiten,

bei der gesamten Arbeitsgruppe für das herzliche Arbeitsklima,

bei Annette Bäuerle für die Tipps beim Sequenzieren "per Hand", beim Screenen und für die Überlassung der Schleimpilzextrakte,

bei Ursula Kessen für die gute Zusammenarbeit an der "Calcineurin Front" in M1042 und für das gereinigte Calcineurin A,

bei Antje Walz für die Tipps bei der Herstellung des Antiserums und bei der Proteinreinigung,

bei Christina Schlatterer und Ralph Schaloske für das Korrekturlesen,

bei Prof. Dr. M. Véron und Heike Dammann für die Möglichkeit des Aufenthalts am Pasteur Institut in Paris,

beim SFB 156 für die Unterstützung,

und natürlich bei meinen Eltern.