



**Interaktion von TRPC-Ionenkanälen mit dem Immunophilin**

**FKBP52**

**Interaction of TRPC ion channels with the immunophilin**

**FKBP52**

Dissertation zur Erlangung des medizinischen Doktorgrades  
der Graduate School of Life Sciences,  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg,  
Klasse Biomedizin.

Vorgelegt von

**Patrick-Pascal Holger Strunz**

aus

**Naila**

Würzburg, im Oktober 2019.

**Eingereicht am: Würzburg, 14.10.2019**

Bürostempel

**Mitglieder des Promotionskomitees:**

<b>Vorsitzende/r:</b>	<b>Prof. Dr. med. Martina Prelog</b>
<b>1. Betreuer:</b>	<b>PD Dr. rer. nat. Petra Eder-Negrin</b>
<b>2. Betreuer:</b>	<b>Prof. Dr. rer. nat. Erhard Wischmeyer</b>
<b>3. Betreuer:</b>	<b>Prof. Dr. med. Brenda Gerull</b>

**Tag des Promotionskolloquiums: Würzburg, 14.05.2020**

**Doktorurkunde ausgehändigt am:.....**

**Der Promovend ist Arzt.**

**pro matre mea - Für meine Mutter**

## Zusammenfassung

**Einleitung:** TRPC-Kanäle spielen eine wichtige Rolle in der Pathologie der Herzinsuffizienz und kardialen Hypertrophie. Diese Effekte werden unter anderem über den Calcineurin-NFAT-Signalweg vermittelt. Ein wichtiger Interaktionspartner und Regulator von TRPC-Kanälen ist das Protein FKBP52. Mittels eines Yeast Two-Hybrid Systems wurde in einer kardialen cDNA library eine Interaktion zwischen einem C-terminalen Fragment von TRPC3 (AS 742-848), welches außerhalb der bekannten FKBP-Bindungsdomäne (AS 703-714) liegt, und FKBP52 beobachtet. Da dies eine weitere Bindungsstelle in FKBP52 vermuten ließ, erzeugten wir ein Fragment von FKBP52, welches FKBP52s genannt wurde und dem die funktionell relevante PPIase I-Domäne mit der bekannten Bindungsstelle fehlt. Eine erste Co-IP zwischen diesem Fragment und TRPC3 war erfolgreich.

**Ziel:** Die Bestimmung, ob die Anwesenheit des verkürzten FKBP52 *in vivo* die Komplexbildung aus TRPC3 bzw. TRPC4 und dem Wildtyp-FKBP52 unterdrückt. Zusätzlich, ob FKBP52s die Interaktion zwischen TRPC3 bzw. TRPC4 und Calcineurin *in vivo* unterbricht und damit die Aktivierung des Calcineurin-NFAT-Signalweges hemmt.

**Methoden:** Co-Immunopräzipitationen (Co-IP) wurden mit HEK-293-Zellen durchgeführt, die mit cDNA transfiziert wurden, welche Gene für TRPC3, TRPC4, Calcineurin A und FKBP52s enthielt. Zur Bestimmung der nukleären Translokation von NFATc1 mittels Fluoreszenzmikroskopie wurden HEK-293-Zellen mit TRPC3, TRPC4, GFP-NFATc1  $\pm$  FKBP52s transfiziert. Die statistische Analyse erfolgte mit einer One-Way ANOVA.

**Ergebnisse:** In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass FKBP52 sowohl

mit TRPC3 als auch mit TRPC4 interagiert. Ebenso wurde festgestellt, dass FKBP52 auch ohne seine katalytische PPIase I-Domäne Bindungen mit TRPC3 bzw. TRPC4 eingeht. Dieses FKBP52-Konstrukt nimmt ebenso an der Komplexbildung mit TRPC3 bzw. TRPC4 und Calcineurin teil. Des Weiteren ließ sich für TRPC3 zeigen, dass unter Stimulation mit Carbachol (GPCR-Agonist) bei Anwesenheit dieses gekürzten FKBP52 eine signifikant geringere Aktivierung und Wanderung des Transkriptionsfaktors NFAT in den Nucleus erfolgte.

**Schlussfolgerung:** FKBP52 spielt daher eine wichtige Rolle in dieser Signalkaskade, indem es entscheidend an der Aktivierung von Calcineurin und dessen Rekrutierung zum TRPC-Kanalkomplex beteiligt ist und damit auch an der Aktivierung des Calcineurin-NFAT-Signalweges.

## Abstract

**Background:** TRPC channels play an important role in the pathology of heart failure and cardiac hypertrophy. These effects are partly mediated by the calcineurin-NFAT signaling pathway. An important binding partner and regulator of TRPC channels is the protein FKBP52. Using a Yeast Two-Hybrid System in a cardiac cDNA library, we have recently found an interaction between a C-terminal fragment of TRPC3 (aa 742-848) without the known FKBP binding site (aa 703-714) and FKBP52 indicating a new binding domain. After creation of a FKBP52 fragment – called FKBP52s -, lacking the functional relevant PPIase domain with the known binding site, a first immunoprecipitation between this fragment and TRPC3 was successful.

**Aim:** To analyze whether the presence of the truncated FKBP52 *in vivo* suppresses complex formation between TRPC3 or TRPC4 and the wild-type FKBP52. In addition, whether FKBP52s interrupts assembling between TRPC3 or TRPC4 and calcineurin *in vivo* and so activation of the calcineurin-NFAT pathway.

**Methods:** Co-immunoprecipitation (Co-IP) experiments were performed in HEK 293 cells which were transfected with cDNAs encoding TRPC3, TRPC4, calcineurin A and FKBP52s. For detecting the translocation of NFATc1 into the nucleus by fluorescence microscopy, HEK 293 cells were transfected with TRPC3, TRPC4, GFP-NFATc1  $\pm$  FKBP52s. Statistical analysis was performed by one-way ANOVA.

**Results:** In this study it was demonstrated for the first time that FKBP52 interacts not only with TRPC4 but also with TRPC3. Additionally, it was shown that a protein fragment of FKBP52 without its PPIase I domain also

binds TRPC3 and TRPC4. This PPIase-deficient FKBP52 protein takes part in complex formation between TRPC3 and TRPC4, respectively, and calcineurin. Furthermore, it was shown for TRPC3 that in presence of this FKBP52 fragment, the activation of calcineurin and nuclear translocation of NFAT was significantly reduced after stimulation with carbachol (GPCR-agonist).

**Conclusion:** Thus, FKBP52 is important in this signaling cascade by assembling calcineurin to the TRPC channel complex and thus also in the activation of the calcineurin-NFAT signaling pathway.

# Inhaltsverzeichnis

## Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung/ Abstract

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abkürzungsverzeichnis .....	V
1 Einleitung.....	1
1.1 Volkskrankheit Herzinsuffizienz .....	1
1.2 Die Rolle von TRPC-Kanälen in der Entstehung und Aufrechterhaltung der Herzinsuffizienz.....	2
1.3 Modulation von TRPC-Kanälen durch Immunophiline .....	9
1.4 Aufgabenstellung .....	16
2 Material und Methoden.....	17
2.1 Material .....	17
2.1.1 Geräte.....	17
2.1.2 Programme.....	19
2.1.3 Verbrauchsmaterialien.....	20
2.1.4 Chemikalien, Lösungen und Puffer.....	21
2.1.5 Medien .....	27
2.1.6 Kits.....	28
2.1.7 Antikörper.....	29
2.1.8 Enzyme .....	30



## Inhaltsverzeichnis

2.1.9	Plasmide.....	31
2.1.10	Primer .....	31
2.1.11	Rekombinante Proteine und Konstrukte .....	32
2.1.12	Bakterienstämme .....	32
2.1.13	Zelllinien .....	32
2.2	Methoden .....	33
2.2.1	Molekularbiologische Methoden.....	33
2.2.1.1	Die Transformation und Kultivierung von <i>Escherichia coli</i> ..	33
2.2.1.2	Aufreinigung der Plasmid-DNA .....	34
2.2.1.3	Bestimmung der DNA-Konzentration und Reinheit.....	34
2.2.1.4	Klonierung zur Herstellung eines Adenovirus von FKBP52s .	35
2.2.1.4.1	Sequenzierung des Plasmids HA-FKBP52s.....	35
2.2.1.4.2	Polymerase-Kettenreaktion des FKBP52s-Gens.....	36
2.2.1.4.3	Kontroll-Gelelektrophorese des PCR-Produkts .....	37
2.2.1.4.4	Reinigung des PCR-Produkts .....	37
2.2.1.4.5	Restriktionsverdau des PCR-Produkts und von pENTR 3C .....	38
2.2.1.4.6	Kontroll-Gelelektrophorese des Restriktionsverdaus.....	39
2.2.1.4.7	Elution von DNA-Fragmenten aus dem Gel .....	40
2.2.1.4.8	DNA-Ligation .....	41
2.2.1.4.9	Transformation von X-Cell Gold .....	41
2.2.1.4.10	Mini-Prep .....	42
2.2.1.4.11	Restriktionsverdau und Gelelektrophorese des Mini-Prep-Produkts .....	42
2.2.1.4.12	Abschließende Sequenzierung des FKBP52s-Gens .....	43
2.2.2	Zellkultur und proteinbiochemische Methoden .....	45
2.2.2.1	Zellkultur .....	45

## Inhaltsverzeichnis

2.2.2.2 Herstellung eines Proteinlysats .....	45
2.2.2.3 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford.....	46
2.2.2.4 Co-Immunopräzipitation .....	47
2.2.2.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....	49
2.2.2.6 Western Blot und Detektion.....	50
2.2.2.7 Quantitative Auswertung der Co-IPs .....	51
2.2.3 Fluoreszenzmikroskopie.....	51
3 Ergebnisse .....	55
3.1 Bindungsverhalten zwischen FKBP52 und TRPC3/4 in Abhängigkeit der Anwesenheit von FKBP52s .....	55
3.2 Einfluss von FKBP52s auf den Calcineurin-Signalweg.....	60
3.2.1 Protein-Protein-Interaktionen zwischen TRPC3 bzw. TRPC4, Calcineurin A und FKBP52s .....	60
3.2.2 Ergebnisse der Fluoreszenzmikroskopie .....	68
4 Diskussion.....	77
4.1 Die Bindung zwischen FKBP52 und TRPC3 bzw. TRPC4 .....	77
4.2 Einfluss von FKBP52 auf den Calcineurin-Signalweg .....	82
4.3 Ausblick .....	89
Literaturverzeichnis.....	VII
Abbildungsverzeichnis .....	XIII

## Inhaltsverzeichnis

Tabellenverzeichnis.....	XV
Anhang .....	XVI
Danksagung .....	XXI
Lebenslauf .....	XXII
Eidesstattliche Erklärung.....	XXIV

## Abkürzungsverzeichnis

### Abkürzungsverzeichnis

AChR	Acetylcholinrezeptor
AG	Arbeitsgruppe
Aqua a. i.	Aqua ad iniectabilia
AS	Aminosäure
bp	Basenpaar
°C	Grad Celsius
Ca <sup>2+</sup>	Calcium
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
CaN A	Calcineurin A
CFP-	Cyan fluorescent protein-
CIRB	Calmodulin-IP <sub>3</sub> -Rezeptor
	Bindungsdomäne
Co-IP	Co-Immunopräzipitation
DNA/DNS	Desoxynukleinsäure
FKBP52	FK506 binding Protein 52
FKBP52s	FK506 binding Protein 52 short
GFP-	Green fluorescent protein-
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
Gq	Alpha Untereinheit eines G-Protein gekoppelten Rezeptors, welche die Phospholipase C $\beta$ stimuliert
HA	Hämagglutinin
HEK-293-Zellen	Human Embryonic Kidney 293 cells
IP <sub>3</sub>	Inositol 3-phosphat
IP	Immunopräzipitation
Kat-Nr.	Katalognummer

## Abkürzungsverzeichnis

kDa	Kilodalton
Konz.	Konzentration
L	Leiter, Proteinstandard
mg	Milligramm
mm	Millimeter
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
NFAT	Nuclear factor of activated T-cells
nm	Nanometer
Nr.	Nummer
PKC	Proteinkinase C
PPIase	Peptidyl-Prolyl-cis-trans-Isomerase
RPM	Rotations per minute, Umdrehungen pro Minute
Tab.	Tabelle
TPR	Tetratricopeptid Repeat
TRPC	Transient Receptor Potential canonical channel
untersch.	Unterschiedlich
V	Volt
v.a.	vor allem
Vgl.	Vergleiche
WB	Western Blot
WT-	Wildtyp-
Y2H	Yeast Two-Hybrid System
YFP-	Yellow fluorescent protein-

### 1 Einleitung

#### 1.1 Volkskrankheit Herzinsuffizienz

Unter Herzinsuffizienz versteht man nach der Nationalen Versorgungsleitlinie für Herzinsuffizienz die Unfähigkeit des Herzens, den Organismus mit ausreichend Blut und Sauerstoff zur Aufrechterhaltung der Vitalfunktionen und des Stoffwechsels zu versorgen, was zu komplexen neurohumoralen Kompensationsmechanismen führt, die letztlich in strukturellen Veränderungen am Herzen münden. Diese Definition kann noch beliebig erweitert werden nach klinischen, ätiologischen und epidemiologischen Gesichtspunkten, sodass sich eine heterogene Krankheitsgruppe ergibt (1). Die chronische Herzinsuffizienz stellt eine häufige Erkrankung im Gesundheitswesen dar, wobei die genauen Zahlen schwer zu fassen sind, da „chronische Herzinsuffizienz“ unterschiedlich definiert ist und dadurch die Zahlen schwanken (1) (2). Die Erkrankungshäufigkeit nimmt mit steigendem Lebensalter zu, die Inzidenz liegt im Moment für Männer bei etwa 375 und für Frauen bei 290 Neuerkrankungen pro 100 000 Einwohner und pro Jahr (1) (2) (3). Seit Jahren steigen die Herzinsuffizienzfallzahlen im deutschen Gesundheitswesen: So stiegen die stationären Fälle beispielsweise von 2000 bis 2006 von 240000 auf 335000 an und damit ist die Herzinsuffizienz bei Frauen die häufigste und bei Männern die dritthäufigste Hauptdiagnose bei Krankenhausaufenthalten (1) (4). Bei den Todesursachen rangiert die Herzinsuffizienz unverändert auf Rang drei (1) (4). Dadurch entstanden dem deutschen Gesundheitswesen im Jahre 2006 Kosten in Höhe von 2,9 Milliarden Euro allein durch die

Diagnose Herzinsuffizienz (1) (4). Da in Folge des demografischen Wandels der Anteil der älteren Menschen an der Gesellschaft immer größer werden wird und bei dieser Gruppe die Diagnose Herzinsuffizienz häufiger vorkommt, werden die Kosten in den nächsten Jahren voraussichtlich weiter ansteigen (1) (4) (5). Die aktuellen Therapieempfehlungen der Herzinsuffizienz nach Leitlinie unterscheiden zwischen kausaler, symptomatischer und prognoseverbessernder Therapie, wobei die beiden letztgenannten Bereiche die Domäne der Pharmakotherapie darstellen (1). Aus oben genannten epidemiologischen und ökonomischen Gesichtspunkten liegt es daher nahe, nach weiteren pharmakologischen und kausalen Therapieoptionen für das vorwiegend alte Patientenkollektiv zu suchen. Auf der Suche nach möglichen molekularen Targets haben sich in letzter Zeit die TRPC-Kationenkanäle als vielversprechendes Therapieziel offenbart (6) (7) (8) (9).

### 1.2 Die Rolle von TRPC-Kanälen in der Entstehung und Aufrechterhaltung der Herzinsuffizienz

TRP ist die Abkürzung für Transient Receptor Potential und bezeichnet das ursprünglich bei einer Mutanten der Fruchtfliege *Drosophila Melanogaster* beobachtete Phänomen, dass sich bei Beleuchtung der Retinazellen nur ein vorübergehender (transienter) Membranstrom auslösen ließ, der trotz weiterer Beleuchtung innerhalb kürzester Zeit sistierte (6) (10). Später wurde als Grundlage für dieses Phänomen ein Kationenkanal gefunden, der daraufhin den Namen TRP bekam (6) (11). Bisher konnten 28 homologe Gene bei Säugetieren gefunden werden, die eine Einteilung in sieben

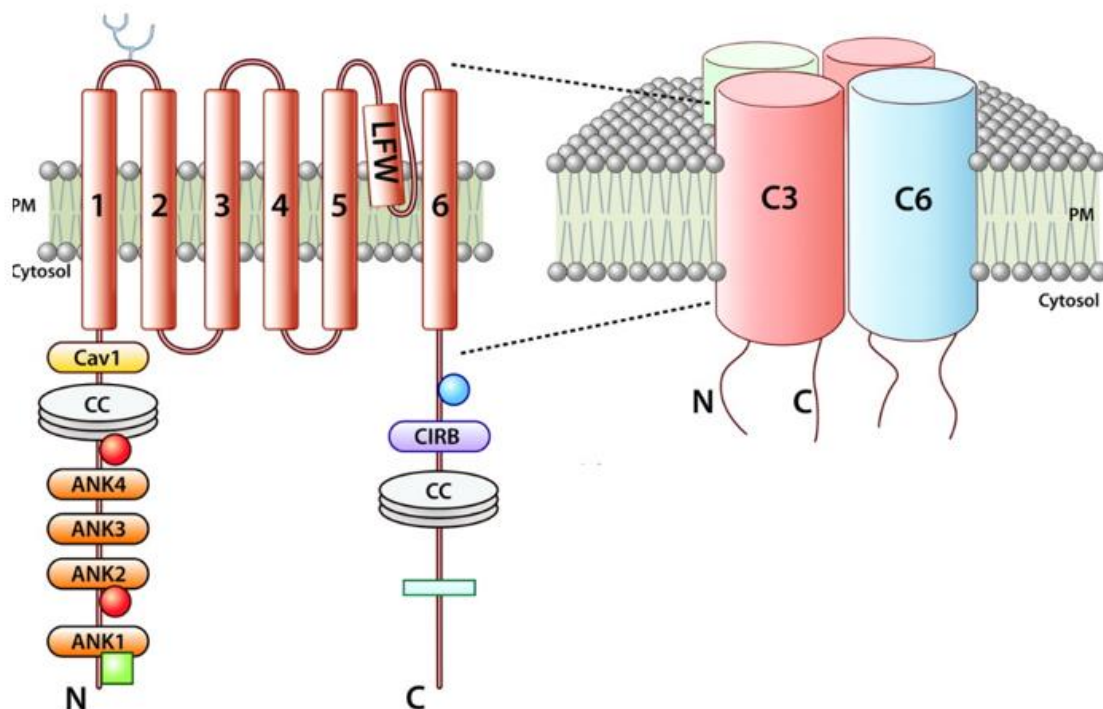
## Einleitung

Untergruppen ermöglichen und deren Gemeinsamkeit sechs Transmembrandomänen mit einer Kanalpore zwischen der fünften und sechsten Transmembranregion und zytosolische C- und N-Termini mit unterschiedlichen Interaktionsstellen für weitere Moleküle darstellen (Abbildung 1) (6). Die bisher bekannten Subfamilien sind: TRPN (NOMPC), TRPC (C für canonical/kanonisch), TRPM (Melastatin), TRPV (Vanilloid), TRPP (Polycystin), TRPA (Ankyrin) und TRPML (Mucolipin) (6) (34). Diese Proteine stellen breite physiologische Funktionen sicher und kommen in annähernd jedem Gewebe vor (6). Von Interesse für die kardiale Hypertrophie und Herzinsuffizienz sind besonders die Vertreter der TRPC-Familie (7) (8) (9). Diese Familie besteht aus sieben Isoformen, wobei TRPC2 ein Pseudogen ist, welches beim Menschen nicht exprimiert wird (6) (9) (12). Die sechs Untereinheiten können noch einmal weiter in zwei funktionell ähnliche Gruppen differenziert werden, da sich nur innerhalb dieser Gruppen die TRPCs miteinander zu homomeren oder heteromeren Tetrameren zusammenlagern, nämlich TRPC1/4/5 und TRPC3/6/7 (Abbildung 1) (12). Diese Kanal-Tetramere, besonders TRPC3/6/7, zeigen einen basalen glykosilierungsabhängigen Kationeneinstrom (13). Dieser Kationeneinstrom kann weiterhin durch Gq-Protein gekoppelte Stimulation (GPCR) mittels DAG (14) oder mittels Assemblierung mit dem durch IP<sub>3</sub> aktivierten IP<sub>3</sub>-Rezeptor gesteigert werden (Abbildung 2, Abbildung 3) (15). Die TRPC Aktivität wird weiterhin durch Homer reguliert, indem es bei Bindung TRPC in einem inaktiven Zustand hält und bei Ca<sup>2+</sup>-Speicher-Entleerung oder Agonistenstimulation vom Kanal wegdiffundiert und somit den Ca<sup>2+</sup>-Einstrom ermöglicht (Abbildung 4) (16) (17). Weiterhin ist immer noch nicht abschließend geklärt, ob TRPC-Kanäle vornehmlich eine Rolle im Rezeptor vermittelten Ca<sup>2+</sup>-Einstrom (ROCE) spielen oder den Speicher



## Einleitung

regulierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom (SOCE) vermitteln (6). Tendenziell scheint die Subgruppe um TRPC3/6/7 eher durch DAG aktiviert zu werden und damit wichtiger für den ROCE zu sein, während die  $\text{IP}_3$ -Rezeptor sensitive Untergruppe TRPC1/4/5 an der Vermittlung des SOCE teilnimmt (Abbildung 2, Abbildung 3) (9).



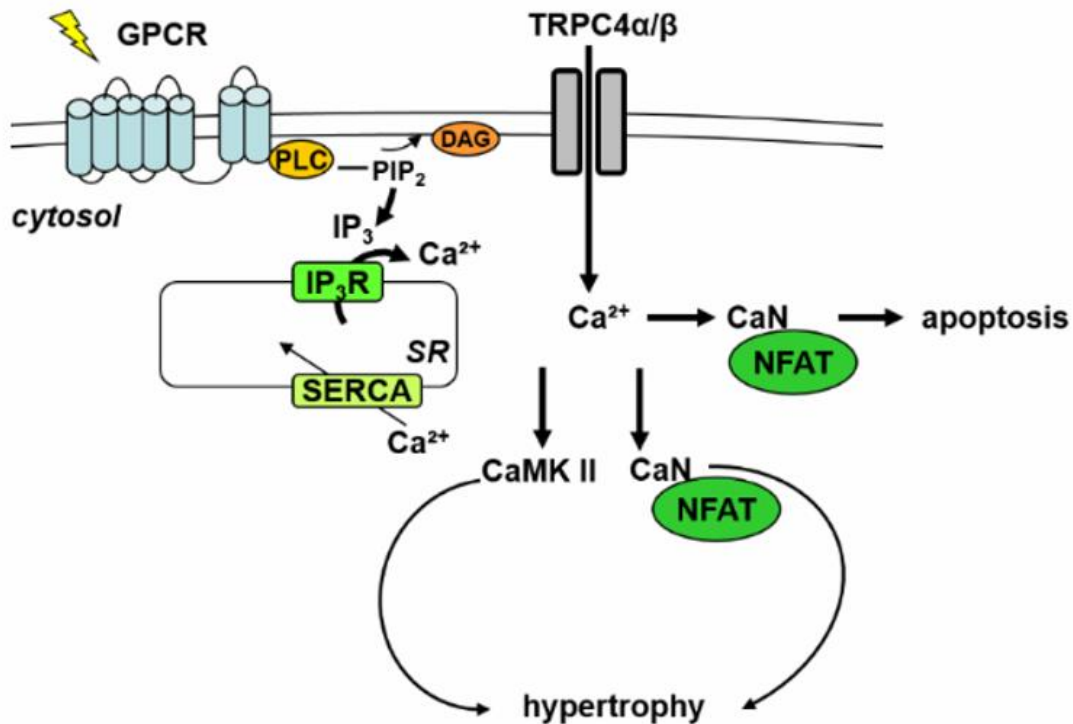
**Abbildung 1: Schematische Darstellung von TRPC-Kanälen**

Die Abbildung illustriert die Struktur von TRPC-Kanälen. TRPC-Untereinheiten bilden ein Tetramer aus vier Untereinheiten als aktiven Kanal in der Plasmamembran (rechts). Ein TRPC3-Monomer besteht aus sechs Transmembrandomänen und einem intrazellulären N- und C-Terminus (links).

(Quelle: Eder P, Molkentin JD. TRPC Channels as Effectors of Cardiac Hypertrophy. *Circ Res.* 2011 Jan 21;108(2):265-72. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.110.225888.)

Trotzdem besitzen alle TRPC-Kanäle eine Calmodulin-IP<sub>3</sub>-Rezeptor-Bindungsdomäne (CIRB), sodass auch TRPC3/6/7 mit diesem Rezeptor und mit Calmodulin interagieren (6) (18). Letztlich nehmen beide Aktivierungswege, entweder über IP<sub>3</sub> oder DAG, ihren Ursprung in der Aktivierung der Gq-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCR), welche die Ziele der bei Herzinsuffizienz vermehrt gebildeten neurohumoralen Stresshormone Noradrenalin, Angiotensin II oder Endothelin sind (1) (19) (20). Zudem spielen TRPC-Kanäle eine wichtige Rolle als Sensor und Regulator der Wandspannung und des mechanischen Stresses an der Gefäßwand (21) (22) (23). Es konnte gezeigt werden, dass TRPC-Kanäle auch am Herzen, in den peripheren Bereichen der Plasmamembran von Kardiomyozyten, vorkommen und hier bei Hypertrophie und Herzinsuffizienz vermehrt exprimiert werden (7) (9) (24) (25) (26). Auch am menschlichen insuffizienten Herzen konnte eine erhöhte Expression von TRPC5 nachgewiesen werden (6) (24). Für TRPC1 und TRPC3 konnte ebenfalls bestätigt werden, dass eine für eine Herzinsuffizienz typische neurohumorale Stimulationssituation von Kardiomyozyten mit Hormonen, wie Angiotensin II, Katecholaminen oder Endothelin I, zur Zunahme von TRPC-Kanälen in den Kardiomyozyten führt (25) (27). Nicht nur eine erhöhte Expression von TRPC-Kanälen bei Herzinsuffizienz war nachweisbar, sondern auch deren kausale Rolle bei der Entstehung und Aufrechterhaltung der Krankheitsprozesse. Dies konnte mittels TRPC3- und TRPC6-überexprimierender, transgener Mäuse dargestellt werden, welche nicht nur empfänglicher für herzinsuffizienzbedingende Stressreize, wie erhöhte Nachlast oder neurohumorale Stimulation, waren, sondern auch unter normalen Bedingungen Kardiomegalie, Fibrose und ventrikuläre Dilatation zeigten (7) (8).

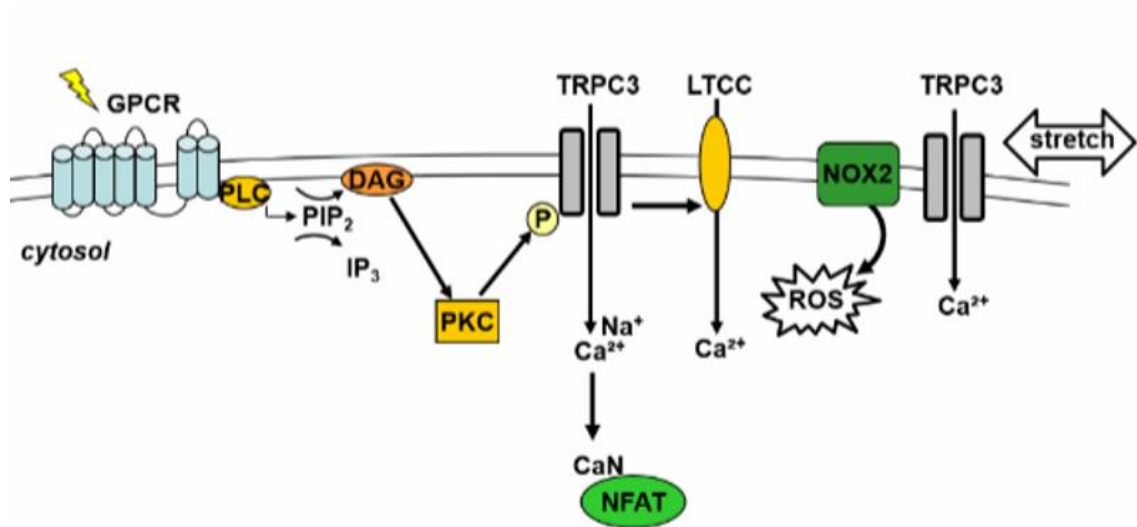
## Einleitung



**Abbildung 2: Modulation von kardialen Zellfunktionen durch TRPC4**

Die Abbildung illustriert, wie TRPC4 Bestandteil der neurohumoralen Kompensations- und Pathomechanismen bei Herzinsuffizienz ist. TRPC4 wird durch Gq-protein coupled receptor Signale (GPCR), wie z.B. durch Angiotensin II oder Noradrenalin, aktiviert und erzeugt seinerseits einen Ca<sup>2+</sup>-Einstrom, der zur Aktivierung von Calcineurin A (CaN) und damit des nuclear factor of activated T-cells (NFAT) und der Serine/Threonine Kinase Ca<sup>2+</sup> /calmodulin- dependent protein kinase II (CamKII) führt. Neben den prohypertrophen Effekten scheint TRPC4 auch proapoptotische Effekte auszuüben. Dies konnte für beide Splicing-Varianten gleichermaßen gezeigt werden. DAG, Diacylglycerol; GPCR, Gq-protein coupled receptor; IP<sub>3</sub>, Inositol 3-phosphat; IP<sub>3</sub>R, Inositol 3-phosphat Rezeptor; PIP<sub>2</sub>, Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat; PLC, Phospholipase C; Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase (SERCA).

(Quelle: Eder P. Cardiac Remodeling and Disease: SOCE and TRPC Signaling in Cardiac Pathology. [Hrsg.] K Groschner, W Gaier und C Romanin. Store-Operated Ca<sup>2+</sup> Entry (SOCE) Pathways. Advances in Experimental Medicine and Biology, vol 993. Cham : Springer, 2017, S. 505-521.)



**Abbildung 3: Modulation von kardialen Zellfunktionen durch TRPC3**

TRPC3 wird am wahrscheinlichsten durch Gq-protein coupled receptor (GPCR) Signale, wie zum Beispiel Angiotensin II oder Katecholamine, in Form des sogenannten Rezeptor-vermittelten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms (ROCE) aktiviert, unabhängig vom Füllungszustand der  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher (SOCE). Phosphorylierung durch die Proteinkinase C (PKC) führt zu einer engen Interaktion mit Calcineurin (CaN) mit darauffolgender Aktivierung von CaN und des nuclear factor of activated T-cells (NFAT). Die Inhibition der PKC unterbricht diese Interaktion und überträgt den TRPC3-vermittelten Kationeneinstrom auf eine erhöhte Aktivität des L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals (LTCC). Mechanischer Stress aktiviert möglicherweise ebenfalls TRPC3, was zu einem verminderten Abbau der NADPH oxidase 2 (NOX2) durch Proteasomen beiträgt und damit die Bildung von reactive oxygen species (ROS) fördert. DAG, Diacylglycerol; GPCR, Gq-protein coupled receptor;  $\text{IP}_3$ , Inositol 3-phosphat;  $\text{IP}_3\text{R}$ , Inositol 3-phosphat Rezeptor;  $\text{PIP}_2$ , Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate; PLC, Phospholipase C; Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase (SERCA).

(Quelle: Eder P. Cardiac Remodeling and Disease: SOCE and TRPC Signaling in Cardiac Pathology. [Hrsg.] K Groschner, W Gaier und C Romanin. Store-Operated  $\text{Ca}^{2+}$  Entry (SOCE) Pathways. Advances in Experimental Medicine and Biology, vol 993. Cham : Springer, 2017, S. 505-521.)

## Einleitung

Dabei gelang Nakayama und Kollegen die Beobachtung, dass TRPC3-überexpremierende, transgene Mäuse, welche, wie auf Seite 5 erwähnt, Herzschwäche entwickelten und empfänglicher für neurohumorale Stimulation waren, nach einem Knock-out des Calcineurin A $\beta$ -Gens vor der Entwicklung dieser Erkrankung geschützt waren (8). Dies legt die Vermutung nahe, dass für die vorher beschriebenen Prozesse der Calcineurin–NFAT-Signalweg eine wichtige Rolle spielt. Die Phosphatase Calcineurin (CaN) wird durch Ca<sup>2+</sup>-Einstrom aktiviert, welcher durch die TRPC-Kanäle mitgetragen wird, und aktiviert daraufhin via Dephosphorylierung NFAT, einen Transkriptionsfaktor, welcher in den Nucleus wandert und dort prohypertrophe und herzinsuffizienzfördernde Gene aktiviert (6). Interessanterweise aktivieren TRPC-Kanäle nicht nur den Transkriptionsfaktor NFAT, sondern werden durch diesen selbst hochreguliert, da die Promoter der TRPC1-,3- und 6-Gene ebenfalls NFAT-Bindestellen aufweisen (7) (25). Somit kann das Ganze als ein sich selbstverstärkender Prozess angesehen werden. Diese Interaktion mit der Phosphatase Calcineurin birgt interessante Möglichkeiten, in den oben geschilderten Prozess einzugreifen. Calcineurin kann heute schon effektiv durch Medikamente, wie Ciclosporin A und Tacrolimus, in seiner Aktivität gehemmt werden (28). Tacrolimus (FK506) vermittelt seine Wirkung über eine Gruppe von Proteinen, die als Immunosuppressiva bezeichnet werden. Von diesen Molekülen ist bekannt, dass sie auch direkt mit TRPC-Kanälen interagieren können (29), weshalb es lohnend ist, diese Interaktion näher zu untersuchen, um mögliche neue pharmakologische Angriffsziele zu finden.

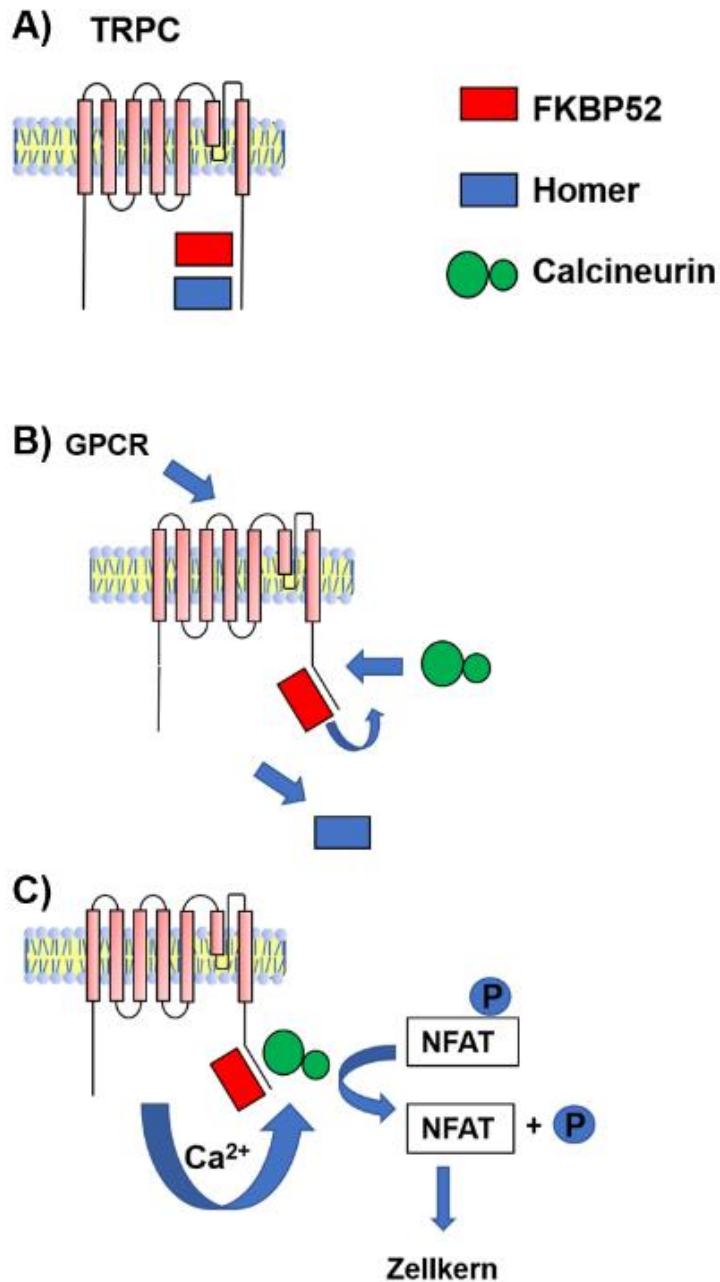
### 1.3 Modulation von TRPC-Kanälen durch Immunophiline

Immunophiline stellen eine Gruppe von drei unterschiedlichen Proteinfamilien dar, deren Gemeinsamkeit Chaperon-Aktivität (PPIase-Aktivität = Peptidyl-Prolyl-cis-trans-Isomerase Aktivität) ist: Die erste Gruppe sind die Cyclophiline (CYP), welche Cyclosporin A binden, die zweite Gruppe stellen die FKBP (Kurzform für FK506 binding proteins) dar, welche durch Tacrolimus (FK506) gehemmt werden, und die letzte Gruppe sind die FCBPs, welche sowohl mit Cyclosporin A als auch mit Tacrolimus interagieren (30) (31) (32). Von Interesse für die Interaktion mit TRPC-Kanälen sind besonders die FKBP, von denen nachgewiesen wurde, dass sie direkt mit TRPC-Kanälen in Wechselwirkung treten können (29). Sinkins und Kollegen konnten via Immunoprecipitation demonstrieren, dass in Neuronen von Ratten FKBP52 an TRPC1, 4 und 5 bindet und FKBP12 an TRPC3, 6 und 7 (29). Auf Grund von früheren Untersuchungen an *Drosophila* und deren Signalkomplex für die Phototransduktion (33) und der Tatsache, dass es sich um PPIase-aktive Enzyme handelt, wird eine prolinreiche Sequenz am C-Terminus von TRPCs im Bereich der sogenannten TRP Box II als mögliche Bindungsdomäne angenommen (29) (34). In dieser neun Aminosäuren umfassenden Sequenz befindet sich an Position eins und zwei ein LP-Motiv, welches phylogenetisch hoch konserviert ist und sich bei allen TRPC-Kanälen findet (Tabelle 2) (29) (34). An Position acht und neun findet sich eine zweite prolinhaltige Aminosäuresequenz, die in allen TRPCs enthalten ist und von der Sinkins und Kollegen annahmen, dass diese die TRPC-Subgruppenspezifische Bindung bestimme, da in allen FKBP12-bindenden TRPCs ein Valin mit Prolin und in allen FKBP52-bindenden TRPCs Isoleucin mit Prolin gepaart

ist (Tabelle 2) (29). Jedoch konnte nicht gezeigt werden, dass ein Austausch dieser zweiten prolinreichen Sequenzen untereinander die gruppenspezifische Bindung oder gar die Bindung von TRPCs an FKBP aufhebt (29). Folglich müssen noch andere Molekülteile von TRPC und FKBP an der Bindung der Immunophiline beteiligt sein. Ein Austausch des ersten Prolins an Position eins durch Glutamin unterbrach in diesen Versuchen die Interaktion zwischen den FKBP und TRPCs (29). Die Interaktion ließ sich in dieser Arbeit auch durch Zugabe von Tacrolimus als FKBP-Inhibitor aufheben, welches ein prolinhaltiges Motiv nachahmt, was wiederum die Relevanz dieses Motives für die Interaktion von FKBP mit ihren Targets unterstreicht (29). Dass diese Interaktionen nicht nur struktureller Natur sind, sondern auch funktionellen Charakter haben, wird ebenfalls durch oben genannte Arbeit untermauert: HEK-293-Zellen mit stabiler TRPC6-Expression wiesen niedrigere Zellmembranströme nach Carbachol-Stimulation (GPCR-stimulierender Agonist (19) (20)) auf, wenn Tacrolimus hinzugegeben wurde. Nach 3 Minuten Messzeit näherten sich die Stromflussniveaus beider Versuchsbedingungen (+Tacrolimus und - Tacrolimus) wieder auf einem im Vergleich zum Ausgangswert erhöhten Niveau an. Ohne Carbachol-Stimulation zeigte sich kein Einfluss von Tacrolimus auf die Stromdichte an der Membran, was den Schluss nahelegt, dass FKBP-Vertreter eine Rolle für die Kanalöffnung vor allem unter Agonistenstimulation spielen (29). Shim und Kollegen gingen noch einen Schritt weiter und postulierten, dass FKBP52 auch eine zweite Bindungsstelle am N-Terminus von TRPC1 zwischen den Aminosäuren 19LPSSP23 besäße und dass diese beiden Bindungsstellen am N- und C-Terminus mit den Bindungsstellen von Homer überlappen (28). Von den Proteinen der Homerfamilie ist bekannt, dass sie TRPC-Kanäle in einem

inaktiven Zustand halten (16). Des Weiteren wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass FKBP52 spontanen Kanalöffnungen vorbeugt und den Membranstrom vor allem unter GPCR-Agonistenstimulation steigert (28). FKBP12 verhielt sich in dieser Arbeit gegensätzlich und förderte lediglich das stimulusunabhängige Gating (28). Auch wurde nachgewiesen, dass die Kanalöffnung direkt von einer intakten PPIase-Funktion abhängt und nicht durch FKBP-Bindung an TRPC1 allein erklärt wird (28). Auch in menschlichen Thrombozyten konnte eine Interaktion und Regulation von TRPC1 durch FKBP52 nachgewiesen werden (35). Es wurde demonstriert, dass durch Hemmung von FKBP52 via Tacrolimus vermehrt  $\text{Ca}^{2+}$  bei Zugabe von SERCA-Hemmstoffen wie Thapsigargin aus dem ER freigesetzt wird und dass der SOCE durch Tacrolimuszugabe verringert wird (35). Dazu passend zeigten López und Kollegen, dass FKBP52 wichtige Funktionen in der Bildung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanalkomplexen zwischen Orai1 und TRPC1, beziehungsweise TRPC1 und  $\text{IP}_3$ -Rezeptor Typ II hat, welche für die Aufrechterhaltung des SOCE und die Kanalfunktion wichtig sind (35). (Auf die weiteren komplexen Regulationsmechanismen der TRPC-Funktion durch den  $\text{IP}_3$ -Rezeptor und das Protein STIM1 wird im Folgenden nicht weiter eingegangen (17)). Damit wird die Bedeutung des Immunophilins FKBP52 für die TRPC-Kanalregulation immer deutlicher. Von FKBP52 ist bekannt, dass es eine N-terminale PPIase-Domäne (PPIase I, auch als FK1-Domäne bezeichnet, AS 50-138) enthält, aber auch eine weitere, der ersten Domäne folgende, PPIase-ähnliche Domäne (PPIase II- oder FK2-Domäne, AS 167-253) ohne katalytische Aktivität besitzt (36). Darauf folgend enthält es drei Tetratricopeptid repeat (TPR) -Wiederholungen, die Interaktionen mit anderen Proteinen vermitteln, und schließlich eine C-terminale Bindungsstelle für Calmodulin (Abbildung 5) (37).





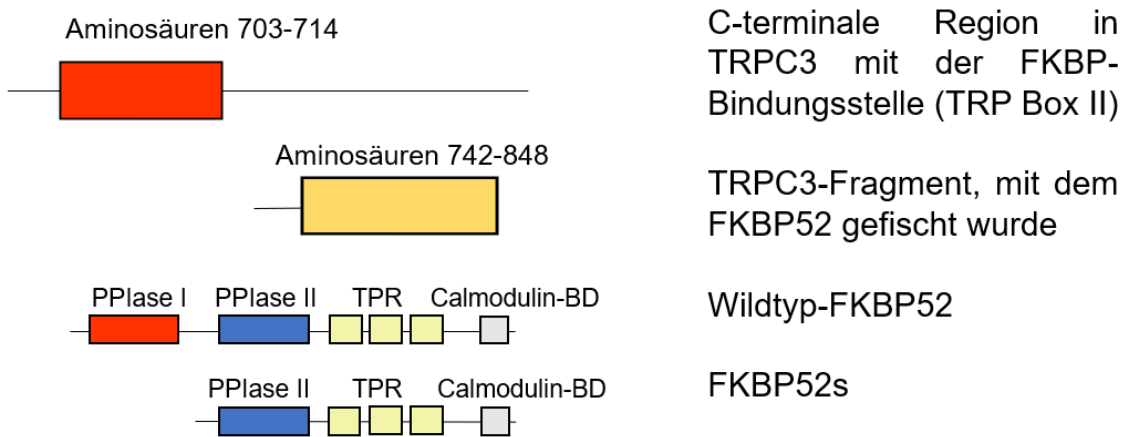
**Abbildung 4: Regulation von TRPC-Kanälen durch FKBP52 und Homer**

FKBP52 und Homer binden überlappend am C-Terminus von TRPC-Kanälen. Durch Bindung von Homer wird die TRPC-Einheit in einem geschlossenen Zustand gehalten (A). Erfolgt eine Stimulation durch GPCR-Agonisten (B), katalysiert FKBP52 cis-trans-Umlagerungen in der prolinreichen Region, was zur Dissoziation von Homer und Öffnung des Kanals führt. Durch GPCR-Stimulation erfolgt ebenfalls eine Phosphorylierung im Bereich der FKBP52-PPIase-Bindungsstelle und Rekrutierung von Calcineurin zum Komplex. Durch die Lokalisation an der Kanalpore wird Calcineurin durch Ca<sup>2+</sup>-Einstrom aktiviert und dephosphoryliert NFAT, was die weitere Kaskade antreibt (C). (Quelle: Eigene Grafik)



## Einleitung

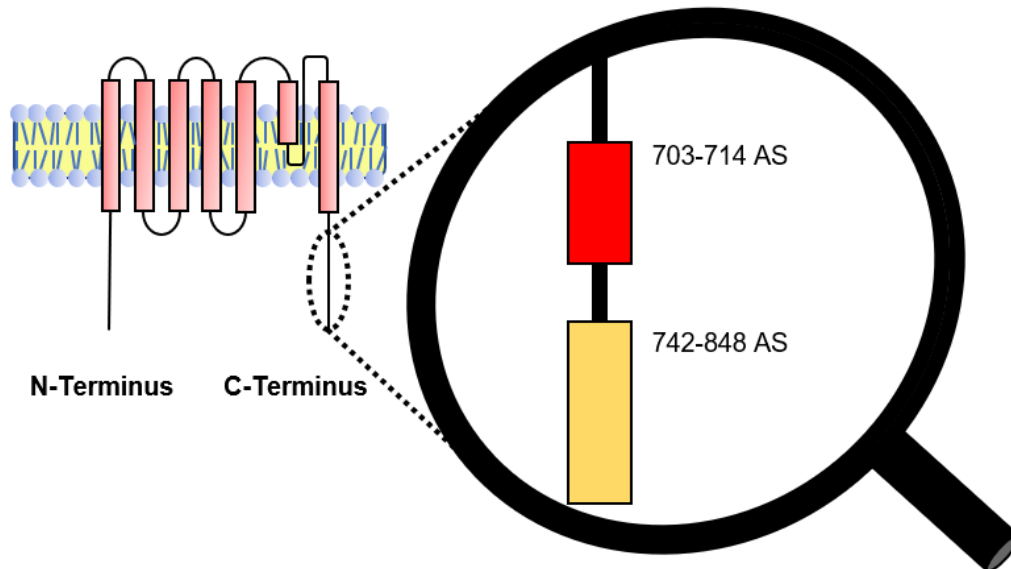
daraufhin ein Fragment (AS 135-459) von FKBP52, im Weiteren als FKBP52s (s für short) bezeichnet, das um die bekannte PPIase-Domäne gekürzt ist, um diese Interaktion weiter zu untersuchen (Abbildung 5). Auch eine erste Co-Immunopräzipitation zwischen FKBP52s und TRPC3 war erfolgreich.



**Abbildung 6: Schematische Gegenüberstellung der C-terminalen Bindungsdomänen in TRPC3 und FKBP52 bzw. FKBP52s.**

Die Abbildung soll die interagierenden Domänen verdeutlichen. Während von den AS 703-714 in der TRP Box II von TRPC3 (rot) bekannt ist, dass diese mit der PPIase-Domäne von Immunophilinen interagieren (ebenfalls rot in WT-FKBP52), konnte mit einem weiter C-terminal gelegenen Fragment (gelb) in einer kardialen cDNA library mittels Yeast Two-Hybrid System ebenfalls FKBP52 geborgen werden.

(Quelle: Eigene Grafik)



**Abbildung 7: Lokalisierung der FKBP52-Bindungsdomänen in TRPC3**

Lokalisierung der FKBP52-Bindungsstellen im TRPC Molekül. Der C-Terminus von TRPC3 ist schematisch mittels Lupe vergrößert. Mit rot ist die bekannte Immunophilin-Bindungsstelle in der TRP Box II dargestellt, mit gelb das weiter C-terminal gelegene Fragment von TRPC3, mit dem FKBP52 im Y2H gefischt wurde.

(Quelle: Eigene Grafik)

### 1.4 Aufgabenstellung

Ziel dieser Arbeit war es, zu bestimmen, ob *in vivo* eine Interaktion zwischen FKBP52 und den TRPC Untereinheiten TRPC3 und TRPC4 besteht. TRPC4 wurde zum Vergleich mit TRPC3 als Vertreter der Subgruppe TRPC1/TRPC4/TRPC5 ausgewählt, da TRPC4 als anerkannter Bindungspartner - im Gegensatz zu TRPC3 - von FKBP52 gilt. Außerdem sollte untersucht werden, ob die Expression des PPIase-gekürzten FKBP52 (FKBP52s) Einfluss auf diese Bindung und die Funktion des endogen exprimierten Wildtyp-FKBP52 hat.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, ob die Expression von FKBP52s *in vivo* die TRPC-vermittelte Aktivierung des Calcineurin-NFAT-Signalweges beeinflusst. Im Speziellen sollte der Frage nachgegangen werden, ob FKBP52s diese in der Herzinsuffizienz pathophysiologisch wichtige Signaltransduktionskaskade hemmt.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

##### **Gerät:**

##### **Hersteller:**

##### **Zentrifugen:**

Biofuge Fresco

Heraeus

Universal 32 R

Hettich

##### **Mikroskope:**

Axiovert 135

Zeiss

WIIovert 30

Hund Wetzlar

##### **Pipetten:**

Eppendorf Reference (1000 $\mu$ l,100 $\mu$ l,10 $\mu$ l)

Eppendorf

Pipetboy

Integra

##### **Waagen:**

TP 214 Feinwaage

Denver Instruments

440-45N

Kern

##### **Diverse:**

Bio RS-24

Hartenstein

## Material und Methoden

Ecomax Film Processor 1186 1 0000	Protec
L 40 Rüttelplatte	Scientific Industries
Roto-Shake SI 1022 Genie	Scientific Industries
Sicherheitswerkbank	BDK
Stripper L81	Hotplate
Microspin FV-2400 Vortex	Biosan
MS3 Basic	IKA
Mini Protean Tetra System	Biorad
Powerpac Basic	Biorad
Variomag Mono	Komet
Sonoplus GM 70	Bandellin
Thermomixer comfort 1,5ml	Eppendorf
Mastercycler Personal	Eppendorf

### **Analysegeräte:**

Whatman Darkhood	Biometra
Transluminator Tl 5	Biometra
Biodoc Analyze	Biometra
Nanodrop 2000c	Thermo Scientific
Microprocessor pH Meter pH537	WTW
UVM 340	Asys

### **Inkubatoren und Brutschränke:**

Hera Cell	Heraeus
Sm30-TH30	Edmund Bühler

## 2.1.2 Programme

Nanodrop 2000/2000c Version 1.4.1.	Thermo Scientific
ImageJ Version 1.48	National Institute of Health
GraphPad Prism 5 Version 5.01	GraphPad Software
Biodoc Analyze 2.1. BDA u-677 Version 2.64.8.1.	Biometra
Photoshop Elements 10 <sup>1</sup> Version 10.0	Adobe
Axiovision Rel. 4.5. Axiovs 40 V 4.5.0.0	Zeiss
PowerPoint 2013	Microsoft

---

<sup>1</sup> Mit Photoshop wurden lediglich die Kontraste und Helligkeit der Fotografien der Western Blot Membranen bearbeitet. Dabei wurden immer alle Bereiche der gleichen Bearbeitung unterzogen, sodass keine Verfälschung von Kontrasten und Helligkeitsstufen von Fotobereichen untereinander stattgefunden hat.



Office 365 Proplus Version 1902

Plate-Digiread

V.1.2.02

Microplate

Instrumentation

Control

### 2.1.3 Verbrauchsmaterialien

#### **Verbrauchsmaterialien**

Aluminiumfolie

Cellstar 6-well culture plate

Cellstar 96-well culture plate

Cellstar Falcon Tube 15ml

Cellstar Falcon Tube 50ml

Cellstar Kulturflasche 250ml

Cellstar Serologische Pipettenspitzen steril (5ml,  
10ml, 25ml, 50ml)

Deckgläser 24mmx24mm

Eppendorf Tubes 1,5ml

Eppendorf Tubes 250µl

Klarsichtfolie

Medical X-Ray Film 100 NIF 18cmx24cm

Nunclon Surface 10cm Kulturschale

Objektträger 76mmx26mm

Pipettenspitzen (10µl,100µl,1000µl)

#### **Hersteller:**

Toppits

Greiner Bio-One

Greiner Bio-One

Greiner Bio-One

Greiner Bio-One

Greiner Bio-One

Greiner Bio-One

Hartenstein

Sarstedt

Eppendorf

Toppits

Fuji

Nunc

Thermo Scientific

Sarstedt

## 2.1.4 Chemikalien, Lösungen und Puffer

### Chemikalien

Agarose	Roth
Ammoniumpersulfat (APS)	Biorad
Ampicillin-Natrium	Sigma
Blotting Grade Blocker/Magermilchpulver	Biorad
Borsäure	Roth
Bromphenol blau	Roth
BSA	Roth
Calciumchlorid	Sigma
Carbachol	Sigma
CIAP	Thermo Scientific
DAPI Dihydrochlorid	Life Technologies
Dinatriumhydrogenphosphat	Sigma
DTT	Sigma
dNTPs	Promega
EDTA	Roth
Ethanol	Sigma
Fetales Bovines Serum (FBS)	Biochrom
Formaldehyd	Science Services
Glucose	Sigma
Glycerol	Roth
Glycin	Roth
H <sub>2</sub> O ad iniectabilia	Delta Select
H <sub>2</sub> O ad iniectabilia	Braun

## Material und Methoden

Hydrogenchlorid/HCl	Applichem
Isopropanol	Sigma
Kaliumchlorid	Sigma
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth
Kanamycinsulfat	Sigma
Methanol	Sigma
Mounting Medium	Thermo Scientific
Natriumchlorid	Sigma
Natronlauge NaOH	Applichem
Penicillin-Streptomycin	Pan Biotech
Poly-D-Lysin Hydrobromid	Sigma
Ponceau S	Sigma
Protease Inhibitor	Promega
Protein A/G Agarose Beads	Santa Cruz
Sodiumdodecylsulfat	Roth
TEMED	Roth
Tris	Roth
Triton X-100	Roth
Tween 20	Sigma

### **Detektionsreagenzien:**

Luminate Forte Western HRP Substrat	Millipore
ECL Western blotting detection reagents and analysis system	Amersham

### **Transfektiosreagenz**

Für die Transfektion der HEK-293-Zellen wurde das X-tremeGene HP DNA Transfection Reagent von Roche (Katalognummer 06366244001) verwendet.

### **Proteinstandards:**

Bio-Rad Precision Plus Protein Dual Color Standards, Katalognummer 1610394

### **Puffer und Lösungen:**

Antikörperlösung      1% Blotting Grade Blocker. Antikörper im  
WB:                              entsprechenden Verhältnis.  
   In PBS-T/TBS-T je nach Puffersystem des  
   Primärantikörpers

Blockierlösung            5% Blotting Grade Blocker  
WB:                              In PBS-T/TBS-T je nach Puffersystem des  
   Primärantikörpers

Bradford Reagenz:      Fertiglösung von Biorad

Protein-                      Lysis Puffer  
Lysepuffer:                 Protease Inhibitor  
   0,5mM DTT

## Material und Methoden

5X Loading	1M Tris pH 7,0 2ml
Puffer:	Glycerol 3,2ml
	SDS 0,64g
	0,62g DTT
Lysis Puffer:	50mM Tris
	150mM NaCl
	Auf pH 7,4 titrieren
	Mit H <sub>2</sub> O auf 50ml auffüllen
PBS:	NaCl 8g
	KCl 0,2g
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1,44g
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,24g
	Mit H <sub>2</sub> O aufgefüllt auf 1l
PBS-T:	NaCl 8g
	KCl 0,2g
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1,44g
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,24g
	Tween-20 1ml
	Mit H <sub>2</sub> O aufgefüllt auf 1l

## Material und Methoden

Ponceaus S:	Fertiglösung von Sigma
SDS Running Puffer:	Tris 3,04g Glycin 14,4g 10% SDS 10ml 100ml Methanol Mit H <sub>2</sub> O aufgefüllt auf 1l
Stripping Lösung:	10% Re-blot Plus Strong Solution von Millipore 90% H <sub>2</sub> O
TBE:	Tris 12,1g Borsäure 6,03g 0,5M EDTA 4ml Mit H <sub>2</sub> O aufgefüllt auf 1l
TBS:	1M Tris ph 7,5 20ml NaCl 8g Mit H <sub>2</sub> O aufgefüllt auf 1l
TBS-T:	1M Tris pH 7,5 20ml NaCl 8g Tween-20 1ml Mit H <sub>2</sub> O aufgefüllt auf 1l

## Material und Methoden

Transfer Puffer:	TRIS 3,03g Glycin 14,4g 200ml Methanol Mit H <sub>2</sub> O aufgefüllt auf 1l
1,0M Tris pH 6,8:	Tris 12,114g In H <sub>2</sub> O lösen pH 6,8 einstellen mit HCl Mit H <sub>2</sub> O aufgefüllt auf 1l
1M Tris pH 7,5	Tris 12,114g In H <sub>2</sub> O lösen Mit HCl pH titrieren Mit H <sub>2</sub> O aufgefüllt auf 1l
1,5M Tris pH 8,8:	Tris 18,171g In H <sub>2</sub> O lösen pH 8,8 einstellen mit Natronlauge Mit H <sub>2</sub> O aufgefüllt auf 1l

### **Agarose-Gelelektrophorese Gele:**

1% Agarosegel:	TAE 50ml Gel Green 3µl Agarose 0,5g
----------------	---

**SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese Gele:**

Sammelgel 5ml:      H<sub>2</sub>O 3,4ml  
                             Polyacrylamid 0,83ml  
                             1,0M Tris pH 6,8 0,63ml  
                             10% SDS 0,05ml  
                             10% APS 0,05ml  
                             TEMED 0,005ml

8% Trenngel 20ml:    H<sub>2</sub>O 9,3ml  
                             Polyacrylamid 5,3ml  
                             1,5M Tris pH 8,8 5,0ml  
                             10% SDS 0,2ml  
                             10% APS 0,2ml  
                             TEMED 0,012ml

2.1.5 Medien

**Für Bakterien verwendete Medien:**

SOC-Medien:          Hefeextrakt 0,5%  
                             2,5mM KCl  
                             10mM NaCl  
                             10mM MgCl<sub>2</sub>  
                             10mM MgSO<sub>4</sub>  
                             Trypton 2%  
                             20mM Glucose



**Für HEK-293-Zellen verwendete Medien:**

DMEM:	Glucose 4500mg/l
	L-Glutamine
	NaHCO <sub>3</sub>
	Pyridoxine
	HCl
DMEM + FBS +	DMEM 89%
Pen/Strep:	FBS 10%
	Penicillin/Streptomycin 1%

2.1.6 Kits

Plasmid-DNA-Purification	Machery & Nagel
QIAquick PCR-Purification-Kit	Qiagen
QIAprep Spin Miniprep-Kit	Qiagen

## 2.1.7 Antikörper

### Primärantikörper:

Anti-körper:	Hersteller:	Kat-Nr:	Spender:	Konz.:	WB-Konz.:	Puffer:
Anti-FKBP52	Abcam	Ab2926	Kaninchen	1mg/ml	1:1000	PBS-T
Anti-FKBP52	Santa Cruz	Sc-1803	Ziege	0,2mg/ml	1:1000	PBS-T
Anti-GFP	Abcam	Ab290	Kaninchen	5000mg/ml	1:1000	PBS-T
Anti-HA	Santa Cruz	Sc-7392	Maus	0,2mg/ml	1:1000	PBS-T
Anti-TRPC3	Serum/ Med. Univ. Graz	-	Kaninchen	Serum	1:1000	TBS-T
Anti-TRPC4	Alomone	ACC-018	Kaninchen	0,4mg/ml	1:200	TBS-T
Normal IgG	Santa Cruz	SC-2027	Kaninchen	0,4mg/ml	-	-
Normal IgG	Santa Cruz	SC-2025	Maus	0,4mg/ml	-	-
Normal IgG	Santa Cruz	SC-2028	Ziege	0,4mg/ml	-	-

### Sekundärantikörper:

Anti-körper:	Hersteller:	Kat-Nr:	Spender:	Konz.:	WB-Konz.:	Puffer:
Anti-Mouse	Amersham	NA931	Schaf	0,93mg/ml	1:1000	PBS-T
Anti-Goat	Dako	P0449	Kaninchen	1g/l	1:1000	TBS-T

## Material und Methoden

Cleanblot IP Detection Reagent	Thermo Scientific	2123 0	-	40µg/ ml	1:250	TBS- T/PBS- T
---	----------------------	-----------	---	-------------	-------	---------------------

### 2.1.8 Enzyme

Enzymname:	Enzymtyp:	Enzymhersteller:	Katalog-Nr:
Ligase	DNA-Ligase	Invitrogen	15224-041
Not I	Restriktionsendonuklease	New England Bio Labs	0521208
Sal I	Restriktionsendonuklease	New England Bio Labs	0541206
Taq Dynazyme	DNA-Polymerase	Biozym	F-505S

Für die Ligase-Reaktion wurde der mitgelieferte 5x Ligase Puffer von Invitrogen und für die Polymerase-Reaktion wurde der, dem Enzym beigelegte, 10x Puffer F514 von Biozym benutzt.

#### **Restriktionsendonukleasen:**

Name des Enzyms:	Schnittstelle:	Puffer:
Not I:	5' ...GC↓GGCCGC...3' 3' ...CGCCGG↑CG...5'	1xNEBuffer 3 von New England B. mitgeliefert
Sal I:	5' ...G↓TCGAC...3' 3' ...CAGCT↑G...5'	1xNEBuffer 3 von New England B. mitgeliefert

Die Pfeile markieren jeweils die Schnittstelle.

### 2.1.9 Plasmide

Plasmid Name:	Plasmid Nr:	Funktion:	Resistenzgen:
FKBP52	3011	Expressionsplasmid von FKBP52 für Eukaryonten	Ampicillin
FKBP52 short-HA-pcDNA3	3012	Expressionsplasmid von FKBP52s für Eukaryonten mit HA-Tag	Ampicillin
CFP-hTRPC3 pcDNA3	3048	Expressionsplasmid des humanen TRPC3 für Eukaryonten mit CFP-Tag	Ampicillin
pECFP c1-mTRPC4 WT	3049	Expressionsplasmid von TRPC 4 der Maus für Eukaryonten mit CFP-Tag	Kanamycin
pEYFP TRPC 3	3056	Expressionsplasmid von TRPC 3 für Eukaryonten mit YFP-Tag	Kanamycin
hTRPC3-pcDNA3	3061	Expressionsplasmid vom humanen TRPC 3 für Eukaryonten	Ampicillin
pENTR 3C	-	Gateway Vector	
NFATc1-GFP	-	Expressionsplasmid von NFATc1-GFP für Eukaryonten	

### 2.1.10 Primer

Name:	Sequenz in 5'→3':	Hersteller:
pentr3 reverse	GTA-ACA-TCA-GAG-ATT-TTG-AGA-CAG	Eurofins
FKBP52 forward 3xHA	AAA-AAG-TCG-ACA-AGC-TTA-TGT-ACC-CAT-ACG-ATG-TTC-CAG-ATT-ACG	Eurofins
FKBP52 sequencing 1155	AGC-AAC-AAA-GCC-GCC-AAG-ACC	Eurofins
FKBP52 reverse 459	AAA-AAG-CGG-CCG-CGT-CGA-GCT-ACG-CTT-CTG-TCT-C	Eurofins

FKBP52 forward	AAA-AAG-TCG-ACA-AGC-TTA-TGT-TTG- AGT-TCA-AAG-GAG-AAG-GAG-AAG- ATC-TTA	Eurofins
-------------------	---	----------

### 2.1.11 Rekombinante Proteine und Konstrukte

FKBP52s mit HA-Tag  
Humanes TRPC3 mit CFP-Tag  
Muriner Wildtyp TRPC4 mit CFP-Tag  
TRPC3 mit YFP-Tag  
NFATc1 mit GFP-Tag

### 2.1.12 Bakterienstämme

XL 10 Gold Ultracompetent Cells	Agilent Technologies
DH5 $\alpha$ Escherichia coli	Von AG Ritter

### 2.1.13 Zelllinien

Als Zelllinie wurden HEK-293-Zellen (Human Embryonic Kidney) verwendet.

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Molekularbiologische Methoden

#### 2.2.1.1 Die Transformation und Kultivierung von *Escherichia coli*<sup>2</sup>

Die Transformation diente dazu, Plasmide in Bakterien einzubringen, damit das Plasmid in einem späteren Schritt durch Vermehrung der Bakterien vervielfacht werden konnte. Zuerst wurden kompetente DH5 $\alpha$  E. coli Zellen in Eppendorf Tubes langsam auf Eis aufgetaut. Dann wurden 30ng des zu vermehrenden Plasmids mit Aqua ad iniectabilia verdünnt und zu den Bakterien gegeben. Diese wurden nun 30 Minuten auf Eis stehen gelassen. Bei 42°C erfolgte daraufhin für 30 Sekunden ein Hitzeschock, wodurch die Bakterienzellen in die Lage versetzt wurden, die Plasmide aufzunehmen. Nach einer Ruhephase von 2-3 Minuten auf Eis und der anschließenden Zugabe von 500 $\mu$ l SOC kamen die Eppendorf Tubes für 45 Minuten bei 250 RPM und 37°C auf den Schüttler Sm30-Th30. Danach erfolgte das Ausplattieren der Zellen auf einer Agarplatte mit dem entsprechenden Antibiotikum, für das ein Resistenzgen auf dem Plasmid, das vermehrt werden sollte, vorhanden sein musste. Die Platten wurden über Nacht im Schüttler bei 37°C und 0 RPM bebrütet.

---

<sup>2</sup> Nach Protokoll der AG Eder-Negrin.

Am nächsten Tag wurde eine Kolonie von der Agar-Platte gepflückt und in 50ml LB Medium mit dem gleichen Antibiotikum, das auch im Agar enthalten war, in einen sterilen Erlenmeyerkolben gegeben und im Schüttler über Nacht bei 37°C und 300RPM bebrütet.

### 2.2.1.2 Aufreinigung der Plasmid-DNA

Die Übernachtskultur wurde nun vom Erlenmeyerkolben in ein 50er Falcon übertragen und mit 3000RPM bei 4°C für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet mit Chemikalien aus dem MIDI Kit von Machery und Nagel resuspendiert. Die MIDI-Prep erfolgte nun mit dem MIDI Kit von Machery und Nagel nach deren MIDI Protokoll, auf das hiermit verwiesen wird. Am Ende erhielt man die in 400µl Tris eluierte Plasmid-DNA.

### 2.2.1.3 Bestimmung der DNA-Konzentration und Reinheit<sup>3</sup>

Die Konzentration der Plasmid-DNA wurde daraufhin im Spectrophotometer Nanodrop 2000 bei Licht der Wellenlänge 260nm ausgemessen. Dazu wurden 2µl in die Vertiefung der Messeinheit pipettiert und anschließend wurde mit Hilfe der Software die Absorption von Licht der Wellenlänge 260nm durch die DNA ausgemessen. Je mehr DNA vorhanden war, desto mehr Licht wurde absorbiert.

---

<sup>3</sup> Nach dem dem Gerät beigefügten Protokoll.

#### 2.2.1.4 Klonierung zur Herstellung eines Adenovirus von FKBP52s<sup>4</sup>

Diese Umklonierung diente dem Zweck, die DNA von FKBP52s von dem Expressionsplasmid auf das Plasmid pENTR 3C zu übertragen um dann in einem weiteren Schritt einen Adenovirus von FKBP52s zu erzeugen, durch den dann Kardiomyozyten mit FKBP52s für weitere Experimente transduziert werden konnten.

##### 2.2.1.4.1 Sequenzierung des Plasmids HA-FKBP52s

An erster Stelle stand eine Sequenzierung der DNA des FKBP52s-Gens auf dem Expressionsplasmid, um dessen Korrektheit und Intaktheit zu prüfen. Außerdem konnten damit bei einer zweiten Sequenzierung, nämlich des umklonierten FKBP52s-Gens, mögliche Fehler bei der Umklonierung durch Vergleich mit der ersten Sequenzierung identifiziert werden.

Die Sequenzierung wurde durchgeführt von Eurogenes.<sup>5</sup> Dazu wurden 1,5µl des Expressionsplasmids FKBP52s in ein Eppendorf Tube pipettiert. Dann wurden 2µl des Primers FKBP52seq1155 hinzugefügt und der ganze Ansatz mit Aqua a. i. auf 15µl aufgefüllt und mit Probenbeschriftung der Firma Eurogenes zur Sequenzierung übergeben.

---

<sup>4</sup> Nach Protokoll der AG Eder-Negrin.

<sup>5</sup> Nach Protokoll der Firma Eurogenes.



#### 2.2.1.4.2 Polymerase-Kettenreaktion des FKBP52s-Gens<sup>6</sup>

Um das FKBP52s-Gen von seinem Expressionsplasmid zu trennen und um das Gen zu vervielfältigen, wurde eine PCR durchgeführt. Dabei wurden zwei Ansätze erstellt: Bei Ansatz A wurden die Primer FKBP52forward3xHA und FKBP52reverse459 verwendet, um das FKBP52s-Gen inklusive des Gens für das HA-Tag zu vermehren. Bei Ansatz B wurde statt des Primers FKBP52forward3xHA der Primer FKBP52forward zusammen mit dem Primer FKBP52reverse459 benutzt um HA-Tag freie FKBP52s-DNA zu generieren. Sowohl für Ansatz A, als auch für Ansatz B wurde ein Mastermix von 150µl für drei Proben erzeugt.

Mastermix:	2,4µl (~3-6ng Plasmid-DNA) FKBP52s-Expressionsplasmid
	117,6 µl H <sub>2</sub> O a.i.
	15µl 10x Buffer F514
	6µl dNTPs
	Je 3µl pro Primer (siehe oben)
	3µl Taq Dynazyme

Der Ansatz wurde auf drei 250µl Eppendorf Tubes aufgeteilt. Alle Pipettierschritte erfolgten auf Eis. Die Polymerase wurde erst kurz vor dem Einstellen in die PCR-Kammer hinzugefügt. Die Proben wurden erst in die Kammer gestellt, nachdem Cycle Step I gestartet war und die Kammer eine Temperatur von 94°C erreicht hatte. Es wurden folgende Cycle Steps durchlaufen:

---

<sup>6</sup> Nach Protokoll der AG Eder-Negrin.

Cycle Step:	Temperatur in °C:	Dauer:	Wiederholung:
1	94	2 Minuten	
2	94	30 Sekunden	2-4 30x wiederholt
3= Anlagerung	68	30 Sekunden	
4	72	50 Sekunden	
5	72	10 Minuten	
6	4	unbegrenzt	

Die Anlagerungstemperatur berechnete sich als Mittelwert der Schmelztemperaturen der Primer und davon 5°C abgezogen.

### 2.2.1.4.3 Kontroll-Gelelektrophorese des PCR-Produkts<sup>7</sup>

Zur Kontrolle der Qualität der PCR wurde eine Gelelektrophorese der Proben vorgenommen. Dazu wurden je 10µl der drei Proben je Ansatz mit 2µl Loading Dye versehen. Die Elektrophorese wurde daraufhin bei 150V für 50 Minuten durchgeführt.

### 2.2.1.4.4 Reinigung des PCR-Produkts

Da die Elektrophorese bestätigt hatte, dass die PCR die DNA korrekt vervielfältigt hatte, konnte die DNA in den Proben isoliert werden. Dafür wurde das DNA-Reinigungskit von Qiagen verwendet. Es sei auf das Qiagen

---

<sup>7</sup> Nach Protokoll der AG Eder-Negrin.

DNA-Reinigungskit Protokoll verwiesen. Die gereinigte DNA wurde am Ende mit 30µl H<sub>2</sub>O a. i. eluiert.

#### 2.2.1.4.5 Restriktionsverdau des PCR-Produkts und von pENTR 3C<sup>8</sup>

Um die nun gewonnene freie DNA des FKBP52s- beziehungsweise HA-FKBP52s-Gens mit dem Plasmid pENTR 3C verbinden zu können, war es nötig, beide Moleküle mit den gleichen Restriktionsendonukleasen zu schneiden, um klebrige Enden, das heißt DNA-Schnittstellen, die miteinander korrespondieren und sich zusammenlagern können, zu erzeugen.

Dazu wurden die Restriktionsenzyme Not I und Sal I verwendet. Es wurde jeweils die Probe pro Ansatz ausgewählt, bei der die Elektrophorese die dickste Bande gezeigt hatte, und diese wurde 3h von den Enzymen bei 37°C verdaut. Anschließend wurde die DNA wieder mit dem DNA Reinigungskit von Qiagen nach dem dazugehörigen Protokoll gereinigt. Die gereinigte und geschnittene DNA wurde daraufhin mit 25µl H<sub>2</sub>O a.i. eluiert.

60µl Restriktionsverdau Ansatz:	19µl DNA (je von Ansatz A und B)
	1,5µl Sal I
	1,5µl Not I
	6µl 10xNEBuffer 3
	6µl BSA 1:10
	26µl H <sub>2</sub> O a.i.

---

<sup>8</sup> Nach Protokoll der AG Eder-Negrin.

Anschließend wurde der Vektor pENTR 3C geschnitten:

60µl Restriktionsverdau Ansatz:	4µl DNA von pENTR 3C (~2µg)
	1,0µl Sal I
	1,0µl Not I
	4µl 10xNEBuffer 3
	4µl BSA 1:10
	26µl H <sub>2</sub> O a.i.

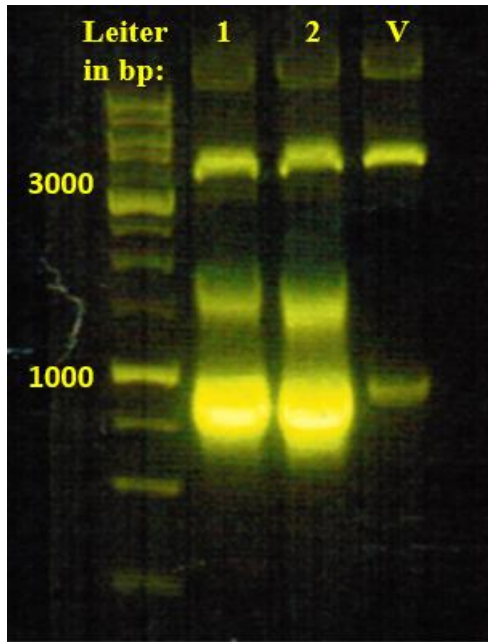
Der Verdau erfolgte über 4 Stunden bei 37°C. Schließlich wurde das Produkt 40 Minuten mit CIAP dephosphoryliert.

### 2.2.1.4.6 Kontroll-Gelelektrophorese des Restriktionsverdaus<sup>9</sup>

Um die Qualität des Verdaus von pENTR 3C zu überprüfen und um das große der zwei geschnittenen Fragmente, das 3000bp-Fragment, gewinnen zu können, wurde der Restriktionsverdau erneut einer Agarose-Gelelektrophorese unterzogen. Zur Evaluation des erfolgreichen Verdaus wurde parallel ein bereits korrekt geschnittener pENTR 3C mitaufgetragen. Im Vergleich zu diesem zeigte sich, dass auch die frisch verdauten Proben korrekt geschnitten wurden, sodass im nächsten Schritt das große 3000bp-Fragment selektiv ausgeschnitten werden konnte (Abbildung 8).

---

<sup>9</sup> Nach Protokoll der AG Eder-Negrin. Siehe auch 2.2.1.4.3.



**Abbildung 8: Restriktionsverdau von pENTR 3C**

In der Abbildung ist der Restriktionsverdau von pENTR 3C aus 2.2.1.4.5 (1 und 2) zu sehen. Bei V ist zur Kontrolle eine Probe eines korrekt geschnittenen pENTR 3C zu sehen. Es sind zwei charakteristische Banden zu erkennen: Bei 1000bp liegt das aus pENTR 3C geschnittene Fragment. Bei 3000bp erkennt man das geschnittene Rest-pENTR 3C. Im Vergleich mit V war der Verdau somit erfolgreich. Im Anschluss wurde das 3000bp-Fragment aus dem Gel herausgeschnitten und gereinigt, um dieses in einem späteren Schritt mit dem FKBP52s-Gen zu ligieren. (Quelle: Eigene Grafik)

#### 2.2.1.4.7 Elution von DNA-Fragmenten aus dem Gel

Zur Gewinnung des 3000bp-Fragments für die Ligation mit FKBP52s wurden die entsprechenden Gelbanden mit einem Skalpell reseziert und mit dem Qiagen DNA-Gel-Reinigungskit aufgereinigt. Hierzu sei auf das zum Kit gehörende Protokoll verwiesen.

#### 2.2.1.4.8 DNA-Ligation <sup>10</sup>

Die Ligation erfolgte sowohl für Ansatz A (HA-FKBP52s) als auch für B (FKBP52s) mit zwei unterschiedlichen Verhältnissen von freier DNA zur geschnittenen pENTR 3C-DNA. Dazu wurden zwei unterschiedliche Ligationsansätze erstellt (Kleinbuchstabe für Verhältnis DNA:pENTR = 4:1, Großbuchstabe für Verhältnis DNA:pENTR = 4:3)

Ansatz (a, b):	4µl DNA a bzw. b	Ansatz (A, B):	4µl DNA a bzw. B
	1µl DNA pENTR 3C		3µl DNA pENTR 3C
	10µl H <sub>2</sub> O a.i.		8µl H <sub>2</sub> O a.i.
	4µl Ligase Puffer		4µl Ligase Puffer
	1µl Ligase		1µl Ligase

Die Ligationsansätze wurden bei 16°C über Nacht in die PCR Kammer gestellt. Am nächsten Tag erfolgte die Reinigung mit dem Qiagen DNA-Reinigungskit.

#### 2.2.1.4.9 Transformation von X-Cell Gold

Um das neue in pENTR 3C klonierte FKBP52s beziehungsweise HA-FKBP52s zu vervielfältigen, erfolgte eine Transformation von X-Cell Gold Zellen. Die Transformation erfolgte nach dem den Zellen beigefügten Protokoll, entsprach aber im Wesentlichen dem Ablauf, wie in 2.2.1.1

---

<sup>10</sup> Nach Protokoll der AG Eder-Negrin.

beschrieben. Anschließend wurden die Bakterien ausplattiert, wie in 2.2.1.1 beschrieben, und eine Übernachtskultur von je drei Kolonien von jedem der vier Ansätze (A, a, B und b) angefertigt.

### 2.2.1.4.10 Mini-Prep

Um die Plasmid-DNA aus den Zellen zu gewinnen, wurde eine Mini-Prep durchgeführt. Hierfür wurde das Mini-Prep Kit von Qiagen verwendet. Zur Durchführung möchte ich hierzu auf das beigelegte Protokoll von Qiagen verweisen. Im Anschluss wurde die Plasmid-DNA Konzentration mit Hilfe von Nanodrop, wie in 2.2.1.3 beschrieben, vermessen.

### 2.2.1.4.11 Restriktionsverdau und Gelelektrophorese des Mini-Prep-Produkts

Um den korrekten Einbau des FKBP52s-Gens beziehungsweise HA-FKBP52s-Gens in pENTR 3C zu überprüfen, wurde noch einmal ein Restriktionsverdau mit den Restriktionsendonukleasen Not I und Sal I durchgeführt. Dazu wurde ein 12x Mastermix erstellt, der dann auf 12 Aliquots aufgeteilt wurde. Jedem Aliquot wurden 10µl DNA der Proben beigelegt.

12x Mastermix:	6,5µl Sal I
	6,5µl Not I
	26µl 10xNEBuffer 3
	26µl BSA 1:10
	65µl H <sub>2</sub> O a.i.

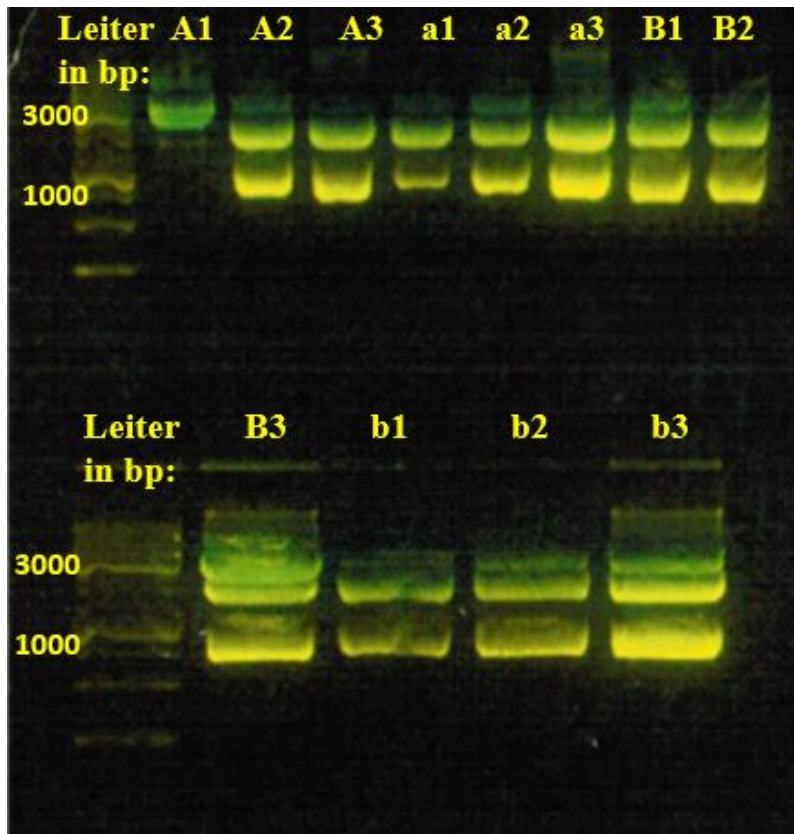
Der Verdau erfolgte nach dem in 2.2.1.4.5 beschriebenen Bedingungen. Die Agarose-Gelelektrophorese wurde, wie in 2.2.1.4.3 beschrieben, durchgeführt (Abbildung 9).

### 2.2.1.4.12 Abschließende Sequenzierung des FKBP52s-Gens

Abschließend wurden die Proben erneut sequenziert. Hierzu wurden die Proben B1 und a3 ausgewählt. Von B1 wurden auf Grund der geringeren DNA-Konzentration 900ng DNA und von a3 1,5µg DNA zum Sequenzieren geschickt. Mit diesen Mengen wurden je Probe drei Eppendorf Tubes befüllt und mit H<sub>2</sub>O a. i. auf 15µl aufgefüllt. Je Probe wurde ein Eppendorf Tube ohne Primer, eines mit dem Primer FKBP52seq1155bp und eines mit dem Primer pentr3reverse zum Sequenzieren gegeben (Sequenzierung von DNA siehe 2.2.1.4.1). Das Sequenzieren ergab eine non-silent/missense Punktmutation (siehe Anhang). Daher wurden auch von A2, A3, b2 und B3 eine Probe von je 15µl mit dem Primer pentr3reverse und auch Proben vom Expressionsplasmid HA-FKBP52s mit dem Primer FKBP52s1155 zum Sequenzieren gegeben. Die erneute Sequenzierung ergab bei allen Proben eine übereinstimmende non-silent/missense Punktmutation, die zum Aminosäuren Austausch von Arginin durch Glutamin an Position 359 in der TPR Box 3 führte (vgl. Anhang) (37). Rückblickend war die Mutation ebenfalls in 2.2.1.4.1 schon vorhanden, sodass von einer spontan vorkommenden Mutation auszugehen ist und nicht von einem Ablesefehler bei der PCR. Die Relevanz der Mutation kann abschließend nicht geklärt werden. Zuletzt wurde mit Hilfe einer Transformation und MIDI-Prep, wie in Kapitel 2.2.1.2 beschrieben, die Plasmid-DNA der Proben a3 und B1



vermehrt und zur weiteren Umwandlung in einen Adenovirus Mitarbeitern der Arbeitsgruppe übergeben.



**Abbildung 9: Restriktionsverdau des Klonierungsendproduktes**

In der Abbildung sind zwei charakteristische Banden zu erkennen: Bei 1000bp liegt das geschnittene FKBP52s-Gen. Bei 3000bp erkennt man das geschnittene pENTR 3C. Da in jeder der 12 Proben die Banden zu sehen sind, kann man daraus schließen, dass in jedem Ansatz das FKBP52s-Gen erfolgreich in pENTR 3C hineinkloniert wurde. (Quelle: Eigene Grafik)

## 2.2.2 Zellkultur und proteinbiochemische Methoden

### 2.2.2.1 Zellkultur<sup>11</sup>

Alle Versuche werden mit HEK-293-Zellen unter der Sicherheitswerkbank mit Abzug durchgeführt. Die Zellen wurden mit dem Nährmedium in Kulturflaschen im Brutschrank von Heracell bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert und jeden 2. bis 3. Tag circa im Verhältnis 1:5 bis 1:7 je nach Dichte des Zellrasens gesplittet. Die Beurteilung der Dichte erfolgte mit Hilfe des Lichtmikroskops von Hund Wetzlar.

### 2.2.2.2 Herstellung eines Proteinlysats<sup>12</sup>

Um das Zelllysats zu erzeugen, mit dem später die Co-IPs durchgeführt werden sollten, wurden die HEK-293-Zellen zuerst auf Kulturschalen mit 10cm Durchmesser in einer Verdünnung von 1:6 bis 1:8 der ursprünglichen Kulturflasche ausgesetzt. Auch hier richtete sich die verwendete Verdünnung nach der Dichte der Zellen in der Flasche. Pro Schale wurden 10ml Kulturmedium inklusive der Zellen verwendet. Nach einer Ruhephase von einem Tag im Brutschrank bei 37°C wurden die Zellen nach lichtmikroskopischer Kontrolle bei circa 70% Dichte des Zellrasens transfiziert. Für die Transfektion wurden 5µg Plasmid-DNA pro zu

---

<sup>11</sup> Nach Protokoll der AG Eder-Negrin.

<sup>12</sup> Nach Protokoll der AG Eder-Negrin.

transfizierendem Plasmid für eine 10er Schale verwendet. Dieses wurde mit 1ml DMEM vermischt und die Menge Transfektionsmedium in  $\mu\text{l}$  im Verhältnis 1:1 zur entsprechenden Menge Plasmid-DNA zugegeben. Nachdem die Lösung für 15 Minuten stehen gelassen wurde, wurde sie den Zellen hinzugefügt. Die transfizierten Zellen wurden über Nacht in den Brutschrank gestellt. Nach 12 Stunden wurde die Qualität der Transfektion im Fluoreszenzmikroskop von Zeiss kontrolliert, da viele der verwendeten Proteine ein fluoreszierendes Tag aufwiesen.

Die Zellen wurden daraufhin mit 100 $\mu\text{l}$  Erntepuffer pro 10er Schale und einem Zellkratzer auf Eis geerntet und 10 Sekunden lang durch Ultraschall mit Hilfe des Sonoplus GM 70 auf Eis lysiert. Nach einer Ruhephase von 30 Minuten auf Eis wurden die Lysate 2 Minuten bei 13000 Umdrehungen und 4°C zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand mit den gelösten Proteinen vom Pellet mit den restlichen Bestandteilen abpipettiert und in ein neues Eppendorf Tube übertragen. Dieses gereinigte Zelllysate konnte nun in flüssigem Stickstoff schonend schockgefroren und bei -80°C gelagert werden, bis weitere Versuche folgten.

### 2.2.2.3 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford<sup>13</sup>

Für die Proteinkonzentrationsbestimmung mittels Bradford Assay wurden die Lysate 1:40 mit Aqua a. i. von Braun verdünnt. Von diesen Verdünnungen wurden nun 10 $\mu\text{l}$  in die Verdünnungen eines 96-wells pipettiert. Dies wurde für jede Probe zweimal gemacht, um zwei Messwerte

---

<sup>13</sup> Nach dem Protokoll der AG Eder-Negrin.

zu erhalten, von denen später der Durchschnitt für weitere Berechnungen verwendet wurde. Dann wurden jeweils 10µl von definierten Proteinkonzentrationen auf eine neue Reihe von Vertiefungen auf der Platte pipettiert. Es wurden die definierten Proteinkonzentrationen von 0,0, 0,3, 0,5 und 0,9 verwendet. Hier wurden ebenfalls jeweils zwei Vertiefungen pro Probe befüllt. Anschließend wurden 200µl Bradford Reagenz in jede Vertiefung gegeben. Daraufhin wurden die Proben photometrisch ausgemessen. Das Messprinzip beruhte darauf, dass der Triarylmethanfarbstoff Coomassie Brilliant Blue G-250 seine Farbe von braun nach blau bei Bindung von Proteinen ändert und Licht der Wellenlänge 595nm absorbiert. Diese Absorption ist umso größer, je mehr Protein an den Farbstoff gebunden hat. Die Messwerte wurden für jede Probe gemittelt, da für jedes Lysat zwei Proben hergestellt wurden. Diese wurden in eine vorgefertigte Excel Maske eingegeben. Anhand der definierten Standardkonzentrationen konnte nun eine Eichkurve erstellt werden. Damit konnte nun die Proteinkonzentration jeder Probe errechnet werden. Durch Multiplikation mit dem Faktor 40 errechnete sich die Konzentration jedes Lysats, da diese für die Messung um den Faktor 1:40 verdünnt worden waren.

### 2.2.2.4 Co-Immunopräzipitation<sup>14</sup>

Das Prinzip der Immunopräzipitation beruht auf dem Ausfällen von Protein-Antikörperkomplexen durch Zentrifugation mit Hilfe von Protein A oder G

---

<sup>14</sup> Die Co-IP wird nach dem laborinternen Protokoll der AG Eder-Negrin durchgeführt.

## Material und Methoden

Agarose Beads, gegen die der FC-Teil des Immunglobulins gerichtet ist. Sind die Bindungspartner des Proteins von Interesse, gegen das der Antikörper gerichtet ist, spricht man von Co-Immunoprecipitation.

Eingesetzt wurden für die Co-IP circa 800-1200µg Protein des Zelllysats der jeweiligen Probe. Dieses wurde mit Lysepuffer auf 500µl aufgefüllt. Die Proben wurden mit 2µg Normal-IgG der Spezies, von der der Primärantikörper, der für die IP verwendet wurde, abstammte, und 30µl Agarose A Beads bei 4°C auf dem Schüttler bei langsamer Umdrehung für 30 bis 60 Minuten inkubiert. Daraufhin wurden die Proben für 5 Minuten mit 2000 Umdrehungen bei 4°C zentrifugiert und der Überstand in ein neues Eppendorf Tube übertragen, während das Pellet verworfen wurde. Dies diente dem Entfernen unspezifischer Proteinbindungen an den Antikörper.

Das so gereinigte Proteinlysate wurde nun mit dem Antikörper, mit dem die Co-IP durchgeführt wurde, für 3 Stunden bei 4°C auf dem Schüttler mit langsamer Umdrehung inkubiert. Danach wurden die Proben mit 50µl Protein A Agarose Beads, beziehungsweise Protein G Agarose Beads, wenn der Antikörper von der Ziege stammte, bei 4°C über Nacht auf dem Schüttler inkubiert.

Daraufhin folgten die Waschschrte: Das Proteinlysate wurde mit 2000 Umdrehungen für 5 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde bis auf das Pellet abpipettiert und verworfen. Das Pellet am Grund des Eppendorf Tubes wurde daraufhin mit 500µl Lysis Puffer resuspendiert und anschließend erfolgte der Waschschrte von vorne. Die Waschschrte wurden insgesamt fünfmal wiederholt. Vor dem letzten Waschschrte wurde das resuspendierte Lysate in ein neues Eppendorf Tube übertragen, um unspezifische Bindungen von Proteinen an die Wand des Tubes

auszuschließen. Nach dem letzten Waschschrift wurde das Lysat erneut nach obigen Bedingungen zentrifugiert und nach dem Abpipettieren des Überstandes mit 30µl des 2x Loading Puffers resuspendiert. Das Eluat wurde nun bei 95°C für zwei Minuten im Wasserbad aufgeköcht und daraufhin für 5 Minuten auf Eis zum Ruhen gestellt.

Nun wurden die Proben erneut nach obigen Bedingungen zentrifugiert und der Überstand in ein neues Eppendorf Tube übertragen. Die weitere Analyse erfolgte daraufhin mit Hilfe einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.

### 2.2.2.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese<sup>15</sup>

Die Auftrennung der Co-IP Proben erfolgte mit Hilfe einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese. Die Proben wurden auf ein selbst gegossenes 8% Polyacrylamid Gel übertragen und in zwei Schritten via Gelelektrophorese in einer Gelkammer von Biorad getrennt. In einem ersten Teil erfolgte ein Sammelschritt bei 80V für 20 Minuten. Daraufhin wurde das Proteingemisch im eigentlichen Trennschritt bei 130V aufgetrennt bis eine farblich markierte Bande aus dem Gel gelaufen war. Danach wurde der Vorgang gestoppt und die Übertragung der Proteine vom Gel auf die Blotting Membran gestartet.

---

<sup>15</sup> Die Gelelektrophorese wird nach dem laborinternen Protokoll der AG Eder-Negrin durchgeführt.

### 2.2.2.6 Western Blot und Detektion<sup>16</sup>

Der Blottingschritt erfolgte semi-dry mit Blotting Utensilien in der gleichen Gelkammer, in der zuvor die Elektrophorese durchgeführt wurde. Geblottet wurde bei 100V für 120 Minuten. Anschließend wurden die nun auf die Membranen übertragenen Proteine mit Blockierlösung für 1 Stunde auf dem Schüttler bei Raumtemperatur geblockt. Daraufhin wurden die Membranen mit dem zur Detektion verwendeten Primärantikörper, gelöst in Antikörperlösung, über Nacht bei 4°C auf dem Schüttler inkubiert. Nun erfolgten drei bis fünf Waschschrte mit dem jeweiligen Puffer, PBS-T oder TBS-T, je nach dem Puffersystem der Antikörperlösung. Danach wurden die Membranen mit dem Sekundärantikörper, der mit Enzym HRS-Peroxidase gekoppelt war, für 1 Stunde auf dem Schüttler bei Raumtemperatur inkubiert. Jetzt erfolgten erneut drei bis fünf Waschschrte mit PBS-T beziehungsweise TBS-T. Nun wurde die Membran für 5 Minuten auf Klarsichtfolie in ECL-Lösung dunkel eingelegt. Anschließend erfolgte die Detektion der Proteinbanden durch Auflage eines Röntgenfilms in einer Fotokassette in einer Dunkelkammer. Der Fotofilm wird durch das emittierte Gammaquant der Peroxidasereaktion geschwärzt, folglich genau an der Stelle, an der der Zweitantikörper mit der HRS-Peroxidase gebunden hatte. Zur Entwicklung des Filmes wurde der vollautomatische Fotofilm-Entwickler Ecomax verwendet. Anschließend konnten die Co-IPs an Hand der Filme interpretiert werden.

---

<sup>16</sup> Das Western Blot-Protokoll ist ebenfalls ein AG Eder-Negrin internes Protokoll.

### 2.2.2.7 Quantitative Auswertung der Co-IPs<sup>17</sup>

Um die Co-IPs quantitativ auf die Frage hin zu untersuchen, ob FKBP52s zu einer verminderten Komplexbildung zwischen Calcineurin und TRPC3 beziehungsweise TRPC4 (siehe 3.2.1) führt, wurden die eingescannten Co-IPs mit dem Programm ImageJ ausgewertet, welches die Dicke und Intensität der Banden bestimmen kann, indem es die Intensität der Banden als Punktwert ausdrückt. Daraufhin wurden die Punktwerte der Banden der copräzipitierten Proteine ins Verhältnis zu denen der Proteine gesetzt, gegen die die präzipitierenden IP-Antikörper gerichtet waren. Dadurch sollte erreicht werden, dass die durch methodische Einflüsse bedingten Verluste an Proteinen vernachlässigbar wurden und vergleichbare Werte entstanden. Diese Verhältnisse wurden dann auf die Frage hin verglichen, ob der Wert abnimmt, wenn FKBP52s anwesend ist. Für die Auswertung erfolgte die Ermittlung des Durchschnitts, als Fehlerbalken wurde der SEM verwendet und für die Signifikanztestung der Student's t-Test.

### 2.2.3 Fluoreszenzmikroskopie<sup>18</sup>

Ziel der Fluoreszenzmikroskopie war es, die physiologische Bedeutung der Anwesenheit von FKBP52s für die Zelle durch dessen Einfluss auf den NFAT-Signalweg zu untersuchen. Dazu wurde die Wanderung eines

---

<sup>17</sup> Nach Protokoll der AG Kraus zur Densitometrie mittels ImageJ.

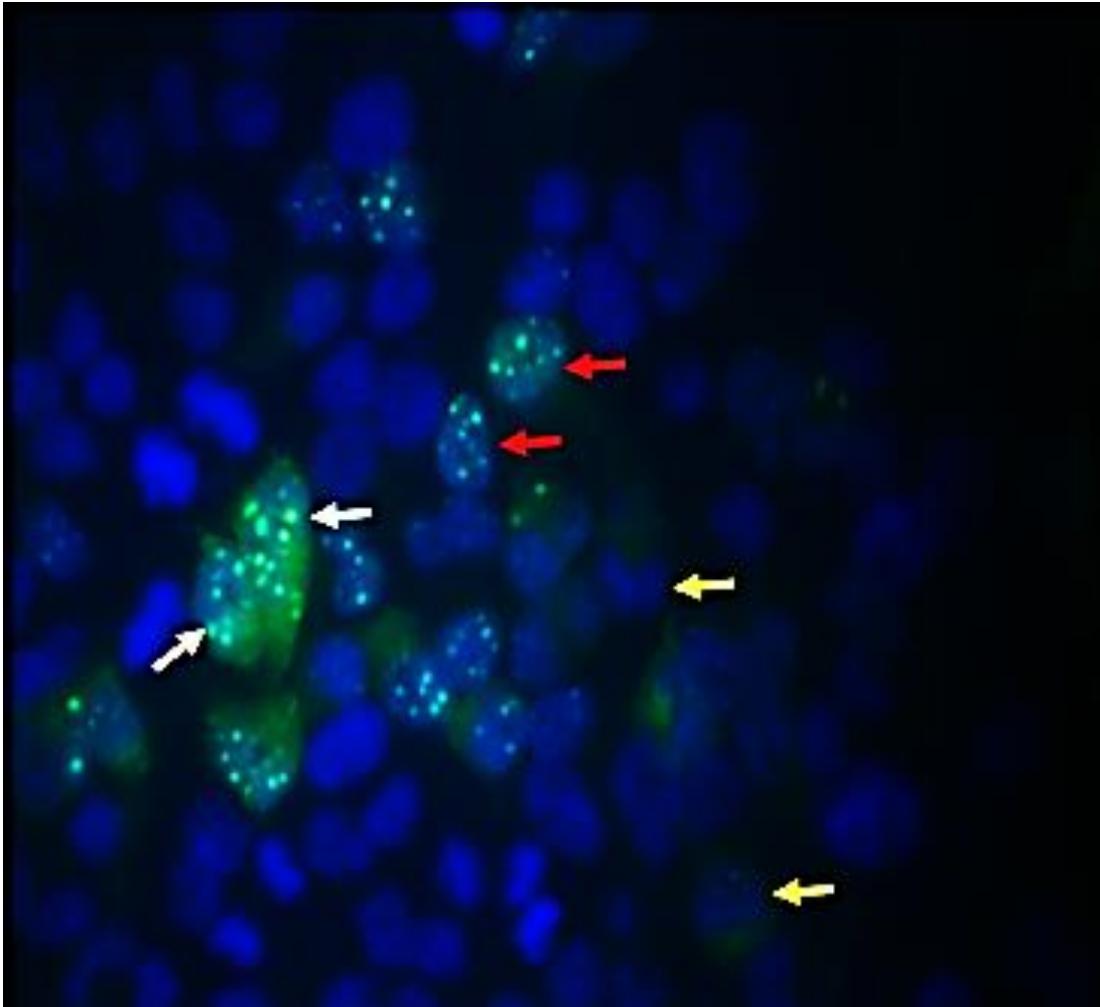
<sup>18</sup> Das Protokoll für die Fluoreszenzmikroskopie ist ein laboreigenes Protokoll der AG Eder-Negrin.



fluoreszierenden NFATc1 in den Zellkern von HEK-293-Zellen untersucht und quantitativ ausgewertet.

Unter der Sicherheitswerkbank wurden in einem 6-Well pro Vertiefung zwei bis drei autoklavierte Glasplättchen platziert. Diese wurden daraufhin mit 100µl Poly-D-Lysin pro Well für 5 Minuten behandelt, damit die HEK-293-Zellen später auf den Plättchen adhären konnten. Danach wurden die Wells mit Wasser gespült. Nach einem 10-minütigen Trockenschritt erfolgte das Pipettieren der Zellen in die Vertiefungen. In Abhängigkeit der Dichte der Zellen in der Kulturflasche wurde eine Verdünnung von 1:6 bis 1:8 für ein 6-Well verwendet. Nun wurden die HEK-293-Zellen im Brutschrank über Nacht bei 37°C bebrütet. In einem zweiten Schritt wurden die Zellen transfiziert. Pro Well wurde 1µg DNA pro Plasmid-DNA verwendet. Diese wurde mit 200µl DMEM verdünnt und mit der korrespondierenden Menge Transfektionsreagenz im Verhältnis µg Plasmid-DNA zu µl Transfektionsreagenz gleich eins zu eins vermischt und für 15 Minuten stehen gelassen. Nach der Zugabe des Mediums erfolgte die Inkubation der Zellen im Brutschrank bei 37°C über Nacht. In einem dritten Schritt wurde eine Stimulation der Zellen vorgenommen. Hierbei wurden vier verschiedene Stimulationsarten durchgeführt: Basal ohne Stimulation, Stimulation mit 2mM Carbachollösung, Stimulation mit 2mM CaCl<sub>2</sub>-Lösung und Stimulation mit 2mM Carbachol und 2mM CaCl<sub>2</sub>-Lösung. Nach der Zugabe des Stimulationsmediums wurden die Zellen für 1 Stunde erneut in den Brutschrank bei 37°C gegeben. Schließlich erfolgte die Fixierung der Zellen, nachdem die Stimulationslösung mit PBS aus den Wells gewaschen worden war. Zur Fixierung wurde jedes Well mit 2ml 4% PFA-Lösung in Dunkelheit durch Umwicklung mit Alufolie für 8-10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die 6-Wells dreimal mit PBS

gewaschen. Im Anschluss wurden die Zellen mit DAPI gegen das grün fluoreszierende NFATc1 gegengefärbt. DAPI stellt einen spezifischen blauen Farbstoff für DNA dar, der nur den Zellkern blau färbt. Hierzu wurden 100µl 300nM DAPI auf jedes Glasplättchen gegeben. Man ließ es 5 Minuten in Dunkelheit bei Raumtemperatur einwirken. Danach wurden die Plättchen wieder dreimal mit PBS gewaschen. Nach dem Trocknen der Plättchen im Dunkeln wurden diese mit Mounting Medium auf einem Objektträger gedeckelt und mit Alufolie umwickelt über Nacht stehen gelassen. Für die Auswertung wurden mehrere repräsentative Bereiche der Proben unter dem Fluoreszenzmikroskop fotografiert. In diesen Bildern wurde der Anteil der Zellen, bei denen das gesamte GFP-NFATc1 in den Zellkern transloziert war, ins Verhältnis zur Gesamtzahl an erfolgreich GFP-NFATc1 transfizierten Zellen gesetzt. Dieser so ermittelte Prozentsatz wird als direkt proportionaler Parameter für die Aktivierung des NFAT-Signalwegs angesehen (Abbildung 10). Der prozentuale Anteil wurde dann in den verschiedenen Gruppen untereinander verglichen. Als Fehlerbalken wurde der SEM und als Signifikanztestung eine One-Way ANOVA mit anschließendem Bonferroni-Test verwendet.



**Abbildung 10: Beispielbild mit Auswertungsalgorithmus**

Zu sehen ist ein charakteristischer Ausschnitt aus einer mit 100x Vergrößerung mit Hilfe von Immersionsöl mikroskopierten Probe. Das Bild ist das Additionsbild aus grünem und blauem Fluoreszenzspektrum. Die blaue Fluoreszenz kommt durch die Kernfärbung mit DAPI, die grüne Fluoreszenz durch das GFP-getaggte NFATc1 zustande. Die Beurteilung erfolgt an Hand der Aktivität des Transkriptionsfaktors NFATc1 und dessen Lokalisation in der Zelle in drei Kategorien:

- NFATc1 inaktiv, v.a. im Zellplasma (gelber Pfeil)
- NFATc1 teilweise aktiv, im Nucleus und Plasma (weißer Pfeil)
- NFATc1 vollständig aktiv, v.a. im Nucleus (roter Pfeil)

Für die Auswertung wurde der Anteil der vollständig aktivierten Zellen ins Verhältnis zu der Gesamtzahl an positiv transfizierten Zellen gesetzt.

(Quelle: Eigene Grafik)

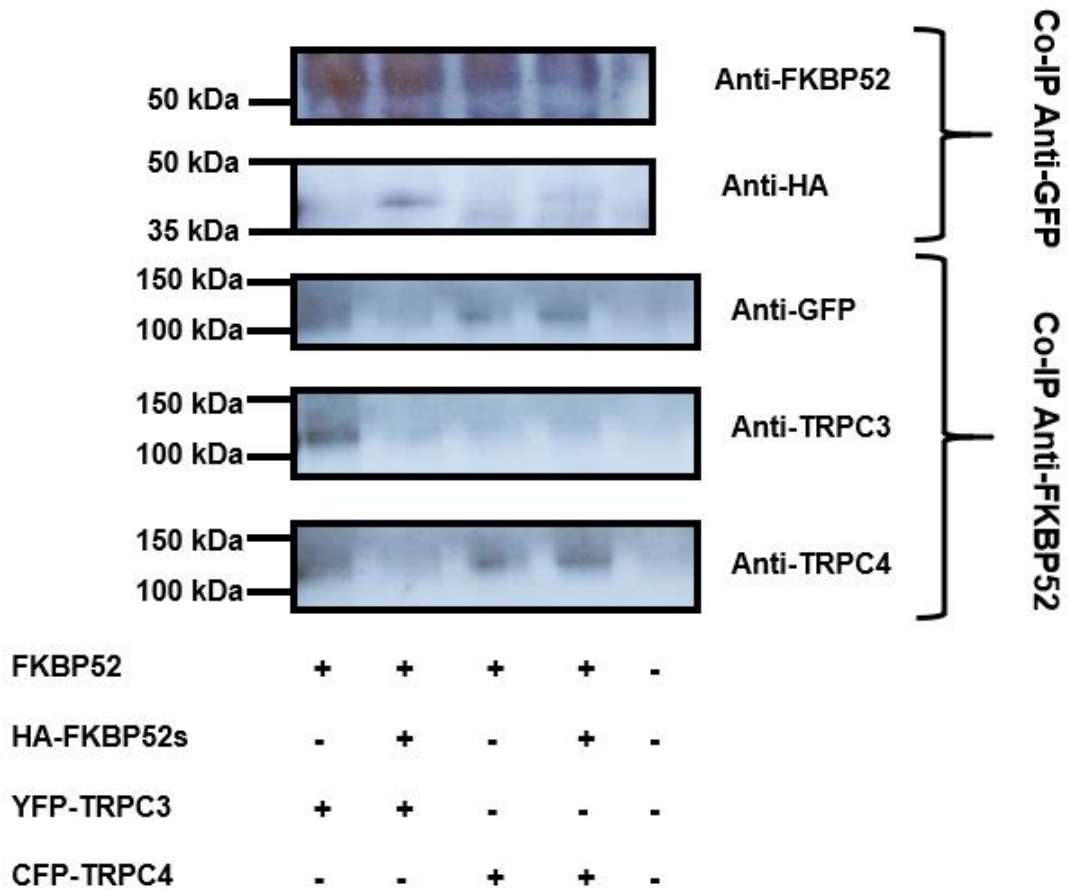
### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Bindungsverhalten zwischen FKBP52 und TRPC3/4 in Abhängigkeit der Anwesenheit von FKBP52s

Bei einer von unserer Arbeitsgruppe im Vorfeld durchgeführten Co-IP konnte eine Bindung zwischen FKBP52s und TRPC3 nachgewiesen werden (vgl.1.3). In weiterführenden Experimenten prüften wir daher, ob das in HEK-293-Zellen nativ vorkommende FKBP52 mit TRPC3 interagiert. Parallel dazu wurden ebenfalls die Interaktionen zwischen FKBP52 und TRPC4 untersucht. Außerdem war von Interesse, ob die parallele Anwesenheit von FKBP52s im Zellsystem einen quantifizierbaren Einfluss auf die Komplexbildung zwischen WT-FKBP52 und den TRPC-Kanälen zeigt. López und Kollegen und Shim et al. konnten nachweisen, dass FKBP52 vor allem wichtig für das TRPC-Gating unter Agonistenstimulation ist, weshalb in einem weiteren Schritt untersucht wurde, ob eine Stimulation der Zellen mit dem GPCR-Agonisten Carbachol einen Einfluss auf die oben genannten Bindungen im Vergleich zur Nichtstimulation hat (28) (35). Um das Bindungsverhalten zwischen WT-FKBP52 und TRPC3 beziehungsweise TRPC4 *in vivo* zu untersuchen, wurden Co-Immunopräzipitationen durchgeführt.

Als erstes wurde in Co-IPs unter Basalbedingungen untersucht, wie sich oben genannte Proteine ohne Carbachol Stimulation zueinander verhalten (Abbildung 11). Für diese Versuche wurden HEK-293-Zellen einerseits mit dem Plasmid YFP-TRPC3 oder andererseits mit CFP-TRPC4 zusammen mit FKBP52 transfiziert.

## Ergebnisse



**Abbildung 11: TRPC3 und TRPC4 interagieren mit WT-FKBP52 und FKBP52s ohne Stimulation in HEK-293-Zellen**

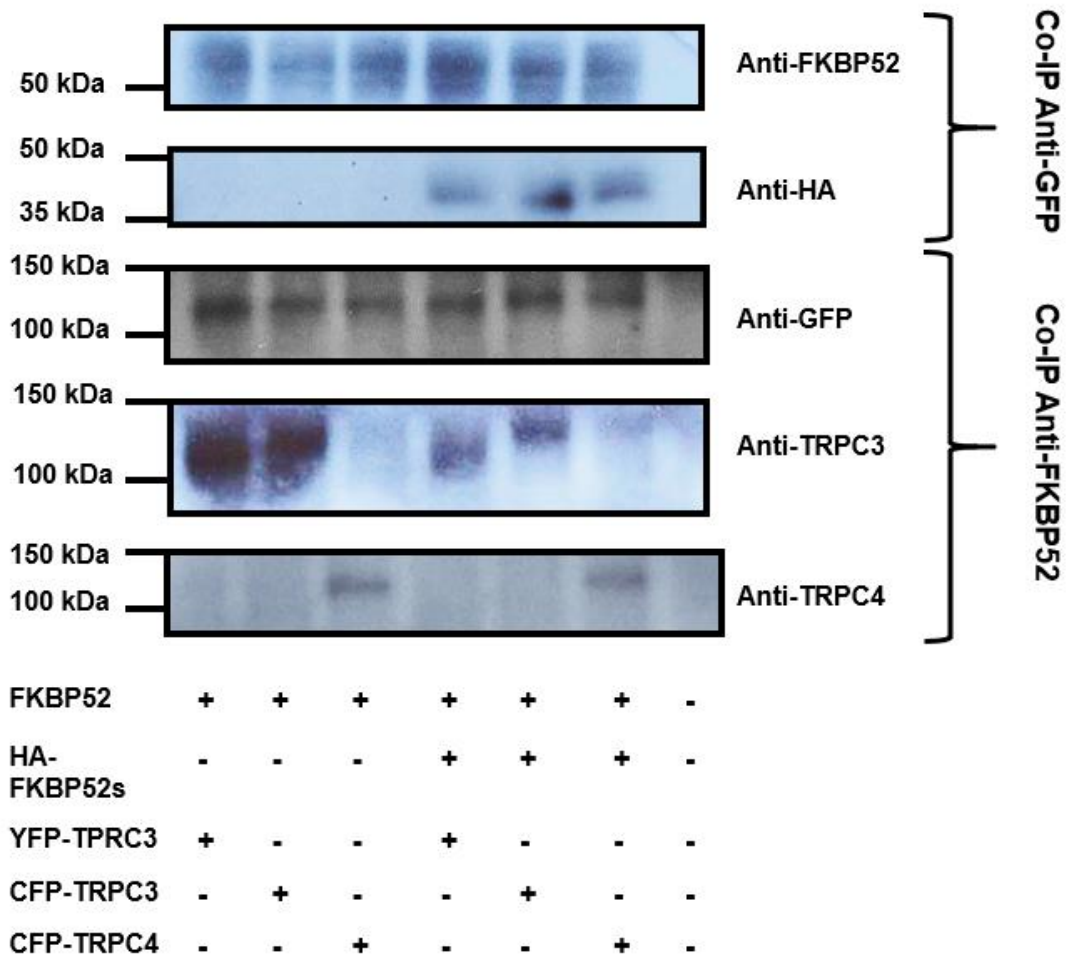
Western Blots von Co-IPs mit einem Anti-GFP, beziehungsweise Anti-FKBP52, Antikörper gegen die YFP/CFP-Tags von TRPC3/4 und gegen WT-FKBP52. Es wurde ein unstimuliertes Zelllysate verwendet. Die Detektion erfolgte mit Anti-FKBP52, Anti-HA gegen HA-FKBP52s, Anti-GFP, Anti-TRPC3 und Anti-TRPC4. Das Ergebnis zeigt Interaktionen zwischen FKBP52/ FKBP52s und TRPC3 und TRPC4.

(Quelle: Eigene Grafik)

## Ergebnisse

In einer weiteren Versuchsreihe wurden die gleichen Cotransfektionsbedingungen gewählt, ergänzt um eine Transfektion mit HA-FKBP52s, um quantitative Veränderungen der davor genannten Interaktionen durch Präsenz des zusätzlichen Proteins zu untersuchen. Die CFP- und YFP-Tags an den Proteinen waren für die Präzipitation mit einem Anti-GFP Antikörper nötig, da in unserer Arbeitsgruppe keine IP geeigneten Antikörper für TRPC3 vorhanden waren, die eine verlässliche Präzipitation gewährleisten hätten können. Die Co-IPs wurden in beide Richtungen durchgeführt, also sowohl mit Anti-FKBP52 gegen WT-FKBP52 als auch mit Anti-GFP gegen die getaggten TRPCs. Nach der Co-IP erfolgte die Analyse mittels SDS-Gelelektrophorese und Western Blot. Als Negativkontrolle wurde die Co-IP mit HEK-Zelllysat durchgeführt. In diesen Co-IPs konnte demonstriert werden, dass WT-FKBP52 und dessen verkürzte Version FKBP52s sowohl mit TRPC3 als auch TRPC4 präzipitiert werden konnten (Abbildung 11). Im Vergleich dazu zeigte sich in der Co-IP in die Gegenrichtung mit Anti-FKBP52 gegen WT-FKBP52 eine Ausfällung von TRPC3 und TRPC4 (Abbildung 11). Allerdings war in der Probe, in der ebenfalls FKBP52s vorkam, keine Präzipitation von YFP-TRPC3 nachweisbar. Betrachtet man dies im Vergleich mit der Co-IP mit Anti-GFP in Abbildung 11 oder mit den Co-IPs in Abbildung 12, in denen sich dieser Effekt nicht nachweisen ließ, muss man davon ausgehen, dass das Nichterscheinen der Bande von YFP-TRPC3 in der Anwesenheit von FKBP52s in dieser Co-IP ein Artefakt ist. In den hier nicht abgebildeten Positivkontrollen war die YFP-TRPC3 Proteinkonzentration in diesem Ansatz auch deutlich niedriger als die der weiteren Proteine in den anderen Versuchsbedingungen, was dieses Artefakt erklären kann.

## Ergebnisse



**Abbildung 12: TRPC3 und TRPC4 interagieren mit WT-FKBP52 und FKBP52s unter Stimulation in HEK-293-Zellen**

Western Blots von Co-IPs mit einem Anti-GFP, beziehungsweise Anti-FKBP52, Antikörper gegen die YFP/CFP-Tags von TRPC3/4 und gegen WT-FKBP52. Es wurde ein vor Lyse stimuliertes Zelllysate verwendet. Die Detektion erfolgte mit Anti-FKBP52, Anti-HA gegen HA-FKBP52s, Anti-GFP, Anti-TRPC3 und Anti-TRPC4. Das Ergebnis zeigt Interaktion zwischen FKBP52/ FKBP52s und TRPC3 und TRPC4.

(Quelle: Eigene Grafik)

## Ergebnisse

Bei qualitativer Betrachtung der Bandenstärke lässt sich keine Veränderung durch die Anwesenheit von FKBP52s nachweisen. Eine Quantifizierung mittels ImageJ wurde daher nicht durchgeführt. Da die Anwesenheit von FKBP52s, wie oben gezeigt, keinen Einfluss auf die Interaktion von WT-FKBP52 und TRPC-Ionenkanäle unter basalen Bedingungen hat und weil in der Literatur WT-FKBP52 vor allem Effekte unter GPCR-Stimulation zugeschrieben werden, wurden die oben genannten Co-IPs noch einmal mit, vor der Ernte, stimulierten HEK-293-Zellen durchgeführt. Diese Stimulation erfolgte durch Zugabe von  $\text{CaCl}_2$  und Carbachol zur Zellkultur vor deren Ernte. Außerdem wurde eine weitere Probe/Bedingung erstellt, in der statt YFP-TRPC3 CFP-TRPC3 verwendet wurde. Damit sollte der oben genannte Verlust der Bande von TRPC3 unter Anwesenheit von FKBP52s in der Co-IP mit Anti-FKBP52 mit einer zweiten TRPC3 haltigen Probe kontrolliert werden (Abbildung 11).

In diesen Co-IPs (Abbildung 12) ließ sich das Ergebnis aus Abbildung 11 bestätigen: Sowohl WT-FKBP52 als auch dessen verkürzte Variante FKBP52s konnten mit TRPC3 und TRPC4 präzipitiert werden. Bei der Co-IP in die Gegenrichtung zeigte sich ebenfalls die Ausfällung von TRPC3/TRPC4 mit WT-FKBP52. In Anwesenheit von FKBP52s war ein Ausfällen von TRPC3 und TRPC4 in allen Proben nachweisbar. Der Effekt aus Abbildung 11 ist damit als Artefakt zu werten. An der Dicke der Banden ließen sich optisch keine Unterschiede erkennen.

Damit ist demonstriert, dass TRPC3 und TRPC4 beide mit WT-FKBP52 und FKBP52s interagieren. Auf die Frage, ob FKBP52s eine quantitative Verminderung der Bindung des nativen FKBP52 an TRPC-Kanäle verursacht, ließ sich in diesen Experimenten kein Hinweis finden.



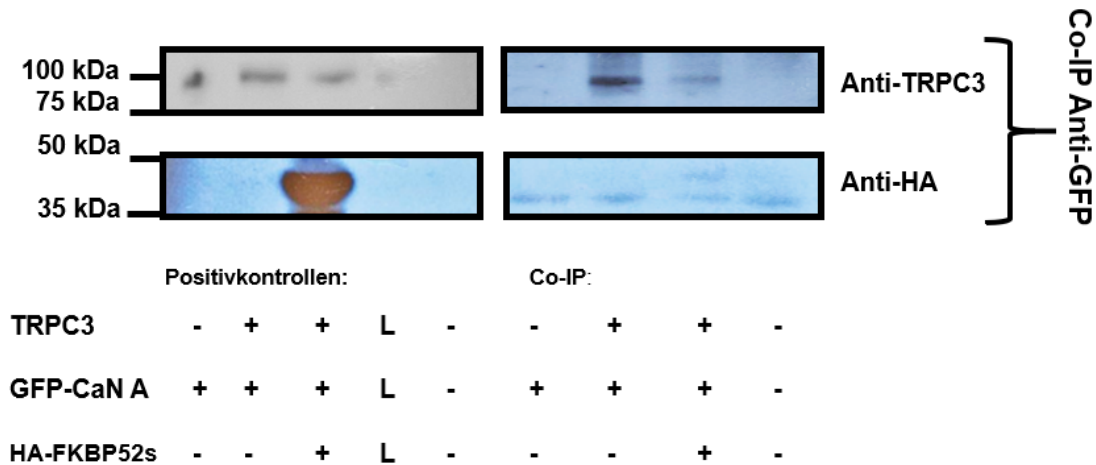
### 3.2 Einfluss von FKBP52s auf den Calcineurin-Signalweg

#### 3.2.1 Protein-Protein-Interaktionen zwischen TRPC3 bzw. TRPC4, Calcineurin A und FKBP52s

Wie in Kapitel 3.1 dargestellt, zeigt das Vorhandensein des verkürzten FKBP52 in der HEK-293-Zelle keinen - mit diesen Co-IPs nachweisbaren - Einfluss auf die Interaktion zwischen TRPC-Kanälen und WT-FKBP52. Da TRPC-Kanäle im weiteren Verlauf der Signalkaskade eine wichtige Rolle in der Aktivierung von Calcineurin und schließlich von NFAT spielen (Kapitel 1.2), wurde nun mittels Co-IPs untersucht, ob FKBP52s Veränderungen in der Interaktion zwischen WT-FKBP52, Calcineurin und TRPCs bewirkt. Dies wurde für TRPC3 und TRPC4 separat untersucht.

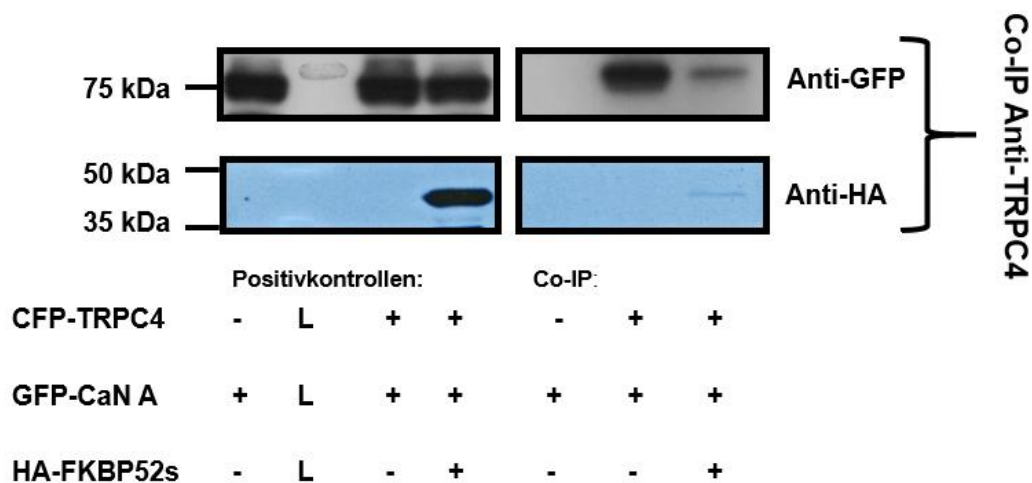
Für TRPC3 wurden folgende Co-IP Ansätze in HEK-293-Zellen erstellt: Eine Singletransfektion mit GFP-CaN A, eine Cotransfektion mit TRPC3 und GFP-CaN A und eine Triple Transfektion mit GFP-CaN A, TRPC3 und HA-FKBP52s. Als Negativkontrollen diente die Singletransfektion mit GFP-CaN A und eine Co-IP mit nicht transfiziertem HEK-Zelllysat. Diese Co-IP wurde insgesamt dreimal durchgeführt. Es wurde der repräsentativste Blot (Abbildung 13) hier abgebildet. Es zeigte sich, dass durch die Präzipitation von Calcineurin A in HEK-293-Zellen auch TRPC3 ausgefällt wurde, FKBP52s konnte ebenfalls als Bindungspartner von Calcineurin A im präzipitierten Komplex nachgewiesen werden. Dabei scheint das Vorhandensein des verkürzten FKBP52 mit seiner fehlenden PPIase-Domäne die Zusammenlagerung des Calcineurin A-TRPC3-Komplexes rein optisch zu vermindern.

## Ergebnisse



**Abbildung 13: FKBP52s stört die Formierung eines Calcineurin-TRPC3-Komplexes in HEK-293-Zellen**

Western Blot einer Co-IP mit Anti-GFP gegen ein GFP-getaggtetes Calcineurin in HEK-293-Zellen. Die Detektion erfolgte mit Anti-TRPC3 und Anti-HA (gegen ein HA-getaggtetes FKBP52s). Auf Grund der Auftragung identischer Mengen an Protein legt das Ergebnis eine reduzierte Komplexbildung eines Calcineurin-TRPC3-Komplexes durch die Anwesenheit von FKBP52s nahe. (Quelle: Eigene Grafik)



**Abbildung 14: FKBP52s stört die Formierung eines Calcineurin-TRPC4-Komplexes in HEK-293-Zellen**

Western Blot einer Co-IP mit Anti-TRPC4 gegen ein CFP-getaggtetes TRPC4 in HEK-293-Zellen. Die Detektion erfolgte mit Anti-GFP (gegen ein GFP-getaggtetes Calcineurin A) und Anti-HA (gegen ein HA-getaggtetes FKBP52s). Auf Grund der Auftragung identischer Mengen an Protein legt das Ergebnis eine reduzierte Komplexbildung eines Calcineurin-TRPC4-Komplexes durch die Anwesenheit von FKBP52s nahe. (Quelle: Eigene Grafik)

## Ergebnisse

Die Banden der drei Co-IPs wurden mit ImageJ ausgemessen. Die Punktwerte und Quotienten der Punktwerte als Ausdruck der Proteinmengenverhältnisse sind in Tabelle 1 dargestellt. In 2 von 3 Fällen bewirkte FKBP52s eine Verminderung der Komplexbildung, in einem Fall eine stark vermehrte Komplexbildung (Abbildung 15). Dieser Effekt war jedoch nicht signifikant.

Der gleiche Ansatz wurde auch für TRPC4 verfolgt. Zum Präzipitieren wurde ein Anti-TRPC4 Antikörper verwendet, der im Vergleich zu den vorhandenen Anti-TRPC3 Antikörpern zuverlässig für IPs getestet worden war. Es wurden folgende Transfektionsbedingungen erstellt: Eine Singletransfektion mit GFP-Ca<sub>v</sub>1.2, eine Cotransfektion mit CFP-TRPC4 und GFP-Ca<sub>v</sub>1.2 und eine Triple Transfektion mit CFP-TRPC4, GFP-Ca<sub>v</sub>1.2 und HA-FKBP52s. Die IP wurde mit einem TRPC4-spezifischen Antikörper durchgeführt. Die Detektion von CFP-TRPC4 und GFP-Ca<sub>v</sub>1.2 erfolgte mit einem GFP-Antikörper. Auch hier wurde nur der repräsentativste Blot abgebildet (Abbildung 14). Diese Co-IP wurde insgesamt zweimal durchgeführt.

Zu erkennen ist, dass Calcineurin A bei Präzipitation mit TRPC4 als Bande im Western Blot erscheint. Zudem nimmt auch das kurze FKBP52 an der Bildung des TRPC4-Calcineurin A-Komplexes teil. Rein optisch betrachtet scheint FKBP52s wie bei TRPC3 die Komplexbildung zu verringern. Die quantitative Analyse erfolgte erneut mit ImageJ. Die Punktwerte als Ausdruck der Bandenintensität und die Verhältnisse der präzipitierten Proteine zueinander können Tabelle 1 entnommen werden. Die Punktwerte wurden ebenfalls in einem Punktdiagramm nach dem Vorhandensein von FKBP52s aufgetragen (Abbildung 16).

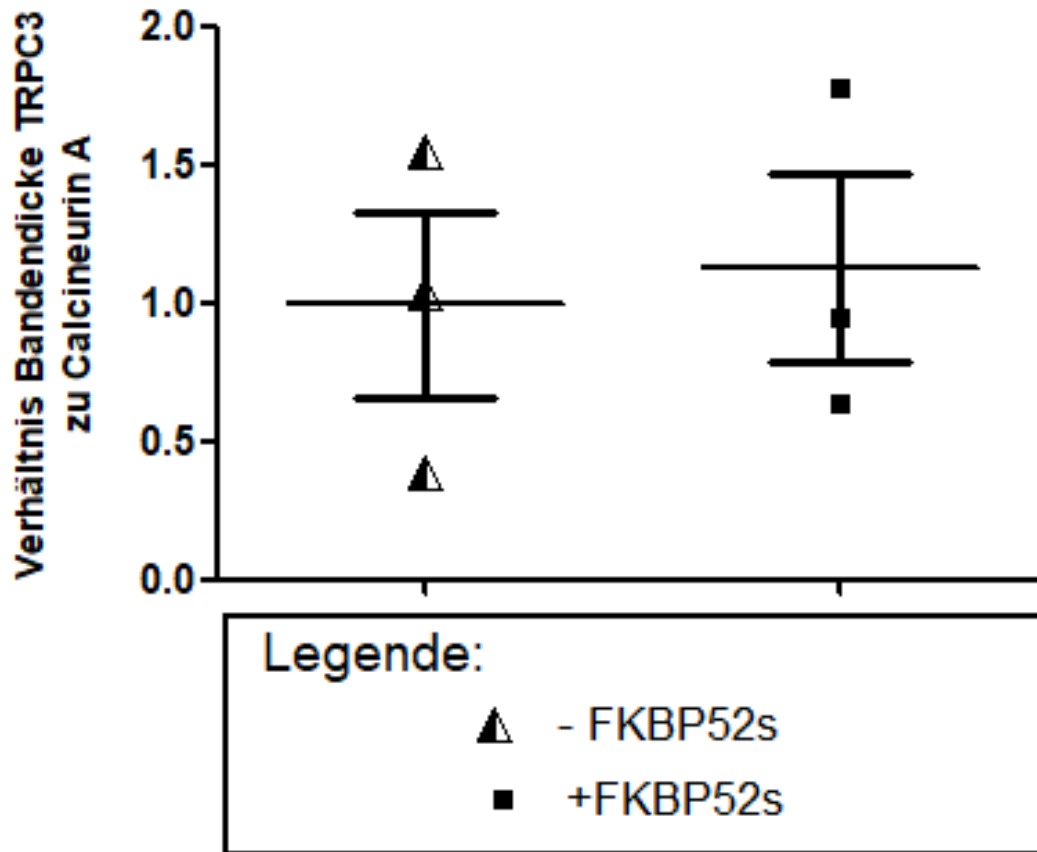
## Ergebnisse

	TRPC3:CaN A Quotient IP:IP -FKBP52s	TRPC3:CaN A Quotient IP:IP +FKBP52s
TRPC3 Co-IP Nr 1:	1,04	0,64
TRPC3 Co-IP Nr 2:	0,39	1,78
TRPC3 Co-IP Nr 3:	1,55	0,95
	CaN A:TRPC4 Quotient IP:IP -FKBP52s	CaN A:TRPC4 Quotient IP:IP +FKBP52s
TRPC4 Co-IP Nr 1:	1,16	0,92
TRPC4 Co-IP Nr 2:	1,11	0,4

**Tabelle 1: Ergebnisse der quantitativen Analyse der Co-IPs mit ImageJ**

Die Tabelle zeigt die Ergebnisse der Densitometrie der Co-IPs aus Abbildung 13 und Abbildung 14. Um methodenbedingte Proteinverluste vernachlässigen zu können, wurde der Dichtewert des Proteins von Interesse durch den Dichtewert des Proteins geteilt, gegen den der präzipitierende Antikörper gerichtet war. Je höher der Wert, desto mehr TRPC3- bzw. TRPC4-CaN A-Komplex wurde gebildet. In der rechten Spalte ist der Einfluss von FKBP52s auf die Bildung dieser Komplexe gezeigt: In 2 von 3 Fällen führte FKBP52s zu einer verminderten TRPC3-CaN A-Komplexbildung und in 2 von 2 Fällen zu einer verminderten TRPC4-CaN A-Komplexbildung. Zu beachten ist, dass bei TRPC3 mit Anti-GFP und bei TRPC4 mit Anti-TRPC4 in den Co-IPs präzipitiert wurde.

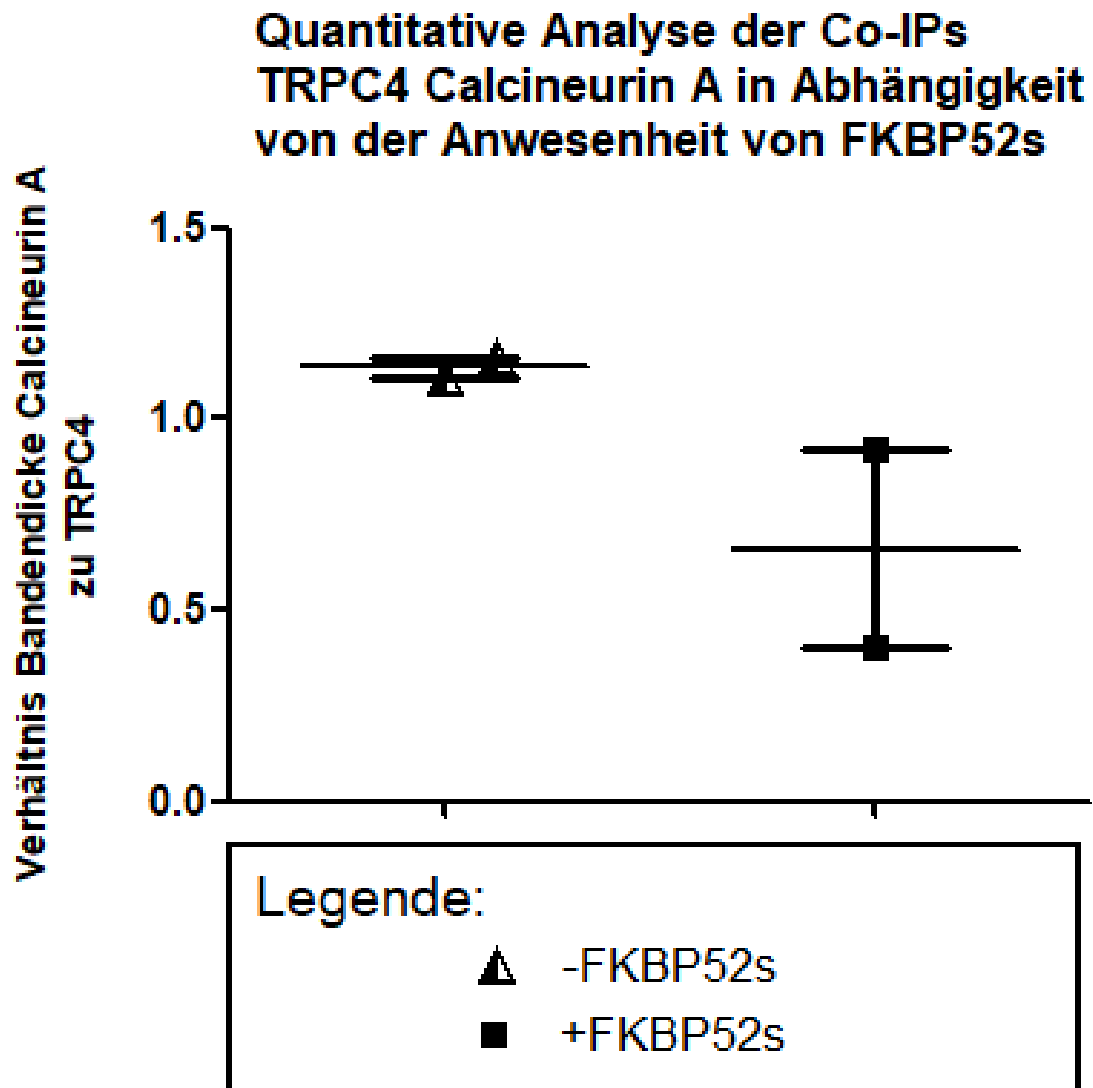
**Quantitative Analyse der Co-IPs  
TRPC3 Calcineurin A in Abhängigkeit  
von der Anwesenheit von FKBP52s**



**Abbildung 15: Quantitative Analyse der TRPC3 CaN A Co-IPs**

Die Grafik zeigt die Verteilung der Quotienten aus Tabelle 1. Zu sehen ist, dass in 2 von 3 Fällen FKBP52s zu einer verminderten Komplexbildung aus TRPC3 und Calcineurin A führt. In einem Fall zeigt sich eine verstärkte Komplexbildung. Die Ergebnisse waren nicht signifikant. Es ist der Durchschnitt und der SEM in Form eines Fehlerbalkens aufgetragen.

(Quelle: Eigene Grafik)



**Abbildung 16: Quantitative Analyse der TRPC4 CaN A Co-IPs**

Die Grafik zeigt die Verteilung der der Quotienten aus Tabelle 1. Zu sehen ist, dass in 2 von 2 Fällen FKBP52s zu einer verminderten Komplexbildung aus TRPC4 und Calcineurin A führt. Die Ergebnisse waren nicht signifikant. Es ist der Durchschnitt und der SEM in Form eines Fehlerbalkens aufgetragen.

(Quelle: Eigene Grafik)

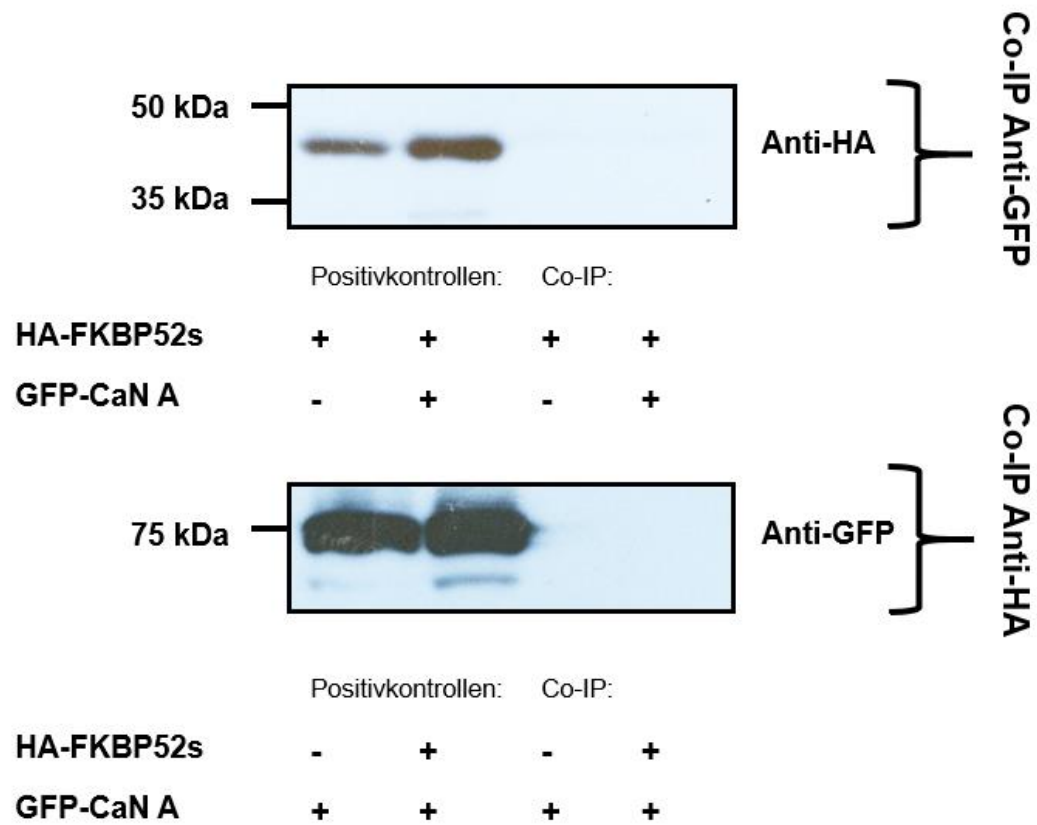
## Ergebnisse

Auch hier zeigt sich, dass in 2 von 2 Fällen FKBP52s zu einer Verringerung der Komplexbildung zu führen scheint. In der Signifikanztestung zeigte sich jedoch erneut kein signifikanter Unterschied.

Damit kann zwar nachgewiesen werden, dass TRPC3 und TRPC4 mit Calcineurin A und FKBP52s Komplexe bilden, es konnte aber nicht mit Signifikanz in dieser kleinen Versuchswiederholung gezeigt werden, welchen Einfluss FKBP52s auf diese Komplexbildung nimmt.

In 3.1 konnte demonstriert werden, dass sowohl das native als auch das um die PPIase-Domäne gekürzte FKBP52 mit den TRPC-Kanälen interagieren, was den Schluss nahelegt, dass neben der PPIase-Domäne weitere Domänen für die Interaktion zwischen TRPC und FKBP52 eine Rolle spielen. In 3.2.1 wurde gezeigt, dass Calcineurin A und TRPC3/4 mittels Co-IP ebenfalls miteinander präzipitiert werden konnten. Daher musste noch ausgeschlossen werden, dass FKBP52s im Gegensatz zum Wildtyp FKBP52 Calcineurin bindet und nicht TRPC (37). Hierfür wurden ebenfalls Co-IPs zwischen Calcineurin A und HA-FKBP52s durchgeführt. Es wurden drei Transfektionen erzeugt: Eine Singletransfektion mit GFP-CaN A, eine Singletransfektion mit HA-FKBP52s und eine Doppeltransfektion mit GFP-CaN A und HA-FKBP52s. Das Ergebnis dieser zwei Co-IPs zeigt Abbildung 17: Eine Bindung zwischen FKBP52s und Calcineurin A konnte nicht nachgewiesen werden. Damit findet die Bindung von FKBP52s an TRPC3 und TRPC4 statt und nicht an das TRPC gebundene Calcineurin A.

## Ergebnisse



**Abbildung 17: FKBP52s und Calcineurin A binden in HEK-293-Zellen nicht aneinander**

Western Blots von Co-IPs mit Anti-GFP gegen ein GFP-getaggtetes Calcineurin A und mit Anti-HA gegen ein HA-getaggtetes FKBP52s in HEK-293-Zellen. Die Detektion erfolgte jeweils mit Anti-GFP und Anti-HA. Die Abbildung zeigt, dass in beiden Co-IPs keine direkte Interaktion zwischen FKBP52s und Calcineurin A beobachtet werden konnte.

(Quelle: Eigene Grafik)

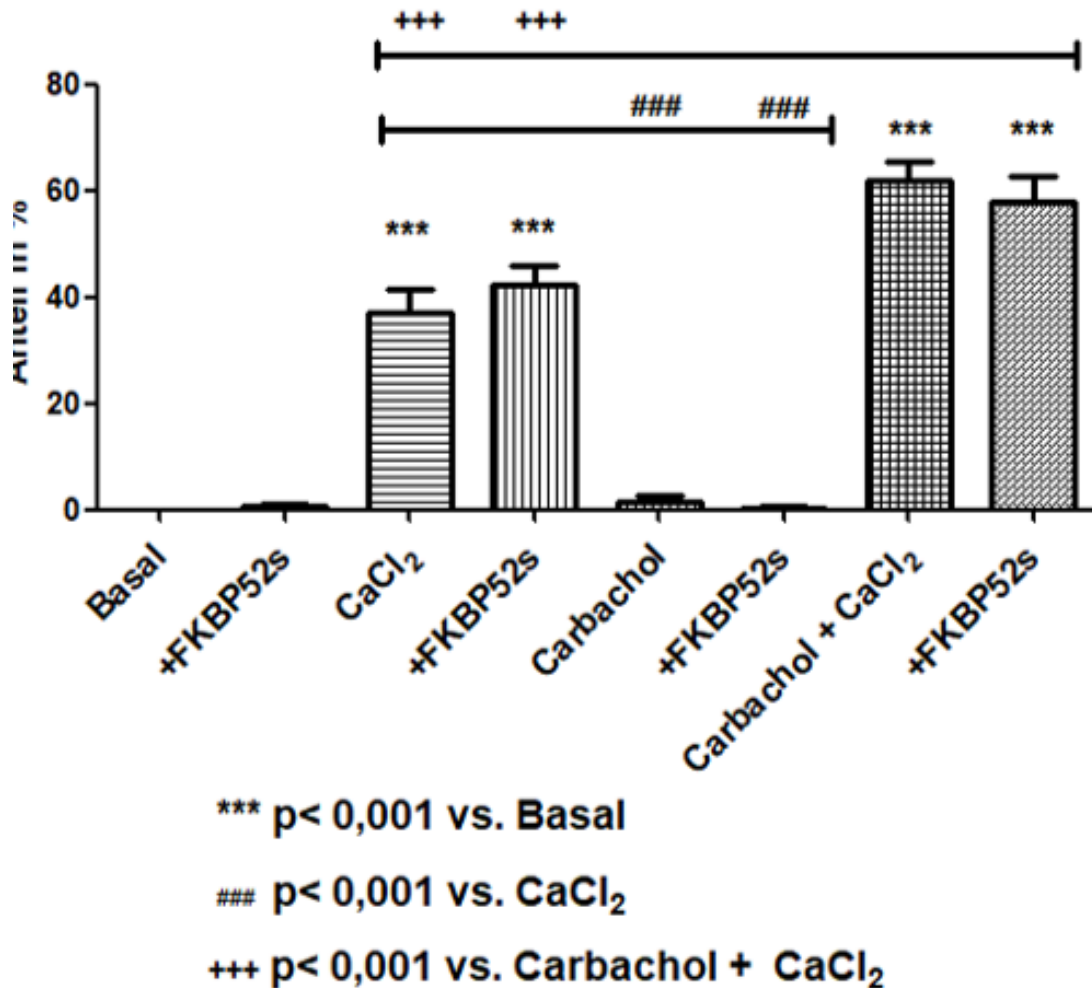


### 3.2.2 Ergebnisse der Fluoreszenzmikroskopie

In 3.1 und 3.2.1 konnte bestätigt werden, dass TRPC3 und TRPC4 mit WT-FKBP52, FKBP52s und Calcineurin Komplexe bilden. Mittels Co-IP war jedoch nicht nachzuweisen, welche Rolle FKBP52s in dieser Komplexbildung spielt. Daher sollte nun untersucht werden, ob diese Interaktion einen Effekt auf die weitere Signalkaskade ausübt. Zu dessen Beurteilung erfolgte die fluoreszenzmikroskopische Auswertung der Calcineurin-abhängigen NFAT-Aktivierung und Translokation in den Zellkern. Hierfür wurden durch Transfektion von HEK-293-Zellen folgende Bedingungen erzeugt: Eine Singletransfektion mit GFP-NFATc1, eine Cotransfektion mit GFP-NFATc1 und FKBP52s, eine Cotransfektion mit TRPC3 bzw. TRPC4, und GFP-NFATc1 und eine Triple Transfektion mit TRPC3 bzw. TRPC4, GFP-NFATc1 und FKBP52s. Anschließend wurden die Zellen vier verschiedenen Stimulationsbedingungen ausgesetzt: a) keine Agonistenstimulation, b) Zugabe von  $\text{CaCl}_2$ , c) Stimulation mit Carbachol und d) Stimulation mit Carbachol und  $\text{CaCl}_2$  (vgl. 2.2.3).

Abbildung 18 zeigt den Einfluss von FKBP52s auf die NFATc1-Translokation, ohne dass die HEK-293-Zellen zusätzlich mit TRPC3 oder TRPC4 transfiziert wurden. Damit lässt sich auch der alleinige Einfluss der Stimulationsbedingungen in Abwesenheit von TRPC-Kanälen auf den Signalweg demonstrieren. Es zeigte sich, dass eine Stimulation mit  $\text{CaCl}_2$  eine starke Aktivierung des Signalweges und Wanderung des Transkriptionsfaktors in die Zellkerne bewirkte. Die Stimulation mit Carbachol allein hingegen erbrachte keine stärkere Translokation von NFATc1 im Vergleich zur unstimulierten Probe.

### NFATc1-Translokation ohne TRPCs



**Abbildung 18: Einfluss von FKBP52s auf die NFATc1-Translokation in Abwesenheit von TRPC-Kanälen in HEK-293-Zellen**

Die Abbildung zeigt den prozentualen Anteil der Zellen, bei denen GFP-NFATc1 nur noch im Kern nachweisbar ist, an der Gesamtzahl der ausgezählten NFATc1-positiv transfizierten Zellen unter verschiedenen Stimulationsbedingungen. Dargestellt sind die vier verschiedenen Stimulationsbedingungen, die linke Säule pro Bedingung (basal, CaCl<sub>2</sub>, Carbachol, Carbachol und CaCl<sub>2</sub>) zeigt die Proben ohne FKBP52s, die rechte Säule jeweils mit FKBP52s. Die Grafik soll die Einflüsse der Stimulationsbedingungen unabhängig von TRPC-Kanälen auf die nukleäre NFATc1-Translokation darstellen und den Einfluss von FKBP52s auf die Translokation unabhängig von TRPC-Kanälen.

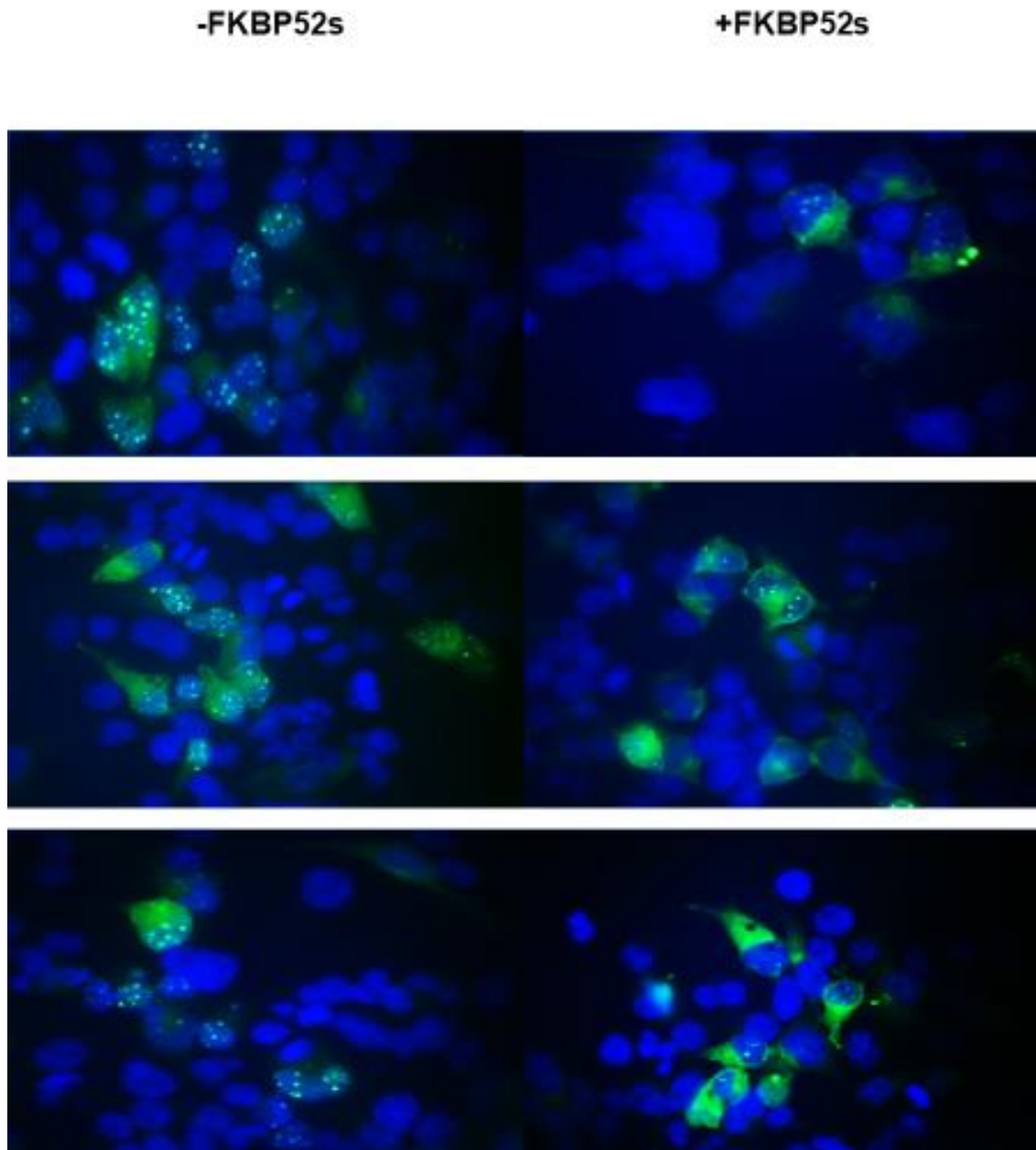
(Quelle: Eigene Grafik)

## Ergebnisse

Dass keine stärkere Translokation von NFATc1 stattfand, liegt daran, dass Carbachol als muskarinerges Stimulator und GPCR-Agonist Gq-abhängig den  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom durch TRPC-Kanäle aktiviert (19) (20). Ein Effekt ist daher nur zu erwarten, wenn gleichzeitig TRPC-Kanäle exprimiert werden, was unter den vorliegenden Bedingungen nicht der Fall war. Interessanterweise zeigten die Proben, die sowohl mit Carbachol als auch mit  $\text{CaCl}_2$  versehen worden waren, eine signifikant höhere Translokation des Transkriptionsfaktors in den Zellkern als unter  $\text{CaCl}_2$  allein. Die Proben mit FKBP52s wiesen jedoch im Vergleich zu der jeweiligen Ausgangsprobe bei jeder Stimulationsbedingung keine signifikant veränderte Translokationsrate auf. Damit ist indirekt gezeigt, dass FKBP52 nur für die TRPC-abhängige NFAT-Aktivierung eine Rolle spielt.

Die Anwesenheit von TRPC3 in den HEK-293-Zellen bewirkte, dass sowohl ohne als auch mit Carbachol- bzw.  $\text{CaCl}_2$ -Stimulation signifikant mehr NFATc1 aktiviert wurde als ohne TRPC3 (Abbildung 20 A und B, Abbildung 21 C). Dass bei der gleichzeitigen Stimulation mit Carbachol und  $\text{CaCl}_2$  kein signifikanter Unterschied zur basalen Bedingung ohne TRPC3 bemerkbar war, lässt sich mit der bereits sehr starken Aktivierung des Signalwegs in Abbildung 18 erklären, sodass der zusätzliche Effekt von TRPC3 darüber hinaus nicht mehr abgrenzbar war. Noch interessanter war, dass sich bei der Stimulation unter Carbachol ein Effekt von FKBP52s in TRPC3+ HEK-293-Zellen nachweisen ließ. Hier zeigte die Anwesenheit des verkürzten Immunophilins eine deutliche und signifikante Reduktion der Kerntranslokation von GFP-NFATc1 bis fast auf das Niveau der Basalbedingung (Abbildung 21 C).

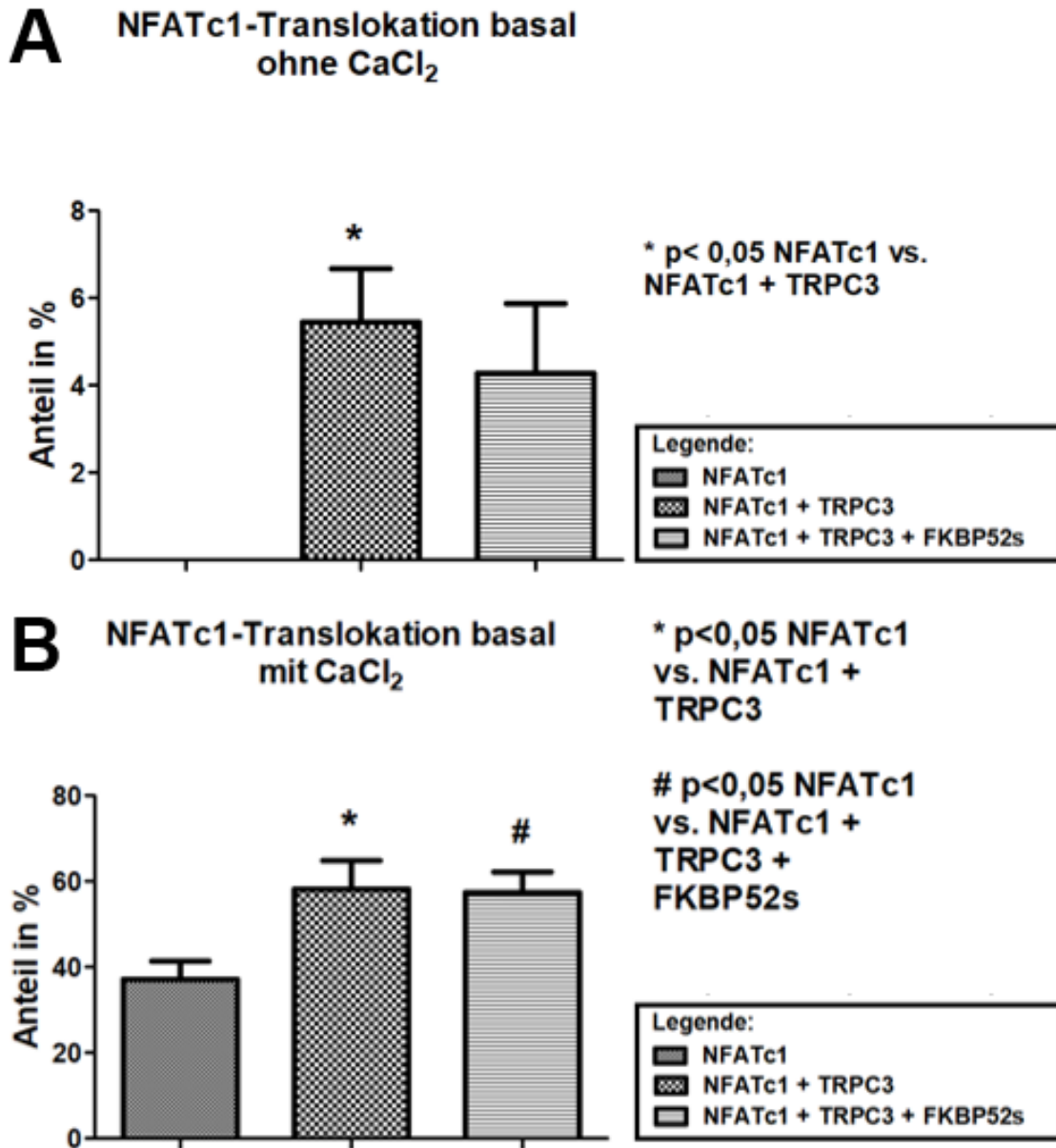
## Ergebnisse



**Abbildung 19: Fluoreszenzmikroskopie der Translokation von GFP-NFATc1 in TRPC3-positiven HEK-293-Zellen in Abhängigkeit von FKBP52s**

Repräsentative fluoreszenzmikroskopische Bilder von HEK-293-Zellen, die mit TRPC3 und GFP-NFATc1 +/- FKBP52s transfiziert wurden. Die Zellen wurden mit Carbachol als GPCR-Agonist stimuliert. Zu erkennen ist die verminderte Translokation des aktivierten Transkriptionsfaktors NFATc1 (in grün) in den Nucleus (blau gefärbt durch den Farbstoff DAPI) in Anwesenheit von FKBP52s.

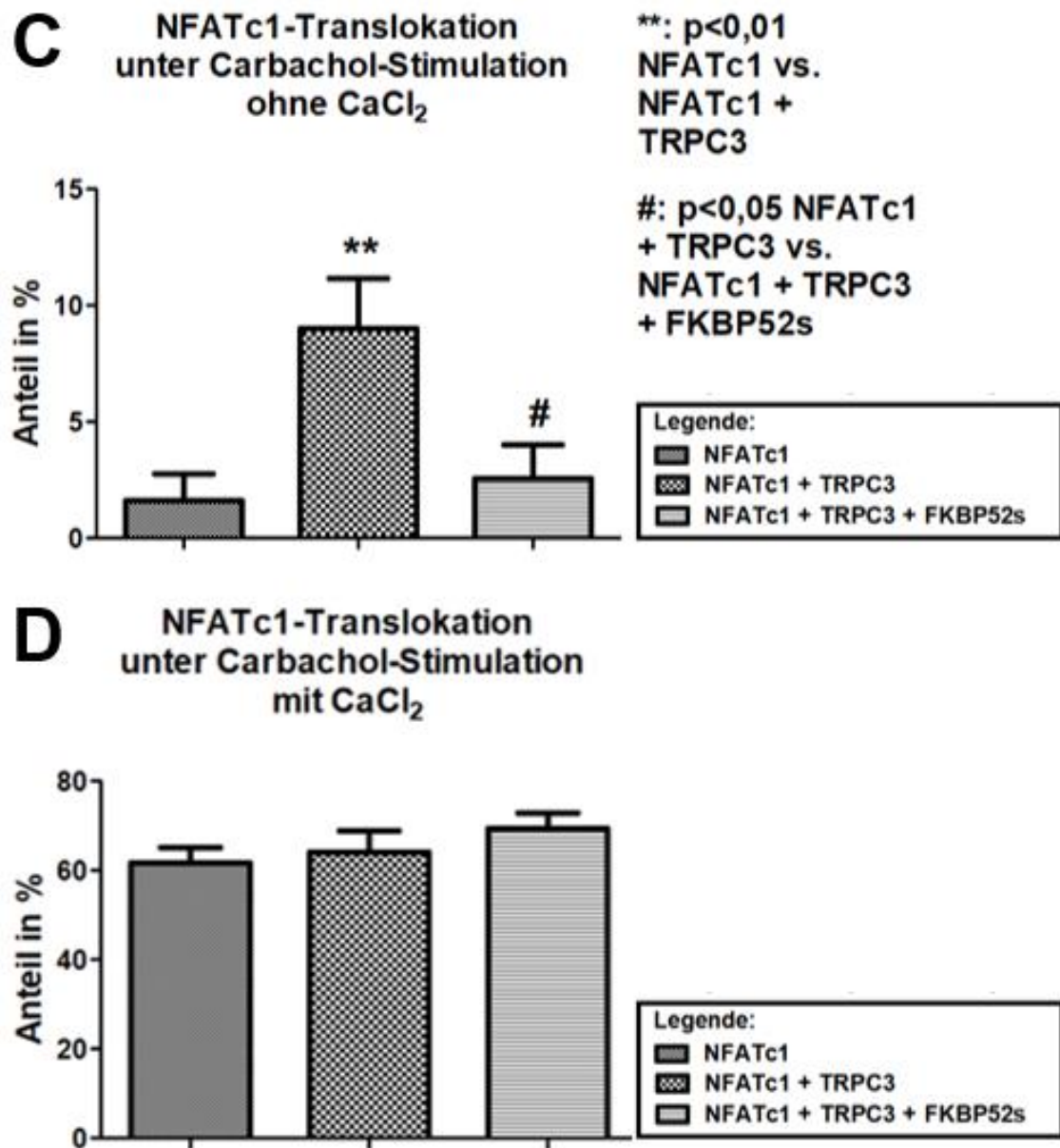
(Quelle: Eigene Grafik)



**Abbildung 20: Nukleäre Translokation von GFP-NFATc1 in TRPC3-transfizierten HEK-293-Zellen in Abhängigkeit von FKBP52s und verschiedenen Stimulationsbedingungen (I)**

Die Grafiken zeigen den Anteil der Zellen mit totaler Kerntranslokation von NFATc1. Das obere Diagramm zeigt dies ohne Stimulation (A), das untere Diagramm unter CaCl<sub>2</sub>-Stimulation (B). Unter beiden Bedingungen bewirkt TRPC3 eine signifikant größere Kerntranslokation des Transkriptionsfaktors im Vgl. zu TRPC3-negativen HEK-293-Zellen. Die Anwesenheit von FKBP52s zeigt hier keinen signifikanten Einfluss auf die Translokation.

(Quelle: Eigene Grafik)



**Abbildung 21: Nukleäre Translokation von GFP-NFATc1 in TRPC3-transfizierten HEK-293-Zellen in Abhängigkeit von FKBP52s und verschiedenen Stimulationsbedingungen (II)**

Die Grafiken zeigen den Anteil der Zellen mit totaler Kerntranslokation von NFATc1. Das obere Diagramm zeigt dies unter Carbachol-Stimulation (C), das untere Diagramm unter Carbachol- und  $\text{CaCl}_2$ -Stimulation (D). Unter Carbachol (C) bewirkt TRPC3 eine signifikant größere Kerntranslokation des Transkriptionsfaktors im Vgl. zu TRPC3-negativen HEK-293-Zellen. Die Anwesenheit von FKBP52s zeigt eine signifikante Verringerung der Translokation fast bis auf das basale Niveau ohne TRPC3. Unter Carbachol- und  $\text{CaCl}_2$ -Stimulation (D) zeigten sich keine signifikanten Effekte.

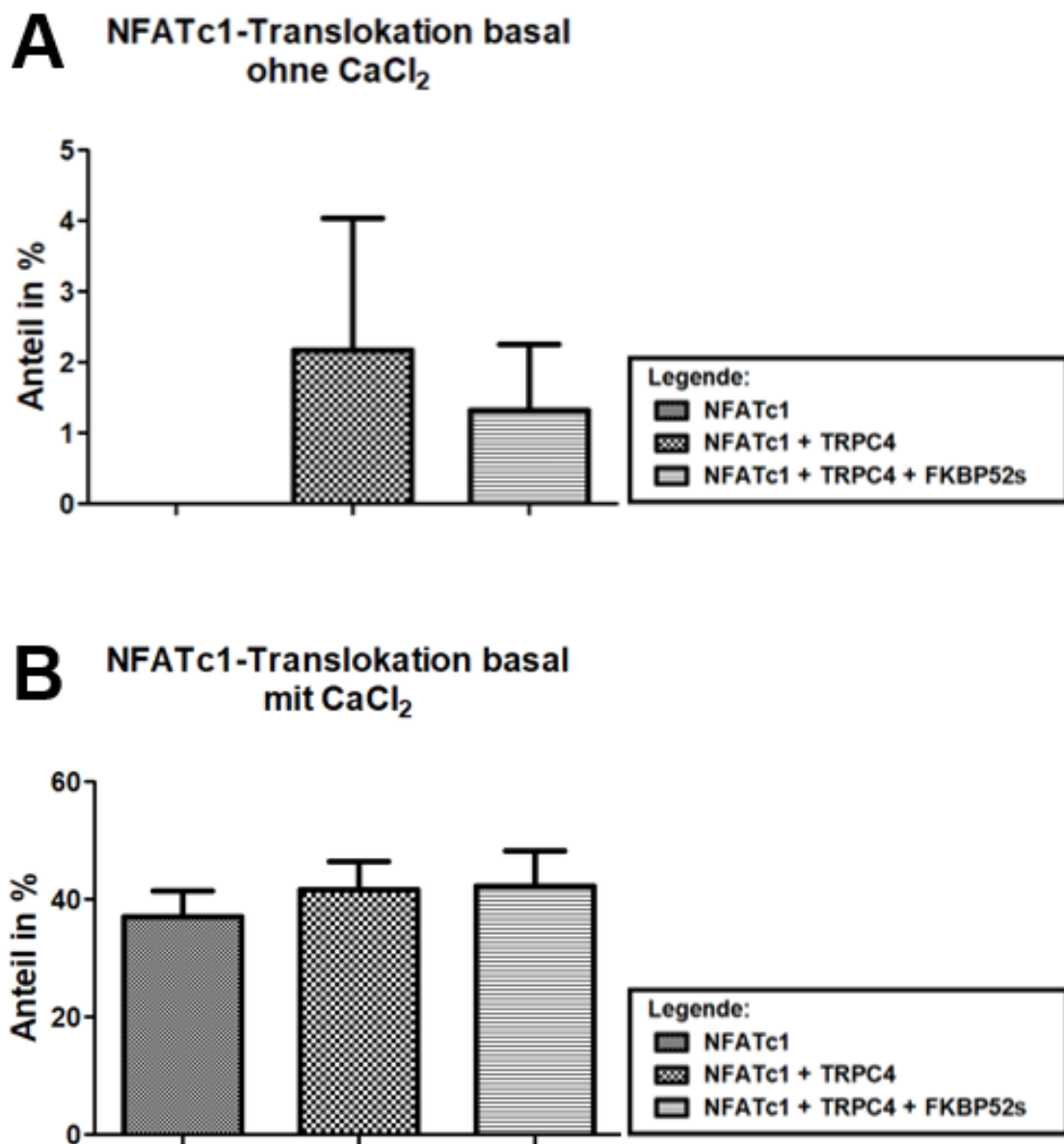
(Quelle: Eigene Grafik)

## Ergebnisse

Diese verminderte Aktivierung des Signalwegs war in den fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen deutlich erkennbar (Abbildung 19). Unter den anderen Stimulationsbedingungen zeigten sich keine signifikanten Einflüsse durch die Anwesenheit von FKBP52s im Vergleich zu der Bedingung, bei der nur TRPC3 vorhanden war.

Ob FKBP52s einen hemmenden oder aktivierenden Einfluss auf den Signalweg zeigt, wurde ebenfalls für TRPC4 untersucht. Es wurden die gleichen Versuchsbedingungen wie für TRPC3 geschaffen. Die Ergebnisse zeigten, dass sich durch TRPC4 im Vergleich zu TRPC3 kein signifikanter Effekt auf die NFATc1-Translokation unter den verschiedenen Stimulationsbedingungen nachweisen ließ (Abbildung 22, Abbildung 23). Die zusätzliche Anwesenheit von FKBP52s zeigte hierbei ebenfalls keine signifikanten Effekte. Damit kann mit dieser Methode die Frage nicht beantwortet werden, welche Rolle die Bindung von FKBP52s an TRPC4 für die Zelle und den weiteren Signalweg spielt.



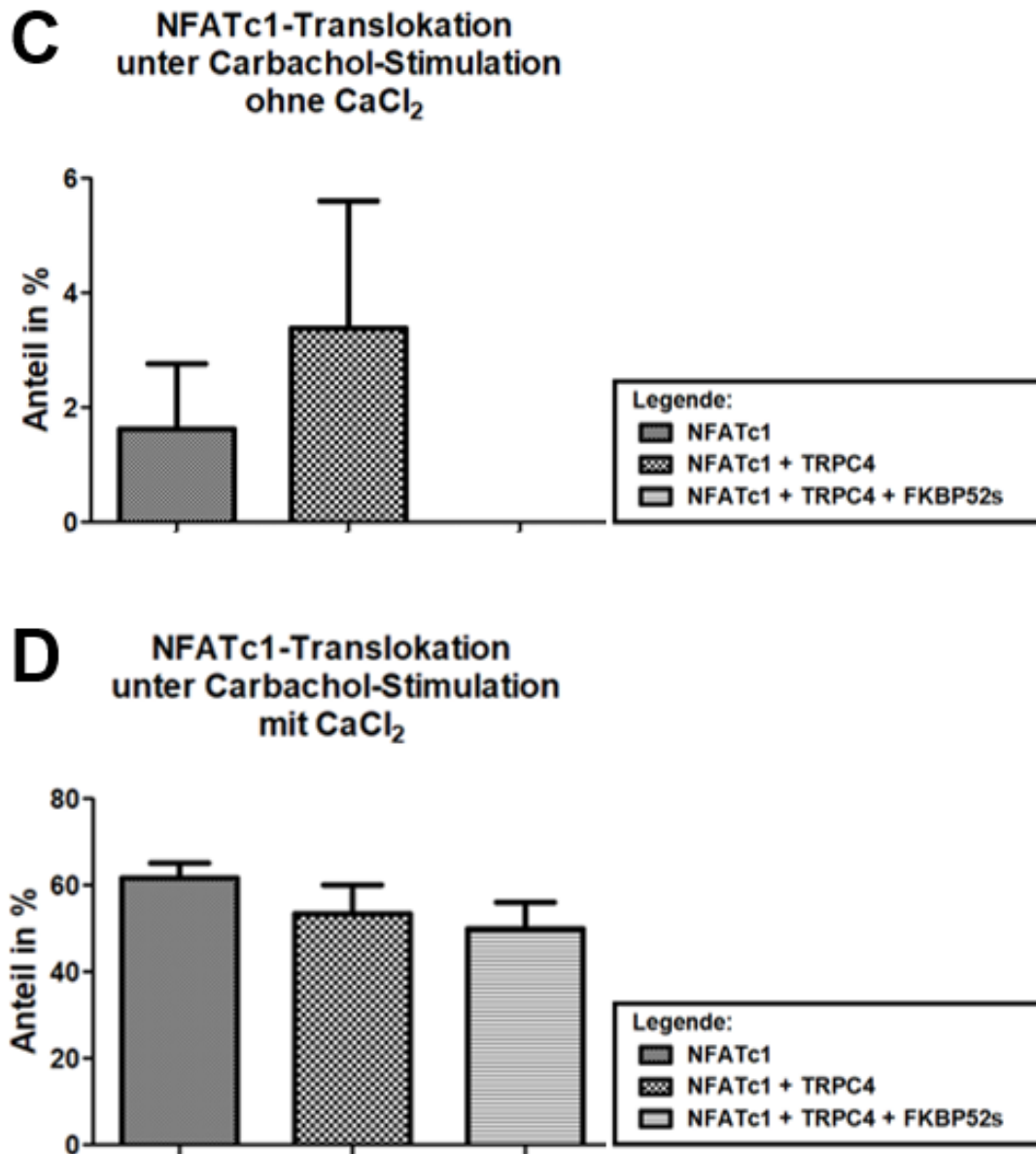


**Abbildung 22: Nukleäre Translokation von GFP-NFATc1 in TRPC4-transfizierten HEK-293-Zellen in Abhängigkeit von FKBP52s und verschiedenen Stimulationsbedingungen (I)**

Die Grafiken zeigen den Anteil der Zellen mit totaler Kerntranslokation von NFATc1. Das obere Diagramm zeigt dies ohne Stimulation (A), das untere Diagramm unter CaCl<sub>2</sub>-Stimulation (B). Unter beiden Bedingungen bewirkt TRPC4 keine signifikant größere Kerntranslokation des Transkriptionsfaktors im Vgl. zu TRPC4-negativen HEK-293-Zellen. Die Anwesenheit von FKBP52s zeigt hier ebenfalls keinen signifikanten Einfluss auf die Translokation.

(Quelle: Eigene Grafik)





**Abbildung 23: Nukleäre Translokation von GFP-NFATc1 in TRPC4-transfizierten HEK-293-Zellen in Abhängigkeit von FKBP52s und verschiedenen Stimulationsbedingungen (II)**

Die Grafiken zeigen den Anteil der Zellen mit totaler Kerntranslokation von NFATc1. Das obere Diagramm zeigt dies unter Carbachol-Stimulation (C), das untere Diagramm unter Carbachol- und  $\text{CaCl}_2$ -Stimulation (D). Unter beiden Bedingungen bewirkt TRPC4 keine signifikant größere Kerntranslokation des Transkriptionsfaktors im Vgl. zu TRPC4-negativen HEK-293-Zellen. Die Anwesenheit von FKBP52s zeigt hier ebenfalls keinen signifikanten Einfluss auf die Translokation trotz Ähnlichkeit zu Abbildung 22 C.

(Quelle: Eigene Grafik)

## 4 Diskussion

### 4.1 Die Bindung zwischen FKBP52 und TRPC3 bzw. TRPC4

Die Daten aus der vorliegenden Arbeit zeigen, dass sowohl das Wildtyp-FKBP52 als auch ein PPIase-defizientes FKBP52-Proteinfragment (hier bezeichnet als FKBP52s) mit den TRPC-Isoformen TRPC3 und TRPC4 in HEK-293-Zellen Proteinkomplexe bilden. Die Co-IPs in dieser Arbeit wurden in beide Richtungen mit Anti-GFP und Anti-FKBP52 durchgeführt (Abbildung 11, Abbildung 12). Ein Problem der Interpretation bei den mit Anti-GFP durchgeführten Co-IPs war die Tatsache, dass das WT-FKBP52 mit einer Größe von 52kDa im Western Blot in dem Bereich zum Liegen kommt, in dem sich auch die schweren Ketten des präzipitierenden Immunglobulins ablagern. Dies führt zu einer Unschärfe der Banden in den Co-IPs mit Anti-GFP (gegen die getaggten TRPC3/TRPC4), was deren Interpretation erschwert. Um diese Überlagerungseffekte zu minimieren, wurde ein Clean-Blot Reagenz verwendet, welches nur an vollständige Antikörper (nämlich die, die zur Detektion verwendet werden) binden soll und nicht an Fragmente der zur Präzipitation verwendeten Antikörper. Damit wurde versucht, unspezifische Effekte der schweren IgG-Kette auf die Detektion von Proteinen im 50kDa Bereich zu vermindern, was aber nur unbefriedigend gelang. Um letztlich bessere Ergebnisse für diese Co-IP zu erhalten, müsste man so wie Sinkins und Kollegen ein getaggtetes WT-FKBP52 verwenden, welches durch das Tag im Western Blot oberhalb des Bereichs der schweren Kette des Immunglobulins zum Liegen kommt (29). Trotzdem kann auch aufgrund der fehlenden Banden in den

Negativkontrollen davon ausgegangen werden, dass es sich bei den Banden tatsächlich um das WT-FKBP52 handelt. Diese Resultate stehen im Widerspruch zu bisherigen Studien, die eine subgruppenspezifische Bindung von FKBP-Proteinen postulierten: Demnach interagiere FKBP52 nur mit der TRPC-Subgruppe bestehend aus TRPC1, 4 und 5 und FKBP12 nur mit TRPC3, 6 und 7 (29). Neuere Arbeiten, z.B. von López und Kollegen aus dem Jahre 2013, bauten auf dieser Hypothese ihre weiteren Studien auf, ohne diese erneut zu prüfen (35). Eine Möglichkeit, um die oben genannten, von der gängigen Literatur abweichenden, Unterschiede im Bindungsverhalten zwischen verschiedenen FKBP- und TRPC-Vertretern zu erklären, könnte das verwendete Zellsystem sein: Während in der Arbeit von Sinkins und Kollegen vor allem sf9-Zellen und Nervenzelllysate verwendet wurden, wurden die Co-IPs in unseren Studien ausschließlich in HEK-293-Zellen durchgeführt (29). FKBP52 wurde initial in einer kardialen cDNA library mittels Y2H gefischt. Folglich könnte in Herzmuskelzellen und HEK-293 ein anderes Bindungsverhalten vorliegen als in sf9-Zellen und Neuronen. Zudem zeigten neuere Forschungsergebnisse, dass TRPC1 sowohl durch FKBP52 als auch durch FKBP12 reguliert wird (28). Ob dies letztlich auf einer Bindung von FKBP12 an TRPC1 basiert, blieb in dieser Arbeit jedoch offen. Das legt zusammen mit den Ergebnissen dieser Arbeit den Schluss nahe, dass die starre Subgruppenspezifität der Immunophiline nicht gegeben ist.

In den Co-IPs aus 3.1 konnte auch das Ergebnis aus den Vorversuchen bestätigt werden, dass FKBP52s an TRPC3 und TRPC4 bindet. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass neben der bekannten PPIase-Domäne noch weitere Molekülteile des Immunophilins mit TRPC interagieren können. Zu diesem Ergebnis kamen auch Sinkins und Kollegen, welche anfangs die

prolinreiche Konsensussequenz innerhalb der TRP Box II in den TRPCs für die alleinige Bindungsdomäne hielten und die Aminosäure, die vor dem zweiten Prolin, welches in dieser Sequenz sechs Aminosäuren C-terminal auf das erste Prolin folgt, für die FKBP-selektive Bindung verantwortlich machten (Tabelle 2) (29). Nach dem Austausch dieser Aminosäure durch Mutation änderte sich das Bindungsverhalten der TRPC-Kanäle gegenüber den Immunophilinen jedoch nicht (29). Das legt damit nahe, dass weitere Domänen in der Interaktion zwischen FKBP52 und TRPC eine Rolle spielen. Dies würde sich mit den Ergebnissen dieser Arbeit decken (Abbildung 6, Abbildung 7).

Zudem wurde in dieser Arbeit untersucht, ob durch die Expression von FKBP52s *in vivo* das WT-FKBP52 von TRPC3 bzw. TRPC4 verdrängt wird. Hierfür ließ sich jedoch in den Versuchen von 3.1 kein Anhaltspunkt finden. Eine mögliche Interpretation dieser Resultate ist, dass der Wildtyp und das verkürzte FKBP52 nicht um die gleiche Bindungsstelle konkurrieren. Das würde bedeuten, dass FKBP52s andere Bindungsstellen bedient als die native Form. Durch Fehlen der PPIase I-Domäne könnte sich die Struktur des Moleküls ändern, sodass es andere Tertiärstrukturen ausbildet und dadurch eine neue Bindungsstelle an TRPC erkennt. Denkbar wäre auch, dass FKBP52s mit dem Wildtyp-FKBP52 dimerisiert und es hierdurch zu keiner messbaren Verminderung der Interaktion im Western Blot kommt und der FKBP52s-Effekt damit nur funktioneller Natur wäre. Diese Option erscheint jedoch eher unwahrscheinlich, da als Stelle der Dimerisierung die PPIase-Domäne vermutet wird (28) (37). Eine weitere Möglichkeit wäre, dass die Bindung von FKBP52s an TRPC über weitere Proteine vermittelt wird, die nur der kurzen Form des Immunophilins als Anker fernab der TRP Box II dienen. Mögliche Kandidaten könnten die Hitzeschockproteine,

Chaperone oder Calmodulin darstellen (37). Potentielle Domänen in FKBP52s für diese Interaktionen wären die PPIase II-Domäne, die TPR-Domänen oder weiter C-terminal gelegene Domänen (Abbildung 5, Abbildung 6) (37). Erwähnenswert hierbei ist, dass sowohl am C-Terminus von TRPC als auch von FKBP52 eine Calmodulin-Interaktionsdomäne vorhanden ist (Abbildung 1, Abbildung 5). Als Erklärung für die fehlende Inhibition dürfte jedoch am wahrscheinlichsten sein, dass die Methode und die Versuchsbedingungen zur Untersuchung dieser Fragestellung nicht optimal waren. Dies wäre durch weitere Co-IPs mit unterschiedlichen Proteinmengen und unter Verwendung eines getaggtten WT-FKBP52 zu überprüfen. Dass die PPIase II-Domäne durch Entfernen der PPIase I-Domäne aktiviert wird und daraufhin die bekannte Bindungsdomäne in der TRP Box II von TRPCs bindet, erscheint unwahrscheinlich, da für diese Domäne bisher keine katalytische Aktivität nachgewiesen wurde und weil FKBP52 in unserem Y2H mit einem Fragment von TRPC3 gefischt wurde, welches die Aminosäuren 742 bis 848 enthält und damit weiter C-terminal liegt als die bisher bekannte Bindungsstelle mit dem Konsensusmotiv in der TRP Box II (Abbildung 6, Abbildung 7) (34) (37). Somit ist, wie bereits auf Seite 79 erwähnt, davon auszugehen, dass das WT-FKBP52 neben der PPIase-Domäne als Bindungsdomäne noch eine zweite C-terminal gelegene Bindungsdomäne besitzt, welche noch genauer danach untersucht werden muss, ob das WT-FKBP52 und FKBP52s um diese konkurrieren. Zum genauen Auffinden der Bindungsstelle sind in einem nächsten Schritt weitere, sukzessiv kleiner werdende Konstrukte von FKBP52 und dem TRPC3-Fragment mit den Aminosäuren 742 bis 848 zu klonieren, um mit diesen die oben genannten Co-IPs zu wiederholen, bis eine Präzipitation ausbleibt. Dann wäre die Bindungsstelle gefunden. Am wahrscheinlichsten

dürfte die Bindungsstelle im Bereich der Calmodulin-Bindungsstelle des FKBP52-Moleküls (Aminosäuren 386-459) zu finden sein (37), da im TRPC3-Fragment, mit dem FKBP52 im Y2H gefischt wurde, ebenfalls dessen Calmodulin-Bindungsstelle lokalisiert ist (6) (38). Eventuell wird die Interaktion hier auch über Calmodulin vermittelt. Daher dürfte auch die spontan vorkommende non-silent Punktmutation an Position 359 (die auch im WT-FKBP52 aus dem Y2H identifiziert wurde (siehe Anhang)) als Normvariante keinen Einfluss auf die Interaktion und damit auf die Ergebnisse dieser Arbeit haben (vgl. 2.2.1.4.12).

In älteren Arbeiten wurden auch Messungen der Änderung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von HEK-293-Zellen durchgeführt, in denen sich zeigte, dass FKBP-Vertreter vor allem das Gating von TRPC6 unter Stimulation mit GPCR-Agonisten beeinflussen (29). Darauf aufbauende Arbeiten wiesen nach, dass GPCR-Agonisten induzierte Konformationsänderungen durch FKBP52 an prolinhaltigen Sequenzen in gemeinsamen Bindungsmotiven von Homer und FKBP52 an C- und N-Terminus von TRPC1 die Geschwindigkeit der Kanalöffnung katalysieren (Abbildung 4) (28). Aus diesem Grunde untersuchten wir die Komplexbildung zwischen TRPC3 und TRPC4 mit FKBP52 nach Stimulation mit Carbachol als GPCR-Agonist: In den Versuchen war jedoch keine quantitative Veränderung der TRPC-FKBP52-Bindung in Anwesenheit von FKBP52s nachweisbar. Bisher unbeantwortet ist auch die Frage, ob FKBP52 bereits im Ruhezustand bindet oder erst durch die Stimulation mit GPCR-Agonisten (39). Um dies zu beantworten, wäre die gemeinsame Analyse von Co-IPs aus unstimulierten und stimulierten TRPC3-/TRPC4- und FKBP52-positiven HEK-293-Zellen mittels derselben

Gel-Elektrophorese notwendig, um die Banden dann quantitativen Auswertungen wie in 2.2.2.7 zu unterziehen.

Für TRPC4 gilt FKBP52 als anerkannter Bindungspartner (29). Auch für TRPC4 wurde gezeigt, dass FKBP52s in HEK-293-Zellen copräzipitiert wird. Eine quantitative Verminderung der FKBP52-TRPC4-Präzipitation durch FKBP52s ließ sich ebenfalls nicht zeigen.

### 4.2 Einfluss von FKBP52 auf den Calcineurin-Signalweg

Die Versuche in 3.2.1 zeigten, dass TRPC3 und TRPC4 jeweils mit Calcineurin A und FKBP52s Komplexe bilden. Optisch zeigte sich eine Verminderung der Komplexbildung bei Anwesenheit von FKBP52s (Abbildung 13, Abbildung 14). Dieser Effekt erwies sich aber in der statistischen Analyse als nicht signifikant (Abbildung 15, Abbildung 16). Allerdings zeigte sich in der fluoreszenzmikroskopischen Analyse der NFATc1-Translokation, dass unter Carbachol-Stimulation bei Anwesenheit von FKBP52s eine signifikante Hemmung des Calcineurin-Signalweges bis auf das TRPC3-freie Basisniveau stattfand (Abbildung 21 C). Dies kann dahingehend interpretiert werden, dass für die Bindung an TRPC3 weitere Domänen neben der Peptidyl-Prolyl-Isomerase des Immunophilins FKBP52 ausreichen und die PPIase-Domäne für die Assemblierung von Calcineurin zum Komplex und zur Kanalaktivierung benötigt wird. Für Calcineurin konnte nachgewiesen werden, dass es nicht mit FKBP52s interagiert (Abbildung 17). Folglich muss die Bindung des FKBP-Konstruktes in den Co-IPs in 3.2.1 an TRPC3 und TRPC4 und nicht an Calcineurin A stattgefunden haben. Bisher gibt es keine Evidenz, dass Calcineurin an die

PPIase-Domäne von FKBP52 bindet: Nach Zugabe von Tacrolimus zeigt FKBP52 - im Gegensatz zu FKBP12 – keine Interaktion mit Calcineurin (37) (40). Auch für die PPIase II-Domäne konnte separat gezeigt werden, dass diese - nach Ausschaltung der PPIase I-Domäne - nicht mit Calcineurin interagiert (37) (41). Für die Beantwortung, wie die Ergebnisse aus 3.2 auf molekularer Ebene zustande kommen könnten, ist die Arbeit von Kim und Saffen heranzuziehen (39): Für Calcineurin konnte nachgewiesen werden, dass es nach Stimulation von M1-Acetylcholinrezeptoren (AChR) durch Carbachol einen Komplex mit dem durch die PKC phosphorylierten TRPC6 und FKBP12 bildet, in dem FKBP12 zusammen mit einem Serin als Anker für Calcineurin A dient. Daraufhin soll Calcineurin das an Position 768/714 phosphorylierte Serin, welches Teil der Immunophilin-Interaktionsstelle im TRPC6 Molekül ist, dephosphorylieren. Calcineurin und FKBP12 bleiben interessanterweise auch nach 10 Minuten, wenn die Proteinkinase und der AChR schon lange dissoziiert sind, noch mit dem Komplex assoziiert (39). Möglicherweise hat diese Interaktion daher nicht nur für die Dephosphorylierung von TRPC6 eine Bedeutung, sondern auch für die Aktivierung von Calcineurin und des weiteren Signalweges. Auch für TRPC3 wurde von Trebak und Kollegen ein Serin an Aminosäure-Position 712 als Phosphorylierungsstelle nachgewiesen (42), welches wie das Serin von TRPC6 direkt in der bekannten PPIase I-Bindungsstelle in der TRP Box II liegt (vgl. Tabelle 2) (42). Demnach scheinen die für TRPC6 gezeigten Vorgänge auf TRPC3 (und TRPC4, welches dort ebenfalls ein Serin besitzt) übertragbar zu sein. Das würde bedeuten, dass nicht allein die PPIase-Domäne für die Bindung von Calcineurin notwendig wäre, sondern die Kombination aus der prolinreichen Sequenz in der TRP Box II gepaart mit einem phosphorylierbaren Serin und der aktiven PPIase-Domäne von



FKBP52: Durch die Bindung des prolinhaltigen Motivs in TRPC3/TRPC4 - ähnlich wie bei Bindung von Tacrolimus- könnte FKBP52 seine räumliche Struktur verändern, wodurch es dann zusammen mit dem Phosphoserin Calcineurin bindet, was der FKBP52-Tacrolimus-Komplex allein ohne TRPC nicht vermag (40). Die Rekrutierung von Calcineurin zum Komplex scheint für dessen Aktivierung wichtig zu sein: Calcineurin bedarf der Aktivierung durch einen  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom um Dephosphorylierungen, z.B. von TRPC-Kanälen oder von NFAT, durchführen zu können (6) (39). Durch die Komplexbildung befindet sich Calcineurin direkt an der Kanalpore lokalisiert, durch die unter anderem  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen einströmen, und kann dadurch in diesem Mikromilieu schneller aktiviert werden als in gelöster Form im Zytosol schwimmend. Da FKBP52s die PPIase I-Domäne jedoch fehlt, würde nach dieser Hypothese folglich die Rekrutierung von Calcineurin zum Komplex an oben genannter Bindungsstelle nicht stattfinden (Abbildung 24). FKBP52s setzt damit folglich auch die Aktivität des weiteren Calcineurin-NFAT-Signalweges herab wie in unseren fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen gezeigt (Kapitel 3.2.2). Eine weiterer, denkbarer Erklärungsansatz für dieses Ergebnis wäre, dass FKBP52s auf Grund einer veränderten Tertiärstruktur an die gleiche Stelle wie Calcineurin bindet und dadurch diese für Calcineurin blockiert. Das würde bedeuten, es gäbe in der TRP Box II von TRPC3 und TRPC4 eine Bindungsstelle, die nur FKBP52s besetzen kann, nicht jedoch das WT-FKBP52. Dies könnte damit erklärt werden, dass durch das Fehlen der PPIase-Domäne die tertiäre Konformation von FKBP52 geändert wird und damit weitere Interaktionen mit TRPC möglich werden, die es davor nicht waren. Dagegen spricht, dass FKBP52 mit einem TRPC3-Fragment im Y2H gefischt wurde, welches weit C-terminal der bekannten PPIase-

Bindungsdomäne in TRPC3 liegt und damit dürfte sich dort auch die vermutete Bindungsstelle von FKBP52s befinden und nicht in der TRP Box II. (Abbildung 6, Abbildung 7).

<b>TRPC-Subtyp:</b>	<b>Aminosäuresequenz in der PPIase-Bindungsdomäne der TRPC-Kanäle</b>
<b>TRPC1</b>	<b>LPPPFNIIPSPK</b>
<b>TRPC3</b>	<b>LPPPFSLVPSPK</b>
<b>TRPC4</b>	<b>LPTPFNVIPSPK</b>
<b>TRPC5</b>	<b>LPPPFNIIPSPK</b>
<b>TRPC6</b>	<b>LPVPFNLVPSPK</b>
<b>TRPC7</b>	<b>LPAPFNLVPSPK</b>

**Tabelle 2: PPIase-Bindungsdomänen in TRPC-Molekülen**

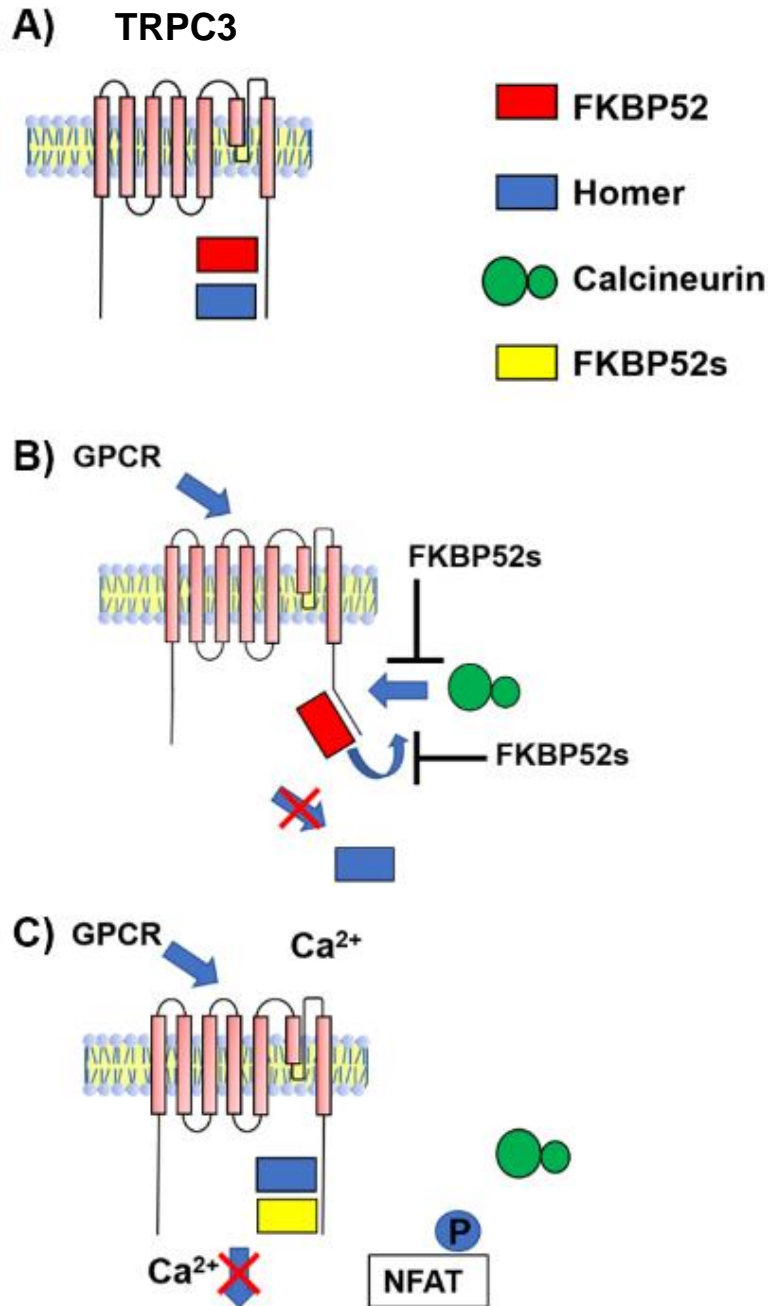
Gezeigt sind die PPIase-Bindungsdomänen in den TRPC-Molekülen mit den Konsensussequenzen im Bereich der TRP Box II. Auffällig ist, dass in allen Sequenzen als zehnte Aminosäure nach dem initialen LP Motiv ein Serin folgt. Für TRPC3 und TRPC6 wurde gezeigt, dass dieses Serin phosphoryliert wird. Für TRPC6 wurde nachgewiesen, dass das Phosphoserin von Calcineurin dephosphoryliert wird. Daher ist zu vermuten, dass alle TRPCs mit Calcineurin an der gleichen Stelle interagieren. (Quelle: Sinkins WG, Goel M, Estacion M, Schilling WP. Association of immunophilins with mammalian TRPC channels. J Biol Chem.. 2004 Aug 13;279(33):34521-9. Epub 2004 Jun 15).

Um die Aktivität des Calcineurin-NFAT-Signalweges zu untersuchen, wurde die Translokation des Transkriptionsfaktors NFATc1 als Aktivitätsparameter untersucht (vgl. 3.2.2.): Während unter basalen Bedingungen kein signifikanter Effekt von FKBP52s auf den Signalweg zu sehen war, zeigte sich, dass unter Carbachol-Stimulation die Aktivierung des Calcineurin-NFAT-Signalwegs in TRPC3-exprimierenden HEK-293-Zellen signifikant vermindert war (Abbildung 21 C). Diese Beobachtung deckt sich mit den meisten Arbeiten zu dem Thema, welche FKBP52 für das

agonistenabhängige Öffnen des Kanales verantwortlich machen (28) (29). Für TRPC1 konnte gezeigt werden, dass FKBP52 in der Nähe der oben erwähnten Calcineurin-Dephosphorylierungsstelle in der TRP Box II mit der PPIase I-Domäne bindet (Tabelle 2, Abbildung 6). In der gleichen Region befindet sich die überlappende, aber nicht identische Bindungsstelle für Homer und auch das Protein STIM1 bindet nicht weit entfernt (28). Von Homer ist bekannt, dass es autodimerisieren kann und dadurch über Bindung an den N- und C-Terminus TRPC1 in einem geschlossenen Zustand hält (Abbildung 4) (16) (17) (28). Alle TRPC-Moleküle besitzen eine C-terminale Homer-Bindungsstelle und dort auch die überlappende Bindungsstelle für die Immunophiline (16) (17). Damit scheinen diese Vorgänge auf die anderen TRPC-Vertreter übertragbar zu sein. FKBP52 katalysiert nach Agonistenstimulation PPIase-abhängig Konformationsänderungen in der Homer-Bindungsregion, was zur Dissoziation von Homer vom Kanal und damit zu dessen Öffnung beiträgt (Abbildung 4) (28). In dieser Darstellung wird auf die weitaus komplexeren Vorgänge bei der Kanalöffnung, in denen auch der IP<sub>3</sub>-Rezeptor und STIM1 eine Rolle spielen, verzichtet, jedoch ist anzumerken, dass auch STIM1 dort bindet, sodass auch dessen Bindungsstelle von der PPIase-induzierten Konformationsänderung betroffen sein kann (17) (28). Da FKBP52s keine aktive PPIase-Domäne besitzt, ist es ihm daher nicht möglich, diese Katalyse zu vollführen, was dann zu einer geringeren Öffnungsfrequenz und damit zu einer verringerten Aktivierung des Signalweges führt (Abbildung 24). Interessant wäre hierbei, die Bindung von Homer unter FKBP52s-Anwesenheit quantitativ zu untersuchen, ob die Bindung von Homer an TRPC bei Anwesenheit von FKBP52s unter Agonistenstimulation gleichbleibt. Möglicherweise ist diese Konformationsänderung durch die

cis-trans-Isomerisierung in dieser für das Gating kritischen Region auch ein notwendiger Schritt für die weiter oben diskutierte Calcineurin Assemblierung zum Komplex. Für diese Katalyse ist eine aktive PPIase notwendig, welche sowohl FKBP12 als auch FKBP52 besitzen. Damit können beide PPIasen Calcineurin zum TRPC-FKBP-Komplex rekrutieren, wie bereits auf Seite 83-84 diskutiert, was FKBP52s mit seiner katalytisch inaktiven PPIase II nicht vermag (Abbildung 24) (39).

Obwohl viele Effekte, die sich für TRPC3 zeigen ließen, auch für TRPC4 vorhanden zu sein scheinen, blieb die NFATc1-Translokation ohne signifikantes Ergebnis, was eine Interpretation erschwert. Letztlich können hier nur weitere Versuche Aufschluss darüber bringen, welchen Einfluss ein verkürztes FKBP52 bzw. die zweite C-terminal gelegene Bindungsstelle auf die nachgewiesene TRPC4-Calcineurin-Interaktion besitzt.



**Abbildung 24: Hypothese zur Wirkung von FKBP52s auf die Kaskade**

(A) demonstriert den physiologischen Zustand ohne Stimulation und ohne FKBP52s (Vgl. Abbildung 4). Hypothetisch bestehen zwei Wege, auf denen FKBP52s hemmend in die Kaskade unter GPCR-Stimulation eingreifen kann (B): Durch das Fehlen der PPIase-Domäne kann zum einen das gebundene FKBP52s keine cis-trans-Isomerisierung durchführen, wodurch eine Kanalöffnung und Dissoziation von Homer unterbleibt. Zum anderen wird eine Bindung von Calcineurin im Bereich der Phosphorylierungsstelle verhindert. (C) zeigt den Zustand, wenn FKBP52s gebunden hat und den Kanal in einem inaktiven Zustand hält: Ca<sup>2+</sup>-Einstrom, Bindung von Calcineurin und Aktivierung von NFAT unterbleiben. (Quelle: Eigene Grafik)

### 4.3 Ausblick

Die Daten dieser Arbeit ergänzen und erweitern ein bestehendes Modell der TRPC-FKBP52-Interaktion, indem sie nahelegen, dass neben der bekannten PPIase-Domäne noch weitere Bindungsdomänen vorhanden sind. Als Nächstes muss sich daher eine genaue Identifizierung dieser Bindungsstelle anschließen. Dies kann nach Erzeugung weiterer verkürzter FKBP52- und TRPC-Fragmente (mittels PCR und Umklonierung in einen Expressionsvektor) durch Co-IPs zwischen diesen Fragmenten erfolgen.

Auf Grund der gewonnenen Daten ist eine Änderung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Membranströme in Abhängigkeit von der Anwesenheit von FKBP52s unter Agonistenstimulation zu erwarten. Wenn die oben aufgestellte Hypothese zur Interaktion zutrifft, sollte unter Carbachol-Stimulation eine Verminderung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Transmembranströme zu messen sein, wenn FKBP52s exprimiert wird. Dies wäre dann in einem ersten Schritt für HEK-293-Zellen zu erheben, um dies dann in einem zweiten Schritt an Kardiomyozyten zu wiederholen. Hierfür wurden bereits FKBP52s-Viruskonstrukte erzeugt (Vgl. 2.2.1.4).

Auch könnten, wie bereits in 4.1 diskutiert, in weiteren Co-IPs mit Hilfe eines getaggtten und damit schwereren WT-FKBP52-Konstruktes qualitativ bessere Ergebnisse ohne den störenden Einfluss der schweren IgG-Kette im Western Blot erzielt werden. Dann sollte auch eine quantitative Analyse der Protein-Protein-Interaktion nach der Frage möglich sein, inwiefern FKBP52s eine Komplexbildung zwischen TRPC und dem Wildtyp-FKBP52 stört.

Da die quantitative Untersuchung der Co-IPs in 3.2.1 keine signifikanten Ergebnisse brachte, wäre eine Wiederholung derselben denkbar, um so eine größere Stichprobe und damit Signifikanz zu erhalten. Auch eine Auswertung der Waschlösungen mit Bestimmung der Konzentration der relevanten Proteine darin wäre ein sinnvoller Schritt, um die Interaktion besser zu quantifizieren. Der Einsatz weiterer Methoden zur Quantifizierung einer Protein-Protein-Interaktion wäre denkbar, wie zum Beispiel weiterer Ligandenbindungstests oder eine bimolekulare Fluoreszenzkomplementation. Nach Anwendung in HEK-293-Zelle ist dies auf Kardiomyozyten zu übertragen.

Über Western Blots von Kernpräparationen könnte die NFAT-Translokation unter den oben genannten Transfektions- und Stimulationsbedingungen weiter quantitativ untersucht werden. Der Einsatz eines Konfokalmikroskopes würde verlässlichere Aussagen zur Lokalisation des fluoreszierenden NFATc1 in der Fluoreszenzmikroskopie möglich machen. Auch über die quantitative Auswertung NFAT-abhängiger Proteinexpressionen im Western Blot könnten weitere Aussagen zur Hemmung des Signalweges durch FKBP52s getroffen werden.

Schließlich ist auch der Effekt von FKBP52s in Herzinsuffizienz-Zellmodellen interessant, ob es hier zu einer verminderten Hypertrophie und Proteinexpression kommt, wenn die Kardiomyozyten FKBP52s exprimieren.

Sollten sich in den Folgearbeiten die gleichen Effekte nachweisen lassen, hätte man ein neues interessantes pharmakologisches Ziel gefunden, um gezielt Schlüsselprozesse der Herzinsuffizienz zu unterbinden.

## Literaturverzeichnis

1. Bundesärztekammer (BÄK), Kassenärztliche Bundesvereinigung (KBV), Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF). Nationale VersorgungsLeitlinie Chronische Herzinsuffizienz –Langfassung, 2. Auflage. Version 3. [Online] 2017. [Zitat vom: 27. Juni 2019.] <https://www.leitlinien.de/mdb/downloads/nvl/herzinsuffizienz/archiv/herzinsuffizienz-2aufl-vers1-lang.pdf>. DOI: 10.6101/AZQ/000405.
2. McMurray JJ, Stewart S. Epidemiology, aetiology, and prognosis of heart failure. *Heart*. 2000 May;83(5):596-602., S. 596-602.
3. Roger VL, Weston SA, Redfield MM, et al. Trends in heart failure incidence and survival in a community-based population. *JAMA*. 2004 Jul 21;292(3):344-50., S. 344-350.
4. Neumann T, Biermann J, Erbel R, et al. Heart failure: the commonest reason for hospital admission in Germany: medical and economic perspectives. *Dtsch Arztebl Int*. . 2009 Apr;106(16):269-75. doi: 10.3238/arztebl.2009.0269. Epub 2009 Apr 17., S. 269-275.
5. Stewart S, MacIntyre K, Capewell S, McMurray JJ. Heart failure and the aging population: an increasing burden in the 21st century? *Heart*. 2003 Jan;89(1):49-53., S. 49-53.
6. Eder P, Molkenin JD. TRPC Channels As Effectors of Cardiac Hypertrophy. *Circ Res*. 2011 Jan 21;108(2):265-72. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.110.225888., S. 265-272.



7. Kuwahara K, Wang Y, McAnally J, et al. TRPC6 fulfills a calcineurin signaling circuit during pathologic cardiac remodeling. *J Clin Invest.* 2006 Dec;116(12):3114-26. Epub 2006 Nov 9., S. 3114-3126.
8. Nakayama H, Wilkin BJ, Bodi I, Molkenin JD. Calcineurin-dependent cardiomyopathy is activated by TRPC in the adult mouse heart. *FASEB J.* 2006 Aug;20(10):1660-70., S. 1660-1670.
9. Eder P. Cardiac Remodeling and Disease: SOCE and TRPC Signaling in Cardiac Pathology. [Hrsg.] K Groschner , W Gaier und C Romanin. *Store-Operated Ca<sup>2+</sup> Entry (SOCE) Pathways. Advances in Experimental Medicine and Biology, vol 993.* Cham : Springer, 2017, S. 505-521.
10. Cosens DJ, Manning A. Abnormal electroretinogram from a *Drosophila* mutant. *Nature.* 1969 Oct 18;224(5216):285-7., S. 285-287.
11. Hardie RC, Minke B. The *trp* gene is essential for a light-activated Ca<sup>2+</sup> channel in *Drosophila* photoreceptors. *Neuron.* 1992 Apr;8(4):643-51., S. 643-651.
12. Clapham DE. TRP channels as cellular sensors. *Nature.* 2003 Dec 4;426(6966):517-24., S. 517-524.
13. Dietrich A, Mederos y Schnitzler M, Emmel J, et al. N-linked protein glycosylation is a major determinant for basal TRPC3 and TRPC6 channel activity. *J Biol Chem.* . 2003 Nov 28;278(48):47842-52. Epub 2003 Sep 11., S. 47842-47852.
14. Dietrich A, Kalwa H, Rost BR, Gudermann T. The diacylglycerol-sensitive TRPC3/6/7 subfamily of cation channels: functional characterization and physiological relevance. *Pflugers Arch.* 2005 Oct;451(1):72-80. Epub 2005 Jun 22., S. 72-80.

15. Kiselyov K, Xu X, Mozhayeva G, et al. Functional interaction between InsP3 receptors and store-operated Htrp3 channels. *Nature*. 1998 Dec 3;396(6710):478-82., S. 478-482.
16. Yuan JP, Kiselyov K, Shin DM, et al. Homer binds TRPC family channels and is required for gating of TRPC1 by IP3 receptors. *Cell*. 2003 Sep 19;114(6):777-89., S. 777-789.
17. Yuan JP, Lee KP, Hong JH, Muallem S. The closing and opening of TRPC channels by Homer1 and STIM1. *Acta Physiol (Oxf)*. Februar 2012 Feb;204(2):238-47. doi: 10.1111/j.1748-1716.2011.02319.x. Epub 2011 May 27., S. 238-47.
18. Zhu, MX. Multiple roles of calmodulin and other Ca(2+)-binding proteins in the functional regulation of TRP channels. *Pflugers Arch*. 2005 Oct;451(1):105-15. Epub 2005 May 28.
19. Deutzmann R. Mechanismen der Signaltransduktion. [Buchverf.] Rassow J, Hauser K, Netzker R, Deutzmann R. *Duale Reihe Biochemie*. Stuttgart : Georg Thieme Verlag KG, 2008.
20. Deutzmann R. Hormonelle Regulation. [Buchverf.] Behrends JC, Bischofberger J, Deutzmann R, et al. *Duale Reihe Physiologie*. Stuttgart : Georg Thieme Verlag KG, 2010.
21. Welsh DG, Morielli AD, Nelson MT, Brayden JE. Transient receptor potential channels regulate myogenic tone of resistance arteries. *Circ Res*. 2002 Feb 22;90(3):248-50., S. 248-250.
22. Maroto R, Raso A, Wood TG, et al. TRPC1 forms the stretch-activated cation channel in vertebrate cells. *Nat Cell Biol*. 2005 Feb;7(2):179-85. Epub 2005 Jan 23., S. 179-185.

23. Spassova MA, Hewavitharana T, Xu W, et al. A common mechanism underlies stretch activation and receptor activation of TRPC6 channels. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Oct 31;103(44):16586-91. Epub 2006 Oct 20., S. 16586-16591.
24. Bush EW, Hood DB, Papst PJ, et al. Canonical transient receptor potential channels promote cardiomyocyte hypertrophy through activation of calcineurin signaling. *J Biol Chem*. 2006 Nov 3;281(44):33487-96. Epub 2006 Sep 1., S. 33487-33496.
25. Ohba T, Watanabe H, Murakami M, et al. Upregulation of TRPC1 in the development of cardiac hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol*. 2007 Mar;42(3):498-507. Epub 2006 Dec 15., S. 498-507.
26. Niizeki T, Takeishi Y, Kitahara T, et al. Diacylglycerol kinase-epsilon restores cardiac dysfunction under chronic pressure overload: a new specific regulator of G $\alpha$ (q) signaling cascade. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. . 2008 Jul;295(1):H245-55. doi: 10.1152/ajpheart.00066.2008. Epub 2008 May 16., S. 245-255.
27. Brenner JS, Dolmetsch RE. TrpC3 regulates hypertrophy-associated gene expression without affecting myocyte beating or cell size. *PLoS One*. 2007 Aug 29;2(8):e802., S. e802.
28. Shim S, Yuan JP, Kim JY, et al. Peptidyl-prolyl isomerase FKBP52 controls chemotropic guidance of neuronal growth cones via regulation of TRPC1 channel opening. *Neuron*. 2009 Nov 25;64(4):471-83. doi: 10.1016/j.neuron.2009.09.025., S. 471-483.
29. Sinkins WG, Goel M, Estacion M, Schilling WP. Association of immunophilins with mammalian TRPC channels. *J Biol Chem*. . 2004 Aug 13;279(33):34521-9. Epub 2004 Jun 15., S. 34521-34529.

30. Galat A. Peptidylprolyl cis/trans isomerases (immunophilins): biological diversity--targets--functions. *Curr Top Med Chem.* 2003;3(12):1315-47., S. 1315-1347.
31. Adams B, Musiyenko A, Kumar R, Barik S. A novel class of dual-family immunophilins. *J Biol Chem.* 2005 Jul 1;280(26):24308-14. Epub 2005 Apr 21., S. 24308-24314.
32. Koster MI, Lu SL, White LD, et al. Reactivation of developmentally expressed p63 isoforms predisposes to tumor development and progression. *Cancer Res.* 2006 Apr 15;66(8):3981-6., S. 3981-3986.
33. Goel M, Garcia R, Estacion M, Schilling WP. Regulation of Drosophila TRPL channels by immunophilin FKBP59. *J Biol Chem.* 2001 Oct 19;276(42):38762-73. Epub 2001 Aug 20., S. 38762-38773.
34. Venkatachalam K, Montell C. TRP channels. *Annu Rev Biochem.* 2007;76:387-417.
35. López E, Berna-Erro A, Salido GM, et al. FKBP52 is involved in the regulation of SOCE channels in the human platelets and MEG 01 cells. *Biochim Biophys Acta.* 2013 Mar;1833(3):652-62. doi: 10.1016/j.bbamcr.2012.11.029. Epub 2012 Dec 8., S. 652-662.
36. Sivils JC, Storer CL, Galigniana MD, Cox MB. Regulation of steroid hormone receptor function by the 52-kDa FK506-binding protein (FKBP52). *Curr Opin Pharmacol.* 2011 Aug;11(4):314-9. doi: 10.1016/j.coph.2011.03.010. Epub 2011 Apr 19.
37. Davies TH, Sánchez ER. FKBP52. *Int J Biochem Cell Biol.* 2005 Jan;37(1):42-7., S. 42-47.

38. Eder P, Schindl R, Romanin C, Groschner K. Protein–Protein Interactions in TRPC Channel Complexes. [Hrsg.] WB Liedtke und S Heller. *TRP Ion Channel Function in Sensory Transduction and Cellular Signaling Cascades*. Boca Raton (FL) : CRC Press/Taylor & Francis, 2007, S. Chapter 24.
39. Kim JY, Saffen D. Activation of M1 muscarinic acetylcholine receptors stimulates the formation of a multiprotein complex centered on TRPC6 channels. *J Biol Chem*. 2005 Sep 9;280(36):32035-47. Epub 2005 Jun 30., S. 32035-32047.
40. Li P, Ding Y, Wu B, et al. Structure of the N-terminal domain of human FKBP52. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 2003 Jan;59(Pt 1):16-22. Epub 2002 Dec 19., S. 16-22.
41. Chambraud B, Rouvière-Fourmy N, Radanyi C, et al. Overexpression of p59-HBI (FKBP59), full length and domains, and characterization of PPlase activity. *Biochem Biophys Res Commun*. 1993 Oct 15;196(1):160-6.
42. Trebak M, Hempel N, Wedel BJ, et al. Negative regulation of TRPC3 channels by protein kinase C-mediated phosphorylation of serine 712. *Mol Pharmacol*. 2005 Feb;67(2):558-63. Epub 2004 Nov 8., S. 558-563.
43. Marks AR. Cellular functions of immunophilins. *Physiol Rev*. 1996 Jul;76(3):631-49., S. 631-649.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung von TRPC-Kanälen .....	4
Abbildung 2: Modulation von kardialen Zellfunktionen durch TRPC4.....	6
Abbildung 3: Modulation von kardialen Zellfunktionen durch TRPC3.....	7
Abbildung 4: Regulation von TRPC-Kanälen durch FKBP52 und Homer	12
Abbildung 5: Schematische Darstellung von FKBP52 und FKBP52s mit wichtigen Domänen .....	13
Abbildung 6: Schematische Gegenüberstellung der C-terminalen Bindungsdomänen in TRPC3 und FKBP52 bzw. FKBP52s.....	14
Abbildung 7: Lokalisierung der FKBP52-Bindungsdomänen in TRPC3 ..	15
Abbildung 8: Restriktionsverdau von pENTR 3C .....	40
Abbildung 9: Restriktionsverdau des Klonierungsendproduktes .....	44
Abbildung 10: Beispielbild mit Auswertungsalgorithmus .....	54
Abbildung 11: TRPC3 und TRPC4 interagieren mit WT-FKBP52 und FKBP52s ohne Stimulation in HEK-293-Zellen .....	56
Abbildung 12: TRPC3 und TRPC4 interagieren mit WT-FKBP52 und FKBP52s unter Stimulation in HEK-293-Zellen.....	58
Abbildung 13: FKBP52s stört die Formierung eines Calcineurin-TRPC3- Komplexes in HEK-293-Zellen .....	61
Abbildung 14: FKBP52s stört die Formierung eines Calcineurin-TRPC4- Komplexes in HEK-293-Zellen .....	61
Abbildung 15: Quantitative Analyse der TRPC3 CaN A Co-IPs .....	64
Abbildung 16: Quantitative Analyse der TRPC4 CaN A Co-IPs .....	65
Abbildung 17: FKBP52s und Calcineurin A binden in HEK-293-Zellen nicht aneinander .....	67
Abbildung 18: Einfluss von FKBP52s auf die NFATc1-Translokation in Abwesenheit von TRPC-Kanälen in HEK-293-Zellen .....	69

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 19: Fluoreszenzmikroskopie der Translokation von GFP-NFATc1 in TRPC3-positiven HEK-293-Zellen in Abhängigkeit von FKBP52s .....	71
Abbildung 20: Nukleäre Translokation von GFP-NFATc1 in TRPC3-transfizierten HEK-293-Zellen in Abhängigkeit von FKBP52s und verschiedenen Stimulationsbedingungen (I).....	72
Abbildung 21: Nukleäre Translokation von GFP-NFATc1 in TRPC3-transfizierten HEK-293-Zellen in Abhängigkeit von FKBP52s und verschiedenen Stimulationsbedingungen (II) .....	73
Abbildung 22: Nukleäre Translokation von GFP-NFATc1 in TRPC4-transfizierten HEK-293-Zellen in Abhängigkeit von FKBP52s und verschiedenen Stimulationsbedingungen (I).....	75
Abbildung 23: Nukleäre Translokation von GFP-NFATc1 in TRPC4-transfizierten HEK-293-Zellen in Abhängigkeit von FKBP52s und verschiedenen Stimulationsbedingungen (II) .....	76
Abbildung 24: Hypothese zur Wirkung von FKBP52s auf die Kaskade ...	88

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Ergebnisse der quantitativen Analyse der Co-IPs mit ImageJ... 63  
Tabelle 2: PPIase-Bindungsdomänen in TRPC-Molekülen ..... 85



Anhang

**TRPC3 - short transient receptor potential channel 3 isoform b Homo sapiens Aminosäuresequenz:**

1 megspslrrm tvmrekgrrq avrgpafmf n drgtsltae erfldaaeyg nipvvrkml e  
61 esktlvncv dymgqnalql avgnehle vt e lllk kenla rigdalllai skgyvrivea  
121 ilnhpgfaas krltlspceq elqdddfyay dedgtrfspd itpiilaahc qkyevvhml l  
181 mkgarierph dyfckcgdcm ekqrhdsfish srsrinaykg laspaylsls sedpvtale  
241 lsnelaklan iekefkndyr klsmqckdfv vgvldlcrds eeveailngd lesaeplevh  
301 rhkaslsrvk laikyevkkf vahpncqqql ltiwyenlsg lreqtiaikc lvvlvvalg  
361 pflaigywia pcsrlgkrlr spfmkfvaha asfiiflgll vfnasdrfeg ittlpmitvt  
421 dypkqifrvk ttqftwteml imvwvl gmmw seckelwleg preyilqlwn vldfgmlsif  
481 iaaf tarfla flqatkaqqy vdsyvqesdl sevtlppei q yftyardkw l psdpqiiseg  
541 lyaiavvlsf sriayilpan esfgplqisl grtvkdifkf mvlfimvffa fmigmfilys  
601 yylgakvnaa fttveesfkt lfwsifglse vtsvvlkydh kfienigyvl ygiynvtmvv  
661 vllnmliami nssyqeiedd sdvewkfars klwlsyfddg ktlpppflsv pspksfvyfi  
721 mrvnfpkcr rrrlqkdiem gmgnsksrln lftqsnsrvf eshsfnsiln qptryqqimk  
781 rlikryvlka qvdkendevn egelkeikqd isslryelle dksqateela ilihklsekl  
841 npsmlrce

Quelle: The National Center for Biotechnology:  
[https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP\\_003296.1](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP_003296.1) vom 23.06.2018,  
abgerufen am 17.02.2019 19:56 Uhr.

**FKBP52s mouse kodierende Basenpaare:**

TTTGAGTTCAAAGGAGAAGATCTTACAGAAGAAGAAGATGGCG  
GGATCATCCGCAGAATACGGACTCGGGGTGAAGGCTATGCCAG  
GCCCAATGATGGTGCTATGGTGGAAGTGGCCCTGGAAGGCTACC  
ACAAGGACCGCCTCTTTGACCAGCGGGAGCTCTGCTTTGAAGTC  
GGGAAGGGGAAAGTCTAGATCTGCCCTGTGGGCTGGAGGAGG  
CCATTCAGCGCATGGAGAAAGGAGAGCATTCCATCGTGTACCTC  
AAACCTAGCTATGCTTTTGGCAGTGTGGGGAAGGAGAGGTTCCA  
GATCCCACCGCACGCTGAGCTGAGGTATGAAGTGC GGCTGAAG  
AGCTTTGAGAAGGCCAAGGAGTCTTGGGAGATGAGCTCCGCGG  
AGAAGCTGGAGCAGAGCAACATAGTGAAAGAGAGGGGCACCGC  
GTA CTTCAAGGAAGGCAAGTACAAGCAGGCGTTACTGCAGTAC  
AAGAAGATCGTGTCTTGGCTAGAATACGAGTCTAGCTTCTCCGG  
TGAGGAAATGCAA AAGGTCCATGCACTCCGACTGGCCTCACACC  
TCAATCTGGCCATGTGTCACCTGAAACTGCAGGCCTTCTCAGCT  
GCCATCGAAAGCTGCAACAAGGCCTTGGAGCTGGACAGCAACA  
ACGAGAAGGGCCTGTTTCGCG **CAG**GGAGAGGCCACCTGGCCGT  
GAATGACTTTGACCTGGCAAGAGCTGACTTCCAAAAGGTCCTGC  
AGCTCTATCCCAGCAACA AAGCCGCCAAGACCCAGCTGGCTGTG  
TGCCAGCAGCGGACCCGTAGGCAGCTCGCCCGGGAAAAGAAGC  
TCTATGCCAACATGTTTGAGAGGCTGGCTGAGGAGGAGCACAAG  
GTGAAGGCAGAAGTGGCAGCAGGAGACCATCCC ACTGATGCTG  
AGATGAAGGGTGAGCGGAACAATGTGGCCGAGAACCAGTCTCG  
GGTGGAGACAGAAGCGTAG

Sequenziert durch Eurogenes

Rot das Basentriplett, in dem sich die Punktmutation (unterstrichen) in unserem FKBP52s Konstrukt im Vergleich zum WT-FKBP52 befindet.

**WT-FKBP52 mouse kodierende Basenpaare:**

ATGACCGCCGAGGAGATGAAGGCGGCGGAGAACGGGGCGCAGT  
CGGCGCCCCTGCCTCTCGAAGGAGTGGACATCAGCCCCAAACAG  
GACGAGGGCGTGCTCAAGGTCATCAAGAGAGAGGGTACAGGCA  
CAGAGACACCCATGATCGGGGACCGAGTCTTTGTCCACTACT

## Anhang

GGCTGGCTGCTAGATGGCACAAAGTTTGACTCCAGTCTGGACCG  
CAAGGACAAATTCTCCTTTGACCTGGGAAAAGGGGAGGTCATCA  
AGGCTTGGGATATTGCTGTGGCAACCATGAAAGTGGGGGAAGT  
GTGCCACATCACCTGCAAGCCAGAATATGCCTATGGCGCAGCAG  
GCAGCCCTCCGAAGATCCCCCCCCAACGCCACACTTGTATTTGAG  
GTGGAGCTGTTTGAGTTCAAAGGAGAAGATCTTACAGAAGAAG  
AAGATGGCGGGATCATCCGCAGAATACGGACTCGGGGTGAAGG  
CTATGCCAGGCCCAATGATGGTGCTATGGTGGAAAGTGGCCCTGG  
AAGGCTACCACAAGGACCGCCTCTTTGACCAGCGGGAGCTCTGC  
TTTGAAGTCGGGGAAAGGGGAAAGTCTAGATCTGCCCTGTGGGCT  
GGAGGAGGCCATTACAGCGCATGGAGAAAGGAGAGCATTCCATC  
GTGTACCTCAAACCTAGCTATGCTTTTGGCAGTGTGGGGAAGGA  
GAGGTTCCAGATCCCACCGCACGCTGAGCTGAGGTATGAAGTGC  
GGCTGAAGAGCTTTGAGAAGGCCAAGGAGTCTTGGGAGATGAG  
CTCCGCGGAGAAGCTGGAGCAGAGCAACATAGTGAAAGAGAGG  
GGCACCGCGTACTTCAAGGAAGGCAAGTACAAGCAGGCGTTAC  
TGCAGTACAAGAAGATCGTGTCTTGGCTAGAATACGAGTCTAGC  
TTCTCCGGTGAGGAAATGCAAAAGGTCCATGCACTCCGACTGGC  
CTCACACCTCAATCTGGCCATGTGTCACCTGAAACTGCAGGCCT  
TCTCAGCTGCCATCGAAAGCTGCAACAAGGCCTTGGAGCTGGAC  
AGCAACAACGAGAAGGGCCTGTTTCGCCGGGGAGAGGCCCACT  
GGCCGTGAATGACTTTGACCTGGCAAGAGCTGACTTCCAAAAGG  
TCCTGCAGCTCTATCCCAGCAACAAAGCCGCCAAGACCCAGCTG  
GCTGTGTGCCAGCAGCGGACCCGTAGGCAGCTCGCCCGGGAAA  
AGAAGCTCTATGCCAACATGTTTGAGAGGCTGGCTGAGGAGGA  
GCACAAGGTGAAGGCAGAAGTGGCAGCAGGAGACCATCCCACT  
GATGCTGAGATGAAGGGTGAGCGGAACAATGTGGCCGAGAACC  
AGTCTCGGGTGGAGACAGAAGCGTAG

Quelle: The National Center for Biotechnology:  
[https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM\\_010219.4?report=genbank&from=147&to=1523](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM_010219.4?report=genbank&from=147&to=1523) vom 26.09.2019, abgerufen am 03.10.2019 10:46 Uhr.

Rot das Basentriplett, in dem sich die Punktmutation (unterstrichen) in unserem FKBP52s Konstrukt im Vergleich zum WT-FKBP52 befindet.

**FKBP52 mouse Aminosäuresequenz:**

1 mtaemkaae ngaqsaplpl egvdispkqd egvlkvikre gtgtetpmig drvfvhytgw  
61 lldgtkfdss ldrkdkfsfd lgkgevikaw diavatmkgv evchitckpe yaygaagspp  
121 kippnatlvf evelfefkge dlteeedggi irrirtregg yarpndgamv evalegyhkd  
181 rldqrelcf evgegesldl pcgleeaiqr mekgehsivy lkpsyafgsv gkerfqipph  
241 aelryevrkl sfekakeswe mssaekleqs nivkergtay fkegkykqal lqykkivswl  
301 eyessfsgee mqkvhalrla shlnlamchl klqafsaai scnkalelds nnekgf~~r~~g  
361 eahlavndfd laradfqkvl qlypsnkaak tqlavcqqrt rrqlarekkl yanmferlae  
421 eehkvkaeva agdhptdaem kgernnvaen qsrvetea

Quelle: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP\\_034349.1](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP_034349.1), vom  
11.10.2018, abgerufen am 24.02.2019 11:59 Uhr.

Rot markiert das Arginin, welches in FKBP52s durch Punktmutation zu  
einem Glutamin mutiert ist.

**FKBP52s mouse Aminosäuresequenz:**

135 fefkge dlteeedggi irrirtregg yarpndgamv evalegyhkd  
181 rldqrelcf evgegesldl pcgleeaiqr mekgehsivy lkpsyafgsv gkerfqipph  
241 aelryevrkl sfekakeswe mssaekleqs nivkergtay fkegkykqal lqykkivswl  
301 eyessfsgee mqkvhalrla shlnlamchl klqafsaai scnkalelds nnekgf~~r~~g  
361 eahlavndfd laradfqkvl qlypsnkaak tqlavcqqrt rrqlarekkl yanmferlae  
421 eehkvkaeva agdhptdaem kgernnvaen qsrvetea

Rot markiert das Glutamin, welches anstelle des Arginins dort vorkommt.

**FKBP52 Homo sapiens Aminosäuresequenz:**

1 mtaeemkate sgaqsaplpm egvdispkqd egvlkvikre gtgtempmig drvfvyhtgw  
61 lldgtkfdss ldrkdkfsfd lgkgevikaw diaiatmkvg evchitckpe yaygsagspp  
121 kippnatlvf evelfefkge dlteeedggi irriqtrgeg yakpnegaiv evalegyykd  
181 klfdqrelrf eigegenldl pygleraiqr mekgehsivy lkpsyafgsv gkekfqippn  
241 aelkyelhk sfekakeswe mnseekleqs tivkergtvy fkegkykqal lqykkivswl  
301 eyessfsnee aqkaqalrla shlnlamchl klqafsaai scnkalelds nnekgfrrg  
361 eahlavndfe laradfqqvl qlypnkaak tqlavcqqri rrlarekkl yanmferlae  
421 eenkakaesas sgdhptdtem keeqksntag sqsqvetea

Quelle: The National Center for Biotechnology:  
[https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP\\_002005.1](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP_002005.1) vom 22.11.2018,  
abgerufen am 17.02.2019 um 20:00 Uhr

Danksagung

Danksagung

Lebenslauf

# Lebenslauf



## Eidesstattliche Erklärung

### Eidesstattliche Erklärung

#### Affidavit

I hereby confirm that my thesis entitled Interaction of TRPC ion channels with the Immunophilin FKBP52 is the result of my own work. I did not receive any help or support from commercial consultants. All sources and / or materials applied are listed and specified in the thesis.

Furthermore, I confirm that this thesis has not yet been submitted as part of another examination process neither in identical nor in similar form.

Place, Date

Signature

### Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation Interaktion von TRPC-Ionenkanälen mit dem Immunophilin FKBP52 eigenständig, d.h. insbesondere selbständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Ort, Datum

Unterschrift