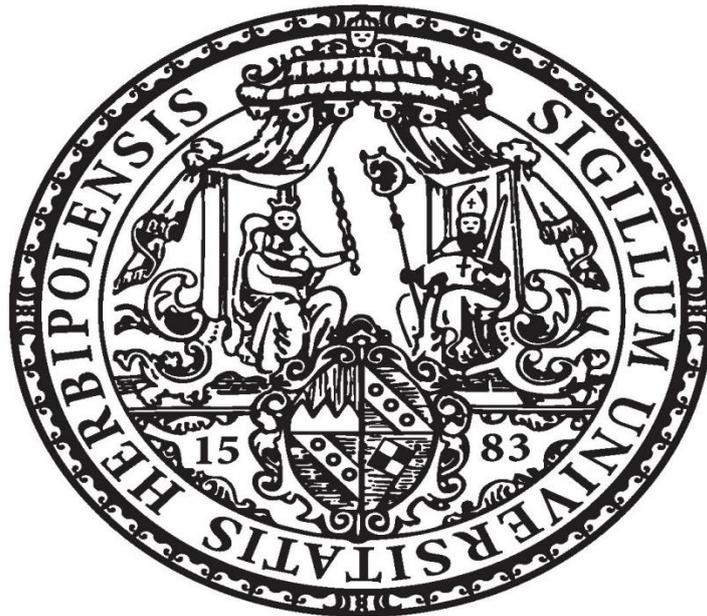


Die Rolle von Calcineurin im Nukleus von Kardiomyozyten und ein innovativer Inhibitor als neuer therapeutischer Ansatz bei kardialer Hypertrophie



Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Silvana Olivares-Baerwald

geboren am 2. März 1985 in Barranquilla, Kolumbien

München, 2019

eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender:

Gutachter: Prof. Dr. Oliver Ritter

Gutachter: Prof. Dr. Dandekar

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Meiner Familie gewidmet

Danksagung

Als erstes möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herr Prof. Dr. Oliver Ritter bedanken, für die Bereitstellung der interessanten Promotionsthematik, die fachliche Betreuung, die Finanzierung, die Motivation und stets konstruktive Kritik. Weiterhin bedanke ich mich sehr bei Herr Prof. Thomas Dandekar für die Übernahme der Zweitbegutachtung.

Bei Herrn Dr. Martin Czolbe bedanke ich mich herzlich für die Betreuung während meiner Zeit im Labor und bei seiner Hilfestellung bei der Verfassung dieser Arbeit. Ein besonderer Dank auch an Frau Dr. Melanie Mühlfelder für die Hilfestellung während meiner Zeit im Labor.

Besonders danken möchte ich dem gesamten Laborteam für die angenehme Arbeitsatmosphäre und vielen schönen Stunden in und nach der Arbeit bedanken. Mein besonderer Dank gebührt Ines Elsner, Annette Berbner und Daniel Oppelt für ihre technische Unterstützung und fortwährenden Mitarbeit bei der Durchführung der verschiedenen Messreihen.

Auch möchte ich mich besonders bei Frau Dr. Paula Arias für ihre Unterstützung und Motivation während der ganzen Zeit bedanken. Und dafür, dass sie immer ein offenes Ohr hatte.

Mein ganz besonderer und aufrichtiger Dank geht an meinen Mann Philipp, der mir stets den Rücken freihält und mit seiner unerschütterlichen Liebe an meiner Seite steht. Auch möchte ich mich herzlich bei ihm für das gewissenhafte Korrekturlesen dieser Arbeit bedanken.

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	9
2	Summary	11
3	Einleitung.....	12
3.1	Kardiale Hypertrophie	12
3.2	Physiologische Hypertrophie.....	13
3.2.1	Pathologische Hypertrophie	13
3.2.2	Behandlung der pathologischen Hypertrophie	13
3.2.3	Phosphoprotein-Phosphatasen.....	15
3.2.4	Die Serin/Threonin-Phosphatasen der PPP-Familie	15
3.2.5	Struktur von Calcineurin.....	16
3.2.6	Calcineurin-Inhibitoren	17
3.2.7	Subzelluläre Lokalisierung von Calcineurin.....	19
3.2.8	Der Ca ²⁺ /Calmodulin-abhängige Calcineurin-Signalweg	20
3.2.9	Der Calmodulin-unabhängige Calcineurin-Signalweg	20
3.2.10	Substrate von Calcineurin: NFAT	21
3.2.11	Nukleärer Transport von Calcineurin.....	22
3.2.12	Calcineurin im Nukleus	24
3.2.13	Calcium Mikrodomänen	25
4	Zielstellung	26
5	Material und Methoden	27
5.1	Geräte	27
5.2	Verbrauchsmaterialien.....	28
5.2.1	Verbrauchsmaterialien.....	28
5.2.2	Chemikalien.....	28
5.2.3	Enzyme	28
5.3	Kits	28

5.4	Lösungen und Puffer.....	28
5.4.1	DNA-Elektrophorese.....	28
5.4.2	Western Blot.....	29
5.4.3	Kardiomyozyten-Isolierung und Zellkultur.....	31
5.4.4	Isolierung adulter muriner Kardiomyozyten.....	32
5.4.5	Immunhistochemie.....	33
5.4.6	Bakterienkultur.....	33
5.5	Antibiotika.....	33
5.6	Peptide.....	33
5.7	Antikörper.....	34
5.8	RNA-Sonden für Realtime-PCR.....	34
5.9	Bakterienstämme.....	34
5.10	Zelllinien.....	34
5.11	Tiermodelle.....	34
5.12	Zellkultur.....	35
5.12.1	Isolierung von neonatalen Ratten-Kardiomyocyten (NRCMs).....	35
5.12.2	Isolation von adulten murinen Kardiomyozyten.....	35
5.13	Generierung von Expressionskonstrukten.....	36
5.14	Transduktion von NRCM.....	36
5.15	Western Blot.....	36
5.16	Quantitative Real Time-PCR.....	37
5.17	Luciferase-Assay.....	37
5.18	Herstellung von IBP-Lösungen.....	37
5.19	Messung von Ca ²⁺ -Transienten unter dem Konfokalmikroskop.....	37
5.20	Immunhistochemische Methoden.....	38
5.20.1	Immunhistochemie mit gefrorenen murinen Herzen.....	38
5.20.2	Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	38
5.20.3	Cardiomyocyte Cross Sectional Area-Färbung (CCSA).....	38

5.21	Hypertrophie-Induktion bei Mäusen durch Ang II.....	38
5.22	IBP-Bestimmung im Urin.....	39
5.23	Statistische Auswertung.....	39
6	Ergebnisse.....	40
6.1	Die Funktion von Calcineurin im Zellkern.....	40
6.2	Angiotensin II erhöht die Ca ²⁺ - Konzentration im Zellkern	44
6.3	Nukleäre IP ₃ R2- Expression <i>in vivo</i>	49
6.4	Peptidoptimierung.....	50
6.4.1	Lösung von IBP in verschiedenen Lösungsmitteln (<i>In vitro</i>).....	50
6.4.2	Modifikationen des Peptids	53
6.4.3	Einfluss von IBP auf die NFAT-Aktivität.....	55
6.5	Verteilung von IBP im Körper und Ausscheidung	56
6.6	Dosis-Optimierung für IBP 4 <i>in vivo</i>	57
7	Diskussion	64
7.1	Funktion von Calcineurin im Kern	64
7.2	Angiotensin II erhöht die Ca ²⁺ - Konzentration im Nukleus.....	65
7.3	Nukleäre IP ₃ R2- Expression <i>in vivo</i>	66
7.4	IBP.....	67
7.5	Ausblick.....	71
8	Abkürzungsverzeichnis	72
9	Referenzen.....	74
	Eidesstattliche Erklärung	82

Abbildungen

Abb. 1	Überblick über die verschiedenen Formen kardialer Hypertrophie.	12
Abb. 2	Behandlung einer kardialen Hypertrophie.	14
Abb. 3	Schematische Darstellung von Calcineurin und seinen Domänen modifiziert nach (Parra and Rothermel 2017).	17
Abb. 4	Der Calcineurin Signalweg.	21
Abb. 5	Der Nukleus als eine Mikrodomäne für Calcineurin.	23
Abb. 6	Inhibition des Calcineurin-Signalwegs in Kardiomyozyten durch IBP.	24
Abb. 7	Schematische Darstellung von Calcineurin-Vektoren mit schrittweiser C-terminaler Verkürzung, Deletion der Phosphatase-Domäne oder der CnB-Bindungsdomäne.	41
Abb. 8	Funktion der Phosphatase-Aktivität nukleären Calcineurins.	42
Abb. 9	Untersuchungen zur Bedeutung von nukleärem Calcium für Calcineurin.	43
Abb. 10	Untersuchungen zur Funktion von Calcineurin im Zellkern.	44
Abb. 11	Einfluss von Ang II auf die Ca ²⁺ -Konzentration im Kern adulter muriner Kardiomyozyten.	45
Abb. 12	Simultane konfokale Aufnahmen von zytoplasmatischen (cyto) und nukleären (nuc) Transienten in isolierten, ruhenden adulten Kardiomyozyten.	46
Abb. 13	Wirkung von Angiotensin II auf nukleäres Ca ²⁺ und cytoplasmatisches Ca ²⁺	47
Abb. 14	Einfluss nukleären Ca ²⁺ auf den Calcineurin/NFAT-Signalweg im Vergleich zur CaMKII.	48
Abb. 15	Untersuchung der nukleären IP ₃ R2 Expression <i>in vivo</i>	49
Abb. 16	Untersuchung der nukleären IP ₃ R2 Expression <i>in vivo</i>	50
Abb. 17	Verteilung von IBP in verschiedenen Lösungsmitteln.	52
Abb. 18	Einfluss verschiedener IBP-Varianten auf den Kern-Import von Calcineurin.	55
Abb. 19	Der Einfluss von IBP auf die NFAT-Aktivität in neonatalen Ratten-Kardiomyozyten.	56
Abb. 20	Ausscheidung von IBP im Urin von FVB-Mäusen nach Einmal-Gabe.	57
Abb. 21	Der Einfluss der IBP-Dosis auf das Herzgewicht und den Kardiomyozytendurchmesser Angiotensin II-stimulierter Mäuse.	58
Abb. 22	Der Einfluss der IBP-Dosis auf das Herzgewicht und den Kardiomyozytendurchmesser Angiotensin II-stimulierter Mäuse.	59
Abb. 23	IBP 4 verhinderte <i>in vivo</i> die Translokation von Calcineurin in den Zellkern.	60
Abb. 24	IBP 4 verringerte die Expression der Hypertrophiemarker ANP und BNP auf transkriptioneller Ebene.	62
Abb. 25	Einfluss von IBP 4 auf die Expression der Hypertrophiemarker ANP und BNP auf Proteinebene.	63

1 Zusammenfassung

Die Calcineurin/NFAT-Signalkaskade spielt eine wichtige Rolle bei der Entwicklung einer kardialen Hypertrophie. Im Zytoplasma von Kardiomyozyten wird die Phosphatase Calcineurin nach Stimulierung der Zellen, z. B. durch Dehnungsreize, Angiotensin II (Ang II) oder Endothelin I (ET-1), und einen daraus folgenden intrazellulären Ca^{2+} -Strom aktiviert. Dies führt zur Dephosphorylierung von NFAT und zu dessen nukleärer Translokation. In früheren Arbeiten von Ritter *et al.* wurden sowohl eine nukleäre Lokalisationssequenz (NLS) als auch eine nukleäre Exportsequenz (NES) innerhalb von Calcineurin identifiziert, die den Transport von Calcineurin zwischen dem Zytoplasma und dem Nukleus ermöglichen. Basierend auf diesen Ergebnissen wurde das Import Blocking Peptid (IBP) entwickelt. Dieses Peptid entspricht der NLS von Calcineurin und blockiert die Calcineurin-Bindungsstellen des Shuttleproteins (Karyopherins) Importin $\beta 1$. So wird die Translokation von Calcineurin in den Nukleus unterbunden und die Signalkaskade zur Aktivierung von Hypertrophie-Genen in Kardiomyozyten unterbrochen. Dabei blieb die Phosphatase-Aktivität von Calcineurin unbeeinflusst. Eines der Ziele dieser Arbeit war, IBP weiter zu optimieren und den „proof of principle“ auch *in vivo* zu führen. Hierfür wurden u. a. ein geeignetes Lösungsmittel bestimmt (biokompatibel und an die Peptidcharakteristika angepasst), die Peptidstruktur modifiziert (Erhöhung der Spezifität/Wirksamkeit) und die erforderliche Dosis weiter eingegrenzt (Belastungs- und Kostenreduktion). Unter Verwendung einer TAMRA-markierten Wirkstoffvariante konnten der Weg des Peptids in Mäusen nachverfolgt und die Ausscheidung quantifiziert werden.

Aufbauend auf den Ergebnissen von Burkard *et al.*, die die Entstehung einer konstitutiv-aktiven und nukleären Calcineurin-Isoform nach proteolytischer Spaltung durch Calpain nachwiesen, wurde die Rolle von Calcineurin im Zellkern genauer untersucht. Außerdem sollte die Frage beantwortet werden, wie (über Calcineurin?) die Herzmuskelzelle zwischen Calciumschwankungen im Zuge der Exzitations-Kontraktions-Kopplung (ECC) und vergleichsweise schwachen Calciumsignalen zur Transkriptionsteuerung unterscheidet. Mit Hilfe von nukleären Calcineurin-Mutanten, die einen Defekt in der Ca^{2+} -Bindung aufwiesen, konnte die Bedeutung von Calcineurin als Calciumsensor für die NFAT-abhängige Transkription nachgewiesen werden. Im Mausmodell waren unter Hypertrophie-Bedingungen die Ca^{2+} -Transienten in der nukleären Mikrodomäne signifikant stärker als im Zytosol, wodurch die Hypothese, dass die Aktivierung der Calcineurin/NFAT-Signalkaskade unabhängig von zytosolischem Ca^{2+} erfolgt, gestützt wird. Messungen von nukleären und zytosolischen Ca^{2+} -Transienten in IP_3 -Sponge-Mäusen zeigten im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen keine Erhöhung des Ca^{2+} -Spiegels während der Diastole, was auf eine Rolle von Inositoltrisphosphat (IP_3) in der Signalkaskade deutet. Außerdem zeigten isolierte Zellkerne ventrikulärer adulter Kardiomyozyten eine erhöhte Expression des IP_3 -Rezeptors 2

(IP₃R2) nach Ang II-Stimulierung. Diese gesteigerte Expression war abhängig von der Calcineurin/NFAT-Kaskade und bestand sogar

3 Wochen nach Entfernung des Ang II-Stimulus fort. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass nukleäres Calcineurin als ein Ca²⁺-Sensor agiert, dass die lokale Ca²⁺-Freisetzung im Kern über IP₃-Rezeptoren detektiert wird und dass dies im Zusammenspiel mit NFAT die Transkription von Hypertrophiegenen initiiert.

2 Summary

The Calcineurin/NFAT signaling pathway plays an important role in the development of cardiac hypertrophy. Calcineurin is activated in the cytoplasm of cardiac myocytes by the interaction of different factors, e.g. Ang II or ET-1, with structures of the cell surface, this leads to the desphosphorylation of NFAT and its translocation into the nucleus. Previous works by the working group led to the detection of a nuclear localization sequence (NLS) and a nuclear export signal (NES) within the Calcineurin domains. They are required for the transport of Calcineurin through the nuclear membrane. Supported by these findings the import blocking peptide (IBP) was conceived. IBP mimics the NLS of Calcineurin and binds to the shuttle protein Importin β 1, thereby blocking the binding sites for Calcineurin and inhibiting the transport of Calcineurin to the nucleus. One characteristic of the peptide is that it does not affect the phosphatase activity of Calcineurin. The aim of this project was to improve the peptide and to investigate its efficacy *in vivo*. We identified the optimal solvent and were able to significantly improve the solubility of IBP. We developed new isoforms of IBP with higher specificity. We were able to identify the minimal effective dose and studied the degradation and excretion of the substance *in vivo*.

As shown by Burkard *et al.*, Calcineurin is proteolytically cleaved by calpain, which leads to a constitutively active Calcineurin form. We investigated the role of this isoform in the nucleus. Furthermore, we investigated how Calcineurin is able to differentiate between Ca^{2+} fluctuations in the course of excitation contraction coupling (ECC) and Ca^{2+} signals for a hypertrophic response. Nuclear Calcineurin mutants defective for Ca^{2+} binding failed to activate NFAT-dependent transcription. Under hypertrophic conditions Ca^{2+} transients in the nuclear microdomain were significantly higher than in the cytosol providing a basis for sustained Calcineurin/NFAT mediated signaling uncoupled from cytosolic Ca^{2+} . Measurements of nuclear and cytosolic Ca^{2+} transients in IP_3 sponge mice showed no increase of Ca^{2+} levels during diastole as we detected in wildtype mice. Nuclei, isolated from ventricular myocytes of mice after chronic Ang II treatment, showed an elevation of $\text{IP}_3\text{R}2$ expression which was dependent from calcineurin/NFAT signaling and persisted for 3 weeks after removal of the Ang II stimulus. Thus, we demonstrate that nuclear calcineurin was able to act as a nuclear Ca^{2+} sensor detecting local Ca^{2+} release from the nuclear envelope via IP_3R .

3 Einleitung

3.1 Kardiale Hypertrophie

Unter kardialer Hypertrophie versteht man die Vergrößerung des Herz-Volumens ohne Änderung der Kardiomyozyten-Zahl (Karsner, Saphir et al. 1925). Sie stellt eine zelluläre Antwort des Herzens auf unterschiedlichen Stress wie eine gesteigerte mechanische Belastung, Bluthochdruck, einen Herzinfarkt, endokrine Funktionsstörungen oder Mutationen innerhalb kardialer kontraktiler Proteine dar. Während die kardiale Hypertrophie anfangs einen kompensatorischen Charakter hat (Ausgleich von Funktionsverlust bzw. Reaktion auf gesteigerten Leistungsbedarf), kann eine länger bestehende Hypertrophie zu Herzinsuffizienz und plötzlichem Herztod führen (Molkentin, Lu et al. 1998). Kardiale Hypertrophie zeichnet sich durch eine Vergrößerung der Kardiomyozyten, die Bildung zusätzlicher Sarkomere und die gesteigerte Expression fetaler kardialer Gene wie atriales natriuretisches Peptid (ANP), natriuretisches Peptid Typ B (BNP), Haupthistokompatibilitätskomplex β Untereinheit (β -MHC) und skelettales α -Aktin aus (Frey and Olson 2003). Das resultierende Remodeling kann entweder konzentrisch oder exzentrisch erfolgen (s. Abb. 1). Die konzentrische Form zeichnet sich durch eine Verdickung der Wand bei fast gleichbleibendem Kammervolumen aus, während die exzentrische Form durch eine Zunahme des Kammervolumens bei nahezu konstanter Wandstärke charakterisiert ist (Mihl, Dassen et al. 2008). Diese unterschiedliche Ausprägung kann sowohl bei einer physiologischen als auch bei einer pathologischen Hypertrophie auftreten.

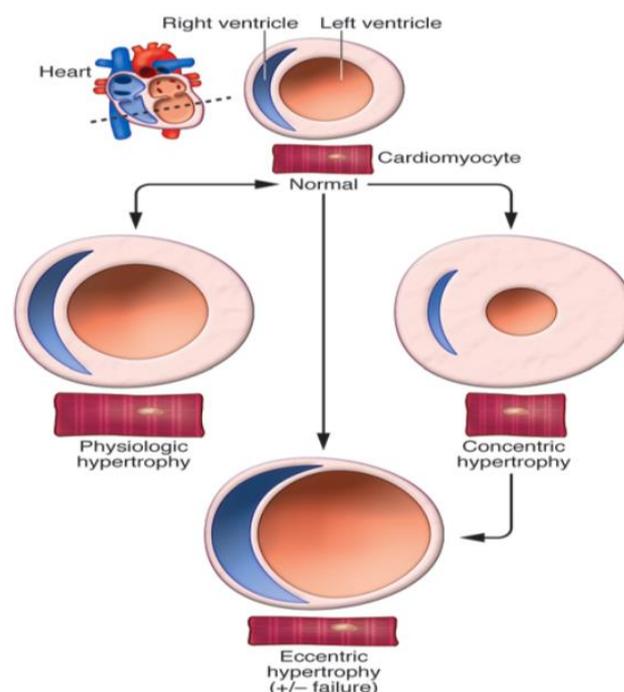


Abb. 1 Überblick über die verschiedenen Formen kardialer Hypertrophie. Nach van Berlo et al. 2013 (van Berlo, Mailliet et al. 2013).

3.2 Physiologische Hypertrophie

Im Gegensatz zu pathologischen Stimuli führen das intensive Treiben von Sport oder eine Schwangerschaft zu einer physiologischen Hypertrophie. Diese hat keine krankhaften Umbauvorgänge im Herzen zur Folge. Bei einem sogenannten „athletischen Herz“ kommt es zu einer Vergrößerung der Kammern und einem proportionalen Dickenwachstum der Wände (Fagard 1992). Auf zellulärer Basis zeigt sich eine Zunahme der Myozyten-Länge und -Breite bei normaler oder verbesserter Kontraktilität.

Interessanterweise wurde schon beschrieben, dass nicht die Dauer des Stimulus über die Entwicklung einer physiologischen oder einer pathologischen Hypertrophie bestimmt, sondern die Art von Stimulus (Perrino, Naga Prasad et al. 2006). Bei der physiologischen Hypertrophie hat dieser die Aktivierung spezifischer Signalwege zur Folge, wie beispielsweise IGF1/PI3K/AKT/PKB-abhängige Kaskaden sowie den ERK1/2- oder CEBP β -Signalweg (Tanaka, Ryoke et al. 1998). Diese Signalkaskaden wirken dem Zelltod entgegen oder stimulieren die Erneuerung der Kardiomyozyten. Physiologisches hypertrophisches Wachstum weist also eine kardioprotektive Funktion auf, ist im Gegensatz zur pathologischen Hypertrophie reversibel und führt nicht zur Dekompensation des Herzens.

3.2.1 Pathologische Hypertrophie

Eine pathologische Hypertrophie des Myokards erhält temporär die Pumpfunktion und vermindert den Stress in der ventrikulären Wand. Das hypertrophe Wachstum des Myokards wird als Antwort auf intrinsische und extrinsische Faktoren initiiert. Extrinsische Faktoren stellen Hypertension, Infarkt des Myokardiums oder Ischämie assoziiert mit Koronarerkrankungen, Herzklappenerkrankungen, Aortenstenose, Myokarditis, angeborene Fehlbildungen, familiäre Hypertrophie und dilatative Kardiomyopathien dar. Die intrazellulären oder intrinsischen Faktoren, die zu einer kardialen Hypertrophie führen sind vielfältig. Bis heute wurden viele intrazelluläre Signalwege beschrieben, welche mit der kardialen Hypertrophie in Zusammenhang stehen. Der MAP-Kinasen (MAP-K)-Signalweg, der Proteinkinase C (PKC)- Signalweg, der PI3K/Akt-Signalweg und der **Calcineurin/Nuclear Factor of Activated T-cells (NFAT)-Signalweg** sind hierbei die wichtigsten intrazellulären Signalwege (Klee, Crouch et al. 1979, McKinsey and Olson 1999).

3.2.2 Behandlung der pathologischen Hypertrophie

Die medikamentöse Behandlung einer pathologischen Hypertrophie richtet sich nach der zugrundeliegenden Erkrankung. So kann eine Behandlung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) die pathologische Entwicklung umkehren oder einen positiven Umbau des Ventrikels zurück zum normalen Zustand induzieren. Eine weitere wichtige Wirkstoffgruppe sind die Beta-Adrenorezeptor-Antagonisten (β -Blocker). β -Blocker sind ebenfalls in der Lage, der

kardiale Umbau positiv zu beeinflussen und die Lebensdauer von Patienten mit einer Herzinsuffizienz zu verlängern. Ca²⁺-Kanal-Blocker werden häufig zur Behandlung von Patienten mit Bluthochdruck verwendet. In Tiermodellen wurden jedoch auch antihypertrophische Effekte – unabhängig von einer Blutdruck-Senkung – nachgewiesen (s. Abb. 2). Da die verfügbaren Medikamente nicht bei allen Patienten ausreichend wirksam sind und die Erkrankung trotz medikamentöser Behandlung voranschreitet, wird intensiv nach alternativen Therapeutika gesucht.

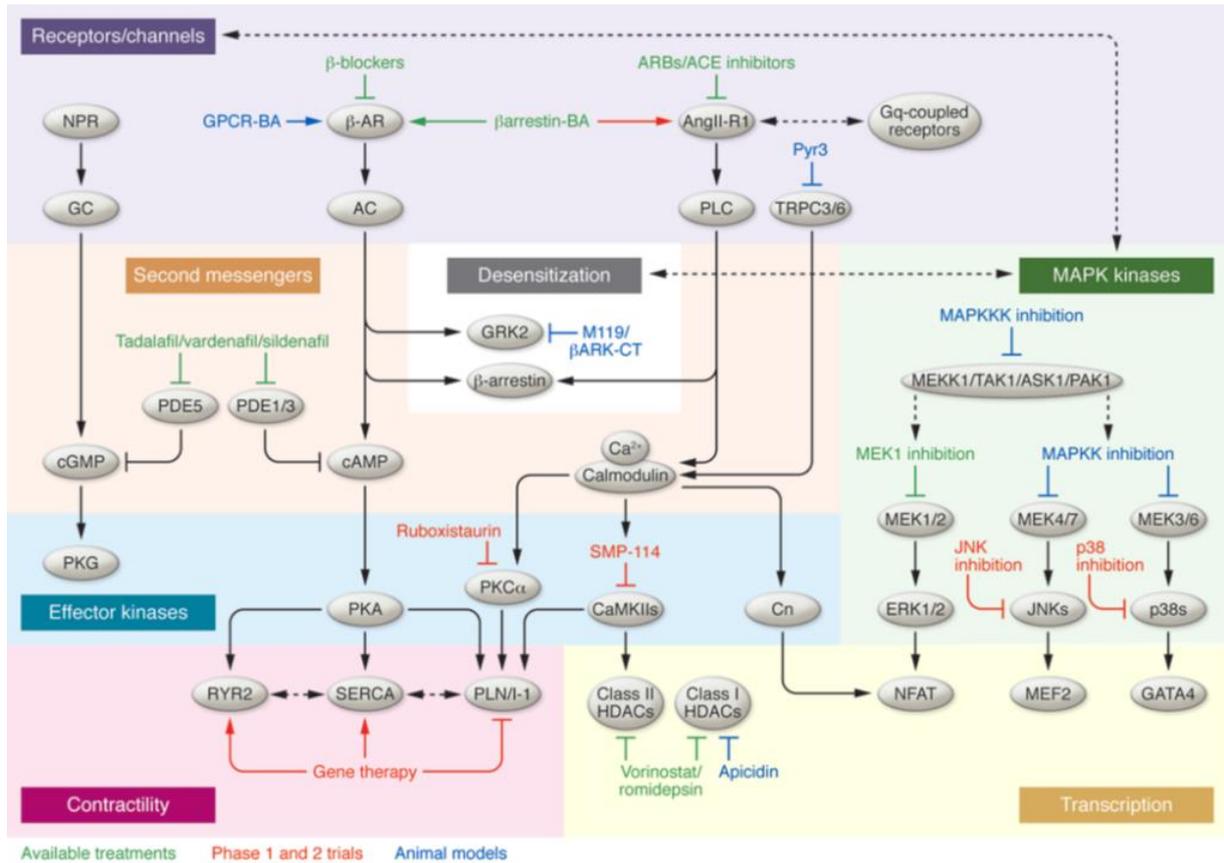


Abb. 2 Behandlung einer kardialen Hypertrophie.
 Nach van Berlo *et al.* 2013 (van Berlo, Maillet *et al.* 2013).

Vor 40 Jahren wurde erstmals die Serin/Threonin-Phosphatase Calcineurin oder PP2B als ein Calmodulin-bindendes Protein im bovinen Herzen beschrieben (Klee, Crouch *et al.* 1979, Stewart, Ingebritsen *et al.* 1982, Steinberg 2000). Drei Jahre später entdeckten Stewart *et al.* die Ca²⁺- und Calmodulin-abhängige Phosphatase-Funktion von Calcineurin (Steinberg 2000). Calcineurin wurde als wichtiger Bestandteil des intrazellulären Signaltransduktionswegs in B- und T-Lymphozyten beschrieben, der zu einer Erhöhung des intrazellulären Ca²⁺-Spiegels und zur Aktivierung der Immunantwort führt (Stewart, Ingebritsen *et al.* 1982, Flanagan, Corthesy *et al.* 1991, Clipstone and Crabtree 1992, Loh, Carew *et al.* 1996, Rao, Luo *et al.* 1997). Calcineurin beeinflusst die Expression von Genen für die Immunantwort durch die Dephosphorylierung von Transkriptionsfaktoren der NFAT-Familie (Rao, Luo *et al.* 1997). Nach Dephosphorylierung durch

Calcineurin transloziert NFAT in den Zellkern und initiiert die Transkription von Genen für die Immunantwort (Flanagan, Corthesy et al. 1991, Loh, Carew et al. 1996, Loh, Shaw et al. 1996).

20 Jahre später entdeckten Jeff Molkentin und Eric Olson die zentrale Rolle des Calcineurin-abhängigen Signalwegs für die Entwicklung einer kardialen Hypertrophie und eine voranschreitende Herzinsuffizienz (Molkentin, Lu et al. 1998).

Weitere Arbeiten zur Aktivierung von Calcineurin im Herzen durch pathologische Stimuli wie Drucküberlastung oder Myokardinfarkt bzw. zu einer gesteigerten Aktivität der Phosphatase in hypertrophierten oder insuffizienten humanen Herzen unterstrichen die Bedeutung dieses Signalwegs in Kardiomyozyten (Lim and Molkentin 1999, Haq, Choukroun et al. 2001, Ritter, Hack et al. 2002, Wilkins and Molkentin 2002).

3.2.3 Phosphoprotein-Phosphatasen

Calcineurin gehört zur Familie der Phosphoprotein-Phosphatasen. Diese Phosphatasen katalysieren die Hydrolyse der Phosphoester-Bindung von Phosphoserinen, Phosphothreoninen oder Phosphotyrosinen. Die Protein-Phosphatasen werden in drei Genfamilien unterteilt, die sich strukturell unterscheiden: die Phosphoprotein-Phosphatase P-Familie (PPP), die Phosphoprotein-Phosphatase M-Familie (PPM) und die Protein-Tyrosin-Phosphatase-Familie (PTP). Die PPP und PPM dephosphorylieren Phosphoserine und Phosphothreonine, während die Familie der PTPs spezifisch für Phosphotyrosine ist. Die katalytischen Domänen sind innerhalb der Familien hochkonserviert; die funktionelle Diversität liegt in regulatorischen Abschnitten und weiteren Untereinheiten begründet. (Barford, Das et al. 1998). Darüber hinaus bestimmen die regulatorischen Domänen auch die Lokalisierung der Proteine innerhalb bestimmter subzellulärer Kompartimente. Die Mitglieder der PPM- und PPP-Familien sind Metalloenzyme und dephosphorylieren jedes Substrat in einem einzigen Reaktionsschritt unter Verwendung eines metallaktiven, nukleophilen Wassermoleküls. Im Gegensatz dazu katalysieren PTP die Dephosphorylierung mit einem Zwischenschritt, wobei ein Cystenylphosphat-Intermediat entsteht, das anschließend weiter hydrolysiert wird (Barford 1996, Barford, Das et al. 1998).

3.2.4 Die Serin/Threonin-Phosphatasen der PPP-Familie

Die Serin/Threonin-Phosphatasen PP1, PP2A und PP2B der PPP-Familie stellen zusammen mit PP2C aus der PPM-Familie die Mehrheit der Serin/Threonin-Phosphatasen *in vivo*. Während PP1, PP2A und PP2B eine gemeinsame katalytische Domäne aus 280 Aminosäure-Resten besitzen, unterscheiden sich die Enzyme in den nichtkatalytischen N- und C-terminalen Abschnitten und bilden aufgrund der regulatorischen Untereinheiten verschiedene Holoenzyme (Barford, Das et al. 1998). PP1 kontrolliert zelluläre Prozesse wie den Glykogen-Metabolismus, die Muskelkontraktion, das Fortschreiten des Zellzyklus, neuronale Aktivität und das Spleißen von RNA (Barford, Das et al. 1998). Ähnlich wie PP1 erfüllt PP2A *in vivo* verschiedene Funktionen, die durch die Diversität

der regulatorischen Domänen (mindestens 15 verschiedene B-Untereinheiten) bestimmt werden. PP2A kontrolliert unter anderem Zell-Metabolismus und Zellzyklus. Während der Mitose bildet PP2A einen Komplex mit dem humanen Shugoshin-Protein, welcher die Centromere vor Phosphorylierung schützt und so die vorzeitige Trennung der Tochterchromatiden verhindert (Nasmyth 2005, Kitajima, Sakuno et al. 2006, Tang, Shu et al. 2006, Trinkle-Mulcahy and Lamond 2006). Außerdem wurde eine Rolle der Phosphatase in Zell-Transformation und Krebs gezeigt (Alberts, Thorburn et al. 1993).

PP2B oder Calcineurin zeichnet sich durch eine Ca^{2+} -abhängige Aktivität aus. Calcineurin spielt eine zentrale Rolle im Ca^{2+} -abhängigen Signaltransduktionweg aktivierter T-Zellen. Der Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration, hervorgerufen durch eine Antigen-Erkennung am T-Zell-Rezeptor, stimuliert Calcineurin zur Dephosphorylierung von NFAT1 (Jain, McCaffrey et al. 1993). Dephosphoryliertes NFAT1 transloziert in den Nukleus, um dort zusammen mit Calcineurin (und weiteren Transkriptionsfaktoren) die Expression von IL-2 zu induzieren (Shibasaki, Price et al. 1996). Calcineurin wird hierfür unabhängig von NFAT in den Nukleus transportiert; seine nukleäre Lokalisierung ist essentiell für die Entfaltung der vollen transkriptionellen Aktivität von NFAT (Jain, McCaffrey et al. 1993, Shibasaki, Price et al. 1996, Burkard, Becher et al. 2005, Hallhuber, Burkard et al. 2006).

3.2.5 Struktur von Calcineurin

Calcineurin ist ein evolutionär hochkonserviertes heterodimer und besteht aus einer 60 kDa katalytischen Untereinheit (Calcineurin A, CnA) und einer 19 kDa regulatorischen Untereinheit (Calcineurin B, CnB) (Guerini, Montell et al. 1992). CnA enthält eine N-terminale katalytische Domäne, eine CnB-Bindedomäne, eine Calmodulin-Bindedomäne und eine C-terminale autoinhibitorische Domäne (AID) (s. Abb. 3). CnB besitzt 4 Ca^{2+} -Bindedomänen: 2 strukturelle Seiten binden Ca^{2+} mit hoher Affinität in nanomolaren Bereich (immer besetzt) und 2 regulatorische Seiten. Letztere binden Ca^{2+} in mikromolaren Bereich (Alberts, Thorburn et al. 1993, Burkard, Becher et al. 2005). Die Ca^{2+} -Bindung an den regulatorischen Seiten initiiert mehrere Konformationsänderungen, die die Bindung von Ca^{2+} /Calmodulin-Komplex und eine Änderung der Orientierung der AID bewirkt und seine aktive Seite exponiert. Burkard et al. konnten einen alternativen Aktivierungsweg für Calcineurin nachweisen, in dem die AID durch Calpain hydrolysiert und Calcineurin konstitutiv aktiviert wird (Burkard, Becher et al. 2005). Weitere funktionell wichtige Elemente sind eine Nuclear Localization Sequences (NLS) und eine Nuclear Export Sequences (NES) (Nasmyth 2005).

Säugetiere exprimieren drei Isoformen von CnA (α , β und γ), wovon nur CnA α und - β im Herzen vorkommen (Taigen, De Windt et al. 2000, Bueno, Wilkins et al. 2002). CnB tritt in zwei Isoformen auf (CnB1 und CnB2), jedoch wird nur CnB1 im Herzen exprimiert (Ueki, Muramatsu et al. 1992). Die primäre Struktur von CnA ist hochkonserviert, während die N- und C-terminale Domäne

variabel sind. CnB besitzt ebenfalls eine hochkonservierte Sequenz, die die Struktur („helix-loop-helix“) ähnelt der von Calmodulin.

Basierend auf Sequenzanalysen wurden bei Calcineurin mehrere Aminosäurereste identifiziert, die innerhalb der Serin/Threonin--Phosphatasen konserviert sind. So wurde ein Phosphoesterase-Motiv (**DxH(x)nGDxxDR(x)mGNHD/E**) nachgewiesen, das nicht nur in PP1, PP2A und Calcineurin auftritt, sondern auch in vielen weiteren Enzymen, die Phosphoesterbindungen spalten (bspw. die alkalische Phosphatase oder bakterielle Exonukleasen) konserviert ist (Rusnak and Mertz 2000).

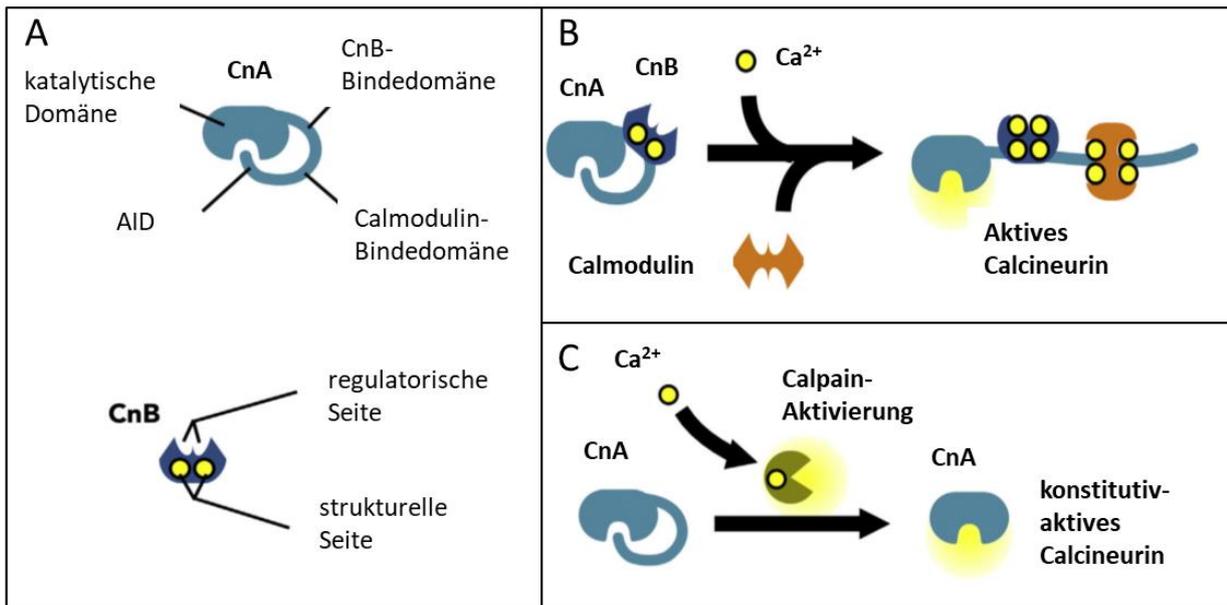


Abb. 3 Schematische Darstellung von Calcineurin und seinen Domänen modifiziert nach (Parra and Rothermel 2017).

3.2.6 Calcineurin-Inhibitoren

Die Immunsuppressiva Ciclosporin A (CsA, Sandimmune®) und FK506 (Tacrolimus, Prograf®) stellen die wichtigsten Inhibitoren von Calcineurin dar. Sie werden bei Organtransplantationen und verschiedenen Immunstörungen eingesetzt. Diese Medikamente rufen den gleichen Effekt in T-Lymphozyten hervor. Allerdings sind sie strukturell verschieden und interagieren mit unterschiedlichen Zielmolekülen.

CsA ist ein lipophiles zyklisches Polypeptid aus 11 Aminosäuren und wird aus dem Schlauchpilz *Tolypocladium inflatum* gewonnen. CsA passiert die Blut-Hirn-Schranke, ist aber nicht plazentagängig. Es wurde in Amnionflüssigkeit und fetalem Blut nachgewiesen. Es hat eine Eliminationshalbwertszeit von 6 Stunden (Faulds, Goa et al. 1993, Bueno, van Rooij et al. 2002).

FK506 ist ein aus dem Bakterium *Streptomyces tsukubaensis* isoliertes Makrolid-Antibiotikum. FK506 kann oral oder intravenös verabreicht werden, seine Eliminationshalbwertszeit beträgt 20 Stunden. Der Wirkmechanismus von FK506 und CsA wurde in Immunzellen umfassend untersucht. CsA und FK506 binden mit hoher Affinität an die ubiquitäre zytosolische Peptidyl-Propyl-Isomerase Cyclophilin (CyP) beziehungsweise an das FK506-Bindungs-Protein-12

(FKBP12). Die entstehenden Komplexe CsA-CyP bzw. FK506-FKBP12 interagieren mit Calcineurin und inhibieren seine Phosphatase-Aktivität sowie seine Interaktion mit mehreren Substraten, bspw. den NFAT-Transkriptionsfaktoren (McCaffrey, Luo et al. 1993).

Studien, in denen die Inhibitoren zum Einsatz kamen, zeigten zum Teil schwere intra- und extrakardialen Nebenwirkungen der Medikamente. So veränderte eine hohe CsA-Dosis die Freisetzung von Ca^{2+} aus dem sarkoplasmatischen Retikulum über den Ryanodin-Rezeptor (RyR). Außerdem hemmt CsA die Na^+/K^+ -ATPase. Dies führt zu Neuro- und Nephrotoxizität, sekundär hat es einen Blutdruckanstieg und damit eine stärkere Belastung des Herzens zur Folge (Klee, Ren et al. 1998).

Aufgrund der genannten Nebenwirkungen wurde und wird nach alternativen Methoden der Calcineurin-Inhibition gesucht. Eine davon ist das „Gen targeting“. Taigen *et al.* inhibierten Calcineurin in neonatalen Ratten-Kardiomyozyten durch die Überexpression der Calcineurin-Inhibitoren „Calcineurin inhibitory protein/Calcineurin binding protein 1“ (Cain/Cabin-1) und „A-kinase anchoring protein 79“ (AKAP79) (Taigen, De Windt et al. 2000). So konnte die Entstehung einer Hypertrophie nach Stimulierung mit Phenylephrin (PE), Angiotensin II (Ang II) und 1% FCS verhindert werden. Cain ist ein 240 kDa-Protein, das nicht-kompetitiv die Phosphatase-Aktivität von Calcineurin inhibiert. Bei AKAP79 handelt es sich um ein Gerüstprotein (scaffold protein), welches die Proteinkinasen A und C (PKA und PKC) sowie Calcineurin bindet. Die Überexpression von Cabin1 oder AKAP79 in transgenen Mäusen hatte unter Basalbedingungen keinen Einfluss auf die Herzfunktion. Nach Bauchaortenverengung (AAC) und Ang II-Zugabe zeigte sich jedoch eine hypertrophe Antwort (Taigen, De Windt et al. 2000, De Windt, Lim et al. 2001, Liu 2003). In Ratten bewirkte die Cain1-Überexpression eine deutliche Reduktion hypertropher Umbauvorgänge nach Quer- Aorta-Verengung (TAC) (De Windt, Lim et al. 2001).

Eine andere Klasse von Calcineurin-Inhibitoren sind die Produkte der „Down syndrom critical region“ (DSCR)-Gene: das myocyte-enriched calcineurin-interacting protein 1 (MCIP1) und MCIP2. Sie stellen wirksame Inhibitoren von Calcineurin im Skelettmuskel dar und sind von der Hefe bis zum Menschen hochkonserviert. Interessanterweise wird MCIP1 auf transkriptioneller Ebene durch Calcineurin und NFAT reguliert – es handelt sich somit um den ersten bekannten Feedback-Regulator von Calcineurin (Yang, Rothermel et al. 2000). Die herzspezifische Überexpression von MCIP1 führte bei transgenen Mäusen zur Entwicklung einer Hypertrophie nach Isoproterenol-Infusion, physischer Belastung oder bei erhöhtem Blutdruck.

Bueno *et al.* zeigten 1992, dass eine konstitutiv $CnA\beta$ -negative, transgene Maus nach Zugabe von Ang II, Isoproterenol (Iso) oder AAC eine stark verminderte Hypertrophieantwort aufwies (Bueno, van Rooij et al. 2002).

Die genannten genetischen Modelle bewirkten eine Inhibition von Calcineurin auf endogener oder exogener Basis, die über eine Verminderung/Blockierung der Phosphatase-Aktivität des Enzyms vermittelt wurde.

2006 beschrieben Hallhuber *et al.*, einen neuen Calcineurin-Inhibitor, das Import Blocking Peptide (IBP), der die Aktivierung von Calcineurin *in vitro* verhinderte, ohne dessen Phosphatase-Aktivität zu beeinflussen (Hallhuber, Burkard *et al.* 2006). Diese Studien werden in der vorliegenden Arbeit durch *in vivo*-Untersuchungen des Peptids in Mäusen ergänzt.

3.2.7 Subzelluläre Lokalisierung von Calcineurin

Calcineurin ist im Gewebe von Säugetieren ubiquitär verbreitet, wobei die höchste Konzentration im Gehirn nachgewiesen wird (Jiang, Xiong *et al.* 1997). Außerdem treten relevante Mengen an Calcineurin A und B unter anderem in Fettgewebe, Osteoclasten, Leber, Niere, Hoden, B- und T-Lymphozyten und im Herzen auf. Dabei gibt es eine spezifische Verteilung der verschiedenen Isoformen jeder Untereinheit (Butcher, Henshall *et al.* 1997). So ist eine Isoform der katalytischen Domäne, welche vom PP3CC-Gen codiert wird (die γ -Isoform von CnA), spezifisch für die Hoden (Muramatsu, Giri *et al.* 1992). Bei Ratten wird CnA α im Gehirn und Herz stärker exprimiert als CnA β (Jiang, Xiong *et al.* 1997). In Milz, Thymus und Lymphozyten ist das Expressionsverhältnis dagegen umgekehrt.

Mittels Radioimmunassays konnte die subzelluläre Verteilung von Calcineurin in Gehirn-Homogenaten des Huhns untersucht werden - Calcineurin war in der cytoplasmatischen microsomalen Region angereichert (Anthony, Winkler *et al.* 1988). Weitere Studien bestätigten die Dominanz von Calcineurin im Cytoplasma und synaptosomalen Zytosol (Kuno, Mukai *et al.* 1992). Politino *et al.* zeigten, dass Calcineurin kleine saure, unilamellare Vesikel in einer Ca²⁺-abhängigen Weise bindet (Politino and King 1990). Im Herzen wurde Calcineurin im Sarcolemma lokalisiert (Buch, Pickard *et al.* 2005, Heineke, Auger-Messier *et al.* 2010) und auch in spezialisierten Membran-Invaginationen, sogenannten T-Tubuli detektiert (Frey, Richardson *et al.* 2000, Heineke, Ruetten *et al.* 2005). Außerdem zeigte sich eine Assoziation von Calcineurin mit dem Cytoskelett (Ferreira, Kincaid *et al.* 1993).

1993 wurde Calcineurin schließlich im Nukleus zusammen mit anderen Calmodulin-bindenden Proteinen wie Casein-Kinase 2 und Myosin-light-chain Kinase nachgewiesen (Bossler, Aligue *et al.* 1993). In Spermatozyten war Calcineurin während der initialen Phase der nukleären Elongation, im Zellkern in großen Mengen lokalisiert, während es sich im Zytoplasma kaum nachweisen ließ (Moriya, Fujinaga *et al.* 1995). Bei der Untersuchung von Signaltransduktionswegen, die NFAT aktivieren, entdeckten Shibasaki *et al.*, dass Ca²⁺ die Assoziation zwischen Calcineurin und NFAT induziert und dazu führt, dass beide Proteine in den Nukleus translozieren (Shibasaki, Price *et al.* 1996). Diese Ergebnisse wurden später von Burkard *et al.* in humanen Herzen mit kardialer Hypertrophie bestätigt (Burkard, Becher *et al.* 2005).

3.2.8 Der Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Calcineurin-Signalweg

Der klassische Weg, über den Calcineurin *in vivo* reguliert wird, beruht auf Änderungen der Ca^{2+} -Konzentration im Cytoplasma und der Detektion dieser Ca^{2+} -Schwankungen durch Calmodulin (CaM) und Calcineurin B (CnB). In ruhenden Zellen mit geringen Ca^{2+} -Konzentrationen (10^{-7} M Ca^{2+}) ist nur die hochaffine Bindungsstelle von CnB durch Ca^{2+} besetzt – CnB ist zwar an CnA gebunden, aber das Enzym bleibt inaktiv (Klee, Draetta et al. 1988). Steigt die zyttoplasmatische Ca^{2+} -Konzentration, werden auch die restlichen drei Bindungsstellen mit Ca^{2+} gesättigt. Dies führt zu einer schwachen Aktivierung des Enzyms. Dagegen kann die basale Aktivität um mehr als das 20-fache gesteigert werden durch die Zugabe einer äquimolaren Menge an CaM. Somit ist die benötigte Ca^{2+} -Konzentration für die Aktivierung von Calcineurin gering, wenn CaM in einer hohen Konzentration vorliegt und umgekehrt sinkt die für die Calcineurin-Aktivierung erforderliche CaM-Konzentration mit steigendem Ca^{2+} -Spiegel (Stemmer and Klee 1994). Die Bindung von CaM an die CaM-Bindungsdomäne von Calcineurin führt zu einer Konformationsänderung und zur Verlagerung der autoinhibitorischen Domäne (AID), wodurch das katalytische Zentrum freigelegt und das Enzym aktiviert wird (Klee, Draetta et al. 1988, Crivici and Ikura 1995).

Durch die Freilegung des aktiven Zentrums werden die dort lokalisierten Metall-Ionen (Fe^{2+} und Zn^{2+}) oxidativen Angriffen ausgesetzt. So oxidiert das Superoxid-Anion Fe^{2+} zu Fe^{3+} , was eine Reduktion der enzymatischen Aktivität zur Folge hat. Diese Oxidation wird durch die Aktivität der Superoxid-Dismutase (SOD) verhindert – auf diese Art und Weise ist die Ca^{2+} -abhängige Protein-Dephosphorylierung mit dem Redox-Status der Zellen verknüpft (Klee, Ren et al. 1998).

CnB spielt eine wichtige Rolle für die strukturelle Stabilität des Enzyms. Die irreversible Inaktivierung und die Dissoziation der zwei Untereinheiten, die mit der kompletten Decalcifizierung von Calcineurin einhergehen, zeigen, dass die Bindung von Ca^{2+} an die hochaffine Bindungsstelle eher strukturelle als regulatorische Bedeutung hat. Die Bindung von Ca^{2+} an die schwachaffinen Bindungsstellen von CnB hat nicht nur eine geringe CaM-unabhängige Aktivierung zur Folge, sondern ist auch für die CaM-Aktivierung verantwortlich (Klee, Ren et al. 1998).

3.2.9 Der Calmodulin-unabhängige Calcineurin-Signalweg

Der Nachweis einer verkürzten, hochaktiven Calcineurin-Form in hypertrophiertem humanem Myokard führte zum Modell eines Calmodulin-unabhängigen Calcineurin-Signalwegs (Burkard, Becher et al. 2005). In diesem aktiviert die proteolytische Spaltung der AID durch die Protease Calpain die enzymatische Aktivität von Calcineurin, wobei Calcineurin in eine konstitutiv aktive, Ca^{2+} /Calmodulin-unabhängige Protein-Phosphatase transformiert wird (Hubbard and Klee 1989, Klee, Ren et al. 1998). Die Schnittstelle innerhalb von CnA ist an der Aminosäure 424 lokalisiert. Das durch die Proteolyse gebildete C-terminale Fragment verbleibt zytosolisch. Die Entfernung der AID legt die Phosphatase-Domäne und die Kernlokalisierungssequenz (NLS-nuclear localisation

signal) frei und führt zur Translokation des konstitutiv aktiven, N-terminalen Fragments von CnA in den Zellkern (Burkard, Becher et al. 2005). Zusätzlich verliert CnA durch die Calpain-vermittelte Spaltung das nukleäre Exportsignal (NES-nuclear export signal). Ohne diese wichtige Export-Sequenz bleibt CnA nukleär lokalisiert und kann selbst nach Abklingen der prohypertrophen Stimuli nicht zurück in das Zytosol transportiert werden (Hallhuber, Burkard et al. 2006). Wird Calpain inhibiert, so kommt es zum Export von Calcineurin aus dem Nukleus und die Calcineurin-Aktivität sinkt (Burkard, Becher et al. 2005). Abbildung 5 zeigt beide Calcineurin-Signalwege.

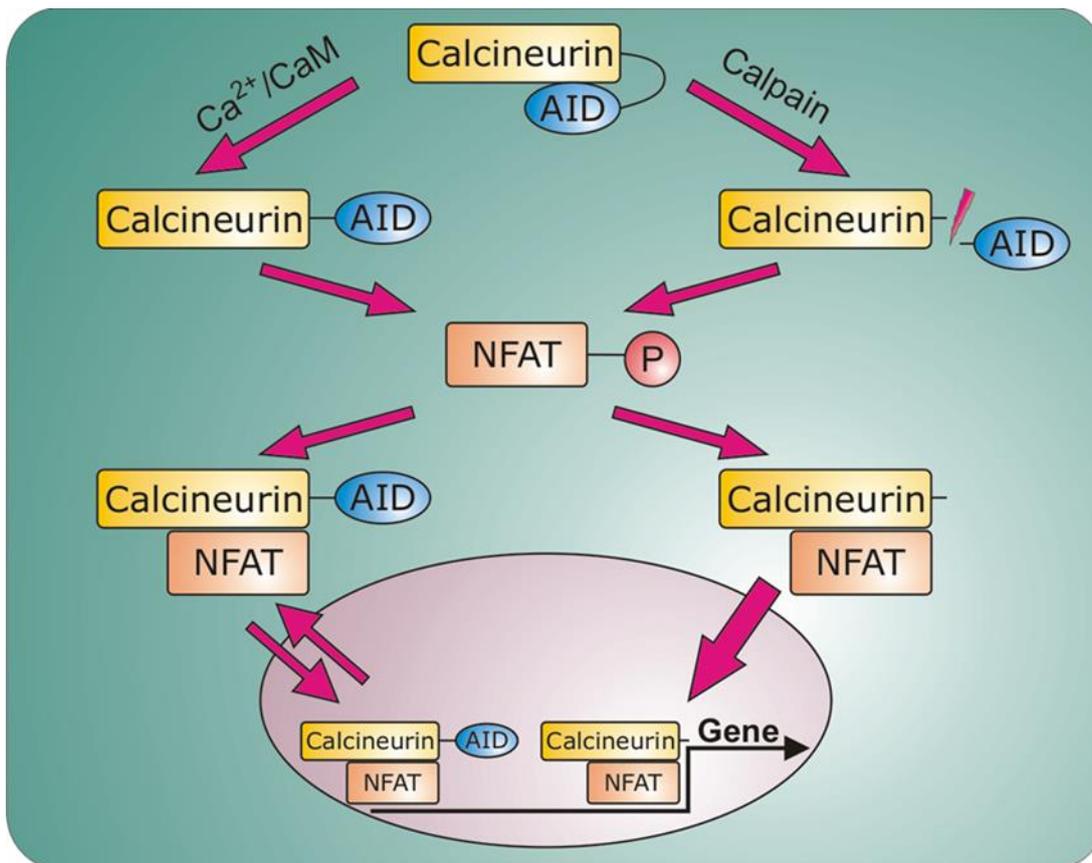


Abb. 4 Der Calcineurin Signalweg.

Der linke Teil der Abbildung zeigt den klassischen Signalweg (Ca²⁺/CaM-abhängig), rechts ist der alternative Signalweg mit Abspaltung der AID durch Calpain dargestellt. Nach (Burkard, Becher et al. 2005, Hallhuber, Burkard et al. 2006).

3.2.10 Substrate von Calcineurin: NFAT

Calcineurin hat sofortige und Langzeit-Effekte auf die Funktion und Anpassung des Myokardiums. Eine schnelle Antwort bewirkt Änderungen in der Funktion, Aktivität und oder Lokalisation seiner Substrate. Diese Änderungen können schnell durch Rephosphorylierung rückgängig gemacht werden. Allerdings haben Calcineurin-abhängige Änderungen auf transkriptionelle Ebene länger anhaltende Effekte. Das meist charakterisierte Calcineurin-Substrat ist der Nuclear Factor of Activated T Cells (NFAT).

Es gibt 4 Isoformen von NFAT: NFATc1 (oder NFAT2) NFATc2 (NFAT1), NFATc3 (NFAT4) und NFATc4 (NFAT3). Die regulatorische Domäne der NFAT-Proteine sind hoch phosphoryliert in ruhende Zellen und flankiert mit einem PxIxIT und LxVP Motif an beiden Enden (Grigoriu, Bond et al. 2013, Mognol, Carneiro et al. 2016). Die Dephosphorylierung durch Calcineurin bewirkt die Translokation von NFAT in den Nukleus und die Aktivierung von Zielgenen. NFATs wirken als Heterodimere und kooperieren mit anderen Transkriptionsfaktoren. Im Herzen sind die wichtigsten Interaktionspartner von NFAT: MEF2 und GATA, die auch direkt von Calcineurin dephosphoryliert werden können. Die Überexpression von dem aktiven NFATc4 im Herzen ist genug, um eine kardiale Hypertrophie hervor zu rufen (Molkentin, Lu et al. 1998). Auf transkriptionelle Ebene ist NFATc2 die meist-exprimierte Isoform im Herzen.

Obwohl die Isoformen NFATc2 und NFATc3 die pathologische Hypertrophie vermitteln, haben beide Isoformen unterschiedliche Affinitäten für Calcineurin. Außerdem wird vermutet, dass die Translokation dieser Isoformen abhängig von der Lage des Ca^{2+} in der Zelle ist (Kar and Parekh 2015).

Calcineurin interagiert zusätzlich zu NFAT mit anderen Transkriptionsfaktoren, die im kardialen Umbau involviert sind. Zum Beispiel die c AMP response element binding protein (CREB)-regulierende transkriptionelle Coaktivatoren (CRTC), das forkhead Protein (FOXO1) und den Transkriptionsfaktor EB (TFEB).

3.2.11 Nukleärer Transport von Calcineurin

Für die Regulation der Transkription spielt die Verweildauer von Transkriptionsfaktoren und Transkriptionsaktivatoren im Nukleus eine wichtige Rolle (Hogan, Chen et al. 2003). Proteine, die größer als 40 kDa sind, werden aktiv über den Nuklear-Pore-Komplex (NPC) durch die Kernmembran transportiert. Durch vergleichende Sequenzanalysen konnten in CnA ein NLS und ein NES identifiziert werden, die für den Transport von Calcineurin über den NPC notwendig sind (Rout and Aitchison 2001, Hallhuber, Burkard et al. 2006). Im Basalzustand sind diese Sequenzen intramolekular maskiert – sie werden erst nach Bindung von Ca^{2+} /CaM oder nach Proteolyse der AID durch Calpain freigelegt. Der Transport in den Nukleus ist Rezeptor-vermittelt, Ran-GTP-abhängig und wird in 3 Phasen unterteilt. In der ersten Phase wird das NLS von Importinen erkannt und gebunden. In der zweiten Phase wird der Komplex aktiv über den NPC in den Kern transportiert (Gorlich and Mattaj 1996, Nigg 1997). In der dritten Phase wird die Dissoziation des Heterodimers von Ran-GTP katalysiert. Diese Phase endet mit der Freisetzung des Proteins im Nukleoplasma (Pemberton and Paschal 2005) und das Importin ist für einen neuen Zyklus verfügbar. Die GTPase Ran, die die Energie für den Transport liefert, steht unter Kontrolle von 2 Regulatoren: „Ran guanosin nucleotide exchange factor“ (Ran-GEF) und „Ran-specific GTPase activating“ Protein (Ran-GAP). Ran-GEF belädt Ran mit GTP, während Ran-GAP Ran zur Hydrolyse von GTP und zur Bindung eines neuen GDP zwingt. Ran-GEF ist im Nukleus lokalisiert

und an Chromatin gebunden, während Ran-GAP überwiegend im Zytoplasma lokalisiert ist (Gorlich, Seewald et al. 2003).

Transport-Proteine für Calcineurin sind Importin β 1 für den Import und Crm1 für den Export (Hallhuber, Burkard et al. 2006). Dabei ist der Export von CnA Calcineurin ebenfalls energieabhängig und wird von Crm1 in einem Ran-GTP vermittelten Weg katalysiert (Gorlich, Seewald et al. 2003).

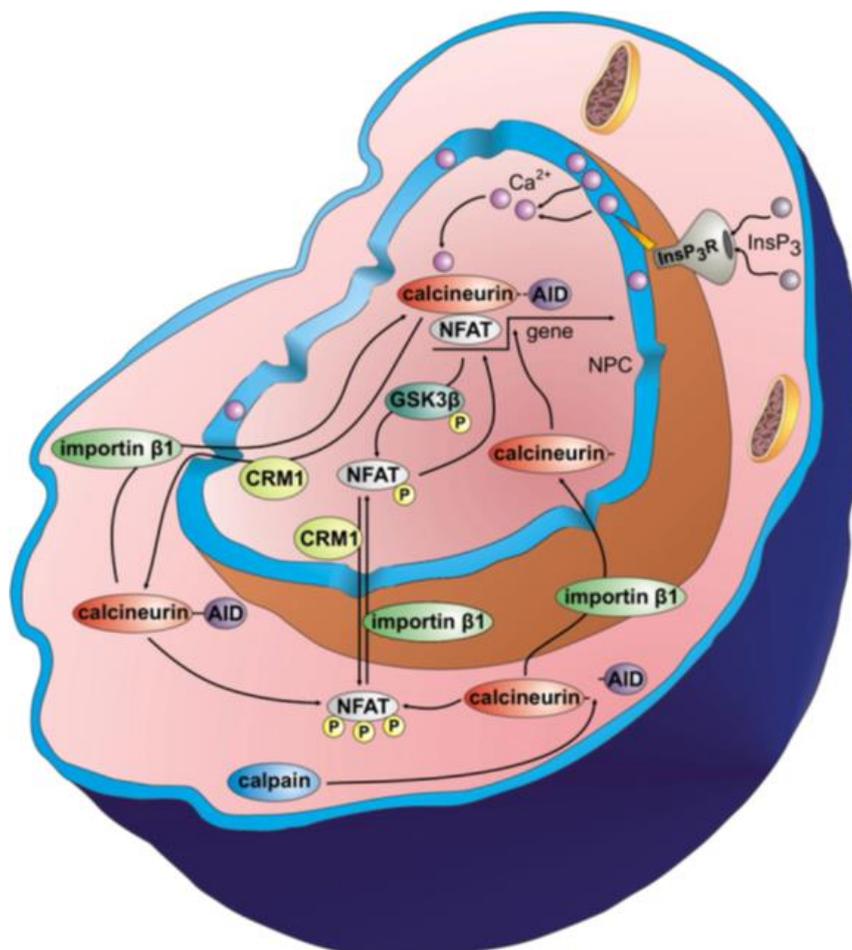


Abb. 5 Der Nukleus als eine Mikrodomäne für Calcineurin.

Nach (Heineke and Ritter 2012).

Das detaillierte Wissen über den Transport von Calcineurin durch die Kernmembran ermöglichte die Entwicklung einer neuen therapeutischen Strategie. Diese beruht auf der kompetitiven Inhibition der Interaktion zwischen Calcineurin und Importin β 1 durch das **Import Blocking Peptid (IBP)**. Dieses Peptid entspricht der NLS-Region von Calcineurin (Aminosäuren 172-183 des humanen Calcineurin A β) und sättigt die Calcineurin-Bindungsstellen der Importin β 1-Moleküle im Zytoplasma ab.

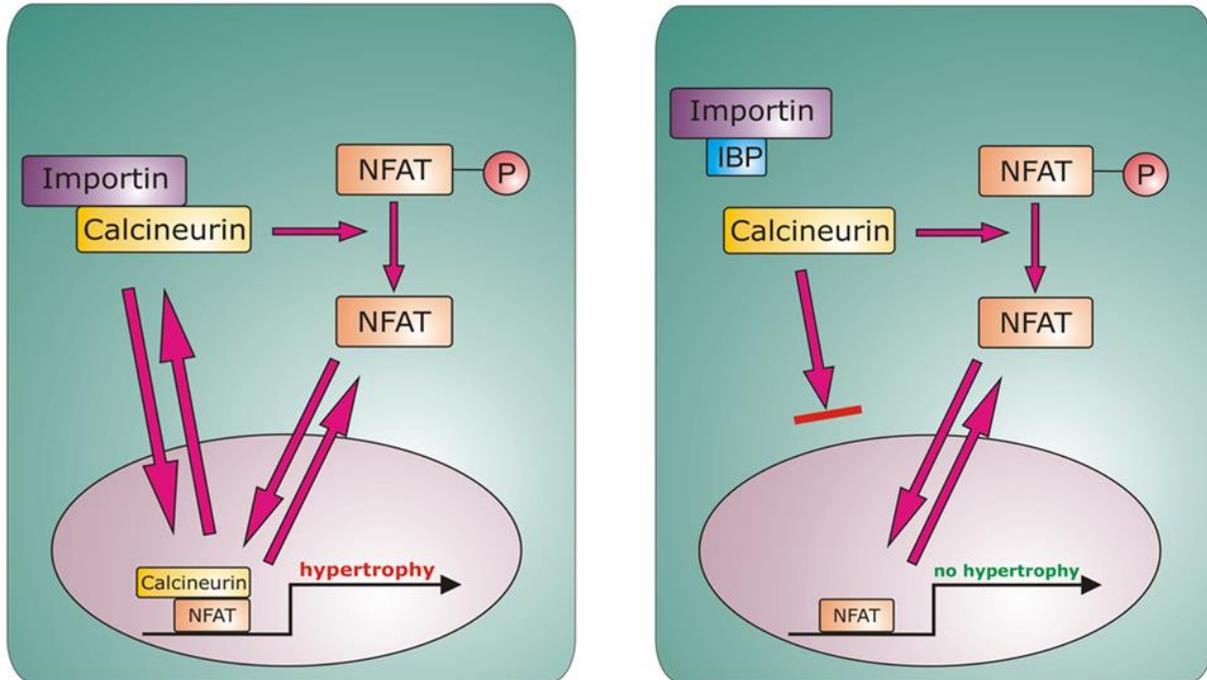


Abb. 6 Inhibition des Calcineurin-Signalwegs in Kardiomyozyten durch IBP.
 Nach (Hallhuber *et al.* 2006, Burkard *et al.* 2005)

3.2.12 Calcineurin im Nukleus

Die Funktion von Calcineurin im Zellkern ist bislang nicht vollständig verstanden. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass seine Translokation in den Nukleus Voraussetzung für die Aktivierung hypertrophieassoziiierter Gene ist (Burkard, Becher *et al.* 2005, Hallhuber, Burkard *et al.* 2006). Der Haupteffektor des Calcineurin/NFAT-Signalwegs bei der Transkription ist NFAT. NFAT-Transkriptionsfaktoren besitzen eine unvollständige Rel-homologe Domäne und binden die DNA daher nur schwach. Um die DNA-Interaktion zu stärken, kommt es zur Kooperation mit anderen nukleären Transkriptionsfaktoren wie AP-1 (c-Jun/c-Fos), GATA4 und MEF2 (Hogan, Chen *et al.* 2003). Auch Calcineurin könnte als ein Transkriptions-Coaktivator fungieren und so die Bindung von NFAT an die DNA stärken. Andererseits wäre es möglich, dass Calcineurin NFAT-Kinasen wie bspw. Der Glykogen-Synthase-Kinase 3 β (GSK3 β), der p38 MAP-Kinase oder der Proteinkinase A (PKA) im Zellkern entgegenwirkt. Diese Kinasen rephosphorylieren die Serin-reichen N-Termini von NFAT-Faktoren und induzieren den Crm1-vermittelten Export von NFAT aus dem Nukleus (Chow, Rincon *et al.* 1997, Zhu and McKeon 1999, Antos, McKinsey *et al.* 2002, Braz, Bueno *et al.* 2003). Da allerdings auch Calcineurin-Mutanten ohne Phosphatase-Funktion den NFAT-Export blockieren, kann dies nicht die Hauptfunktion von Calcineurin im Zellkern sein (Zhu, Shibasaki *et al.* 1998). Park *et al.* stellten daher die Theorie auf, dass Calcineurin im Kern die NES von NFAT maskiert und so die Bindung des Exportproteins Crm1 verhindert (Park, Uesugi *et al.* 2000). So könnte der Cn/NFAT-Komplex nukleär verbleiben und die transkriptionelle Aktivität aufrechterhalten (Rout and Aitchison 2001, Hogan, Chen *et al.* 2003). Interessanterweise wird Calcineurin ebenfalls durch Crm1 aus dem Nukleus exportiert.

Bei kardialer Hypertrophie wird dieser Mechanismus allerdings durch die Proteolyse von Calcineurin durch Calpain und dem damit verbundenen Verlust des C-terminalen Fragments (mit AID und NES) ausgehebelt (Hallhuber, Burkard et al. 2006). Calcineurin kann durch Crm1 nicht mehr gebunden und exportiert bleiben und verbleibt nukleär. Somit liegt bei kardialer Hypertrophie ein konstitutiv aktives, konstitutiv nukleäres Calcineurin vor, das – wie *in vivo*-Studien zeigen – nicht mehr durch CaM reguliert wird. Eine Ca^{2+} -Abhängigkeit ist durch dessen strukturelle Bedeutung für das Heterodimer (CnB-Bindung) aber weiterhin gegeben (Stemmer and Klee 1994, Yang and Klee 2000).

3.2.13 Calcium Mikrodomänen

Da es in Kardiomyozyten Mechanismen geben muss, um Calciumsignale von den starken Ca^{2+} -Schwankungen im Zuge des ECC zu unterscheiden, wird in den letzten Jahren verstärkt über die Bedeutung von Calcium-Mikrodomänen diskutiert. So könnte bspw. nukleäre Ca^{2+} zur Aktivierung von Calcineurin beitragen. Wu *et al.* wiesen nach, dass die perinukleäre Ca^{2+} -Freisetzung über IP_3R die Aktivität von nukleären Faktoren beeinflusst (Wu, Zhang et al. 2006). Studien mit atrialen (Bootman, Harzheim et al. 2007, Zima, Bare et al. 2007, Kockskamper, Seidlmayer et al. 2008) und ventrikulären Myozyten (Wu, Zhang et al. 2006, Higazi, Fearnley et al. 2009) zeigten, dass IP_3 -Agonisten oder IP_3 selbst spezifische Effekte auf nukleoplasmatische Ca^{2+} -Signalwege haben. Dies wird durch die starke Expression von IP_3 -Rezeptoren (IP_3R) in der Kernmembran neonataler und adulter Kardiomyozyten begünstigt (Bare, Kettlun et al. 2005, Higazi, Fearnley et al. 2009). Die räumliche Nähe der IP_3R zum Nukleus könnte die Aktivierung von Ca^{2+} -Signalwegen und die damit verbundene Transkription von kardialen Genen fördern. Das Ca^{2+} , das sich im perinukleären Raum befindet und freigesetzt wird, führt im Nukleus zur Phosphorylierung von HDAC5 über die Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (CaMKII). Daraus resultiert der Export von HDAC5 ins Zytoplasma und die Aktivierung (De-Repression) MEF-2-abhängiger Transkriptionsvorgänge in Kardiomyozyten (Wu, Zhang et al. 2006). Zusätzlich fördert die Ca^{2+} -Freisetzung über IP_3R die Aktivierung und die nukleäre Translokation von Calcineurin und NFAT, wodurch das hypertrophe Gen-Programm gestartet wird (Wu, Zhang et al. 2006, Higazi, Fearnley et al. 2009). CaMKII und Calcineurin könnten also als Ca^{2+} -Sensoren im Kern fungieren und Ca^{2+} -Signale in eine hypertrophe Antwort übersetzen.

4 Zielstellung

In ständig schlagende Herzmuskelzellen finden schnell Änderungen der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration statt, um eine Kontraktion ausführen zu können, wie es im Sinne der ECC zu Stande kommt. Es gibt viele Hypothesen, wie die Zellen das Ca^{2+} von ECC von Ca^{2+} für ein hypertrophisches Signal unterscheidet. Allerdings ist dieser Vorgang noch nicht ganz verstanden. Letztere Arbeiten deuten auf dem Nukleus als Ca^{2+} -Mikrodomäne.

In dieser Arbeit wurde die Rolle von Calcineurin im Nukleus sowie die Bedeutung des Nukleus als eine Ca^{2+} -Mikrodomäne untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass der Nukleus von Kardiomyozyten eine solche Ca^{2+} -Mikrodomäne darstellt und dass nukleäres Calcineurin ein sehr sensitiver Ca^{2+} -Sensor ist.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde ein neuer Calcineurin-Inhibitor charakterisiert und optimiert sowie seine Wirksamkeit und andere Eigenschaften *in vivo* zu testen. Wichtige Entwicklungsschritte waren die Identifizierung eines geeigneten Lösungsmittels, das Einführen verschiedener Modifikationen in die Peptidsequenz, um die Spezifität und Stabilität des Wirkstoffs zu verbessern, die Eingrenzung der erforderlichen Dosis zur Verhinderung einer hypertrophen Entwicklung in der Maus und das Sammeln erster Informationen zu Körperdistribution, Abbau und Ausscheidung des Peptids.

5 Material und Methoden

5.1 Geräte

Gerät	Hersteller	Model
Autoklav	Sanoclav	KL-12-3
ELISA reader	Tecan	Tecan Spectra
Entwickler		
Fluoreszenz-Mikroskop	Keyence	Biozero
Gefriermikrotom	LEICA	CM1850
Heizblock	Eppendorf	ThermoStat plus
Heizblock	Liebisch	
Homogenisator	IKA Labortechnik	Eurostar digital
Homogenisator	Janke/Kunkel	Ultra Turrax T25
Konfokal-Mikroskop	Zeiss	LSM 780
Konfokal-Mikroskop	Leica	SP5
Luminometer	Berthold industries	Lumat LB9501
Magnetischer Rührer	IKA Labortechnik	RH basic2, Ikamag RET, Ikamag RCT
Mikroskop	Leitz	labovert
PCR-Maschine	Biometra	
Power supply	Biometra	P25, PP4000
Power supply	Hoefer	SX250
Photometer	Eppendorf	Bio-Photometer
Ultraschallbad	Julabo	USR05
UV-Transilluminator	BioRad	Mini-Transluminator
Waage	Sartorius	BP61
Wasserbad	Haake	Thermo C10
Wasserbad	Inlabo	SW20C
Zentrifuge	Hettich	Mikro 12-24
Zentrifuge	Sigma	2K15, Sigma 2-15
Zentrifuge	Beckmann	GPKR Centrifuge
Zentrifuge	Heraeus	Biofuge pico

5.2 Verbrauchsmaterialien

5.2.1 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien wie Pipettenspitzen oder Tubes wurden vom Universitätsklinikum Würzburg (Zentrallager) bei verschiedenen Anbietern (bspw. Eppendorf, Sarstedt, Brand) bezogen.

5.2.2 Chemikalien

Chemikalien wurden über das Universitätsklinikum Würzburg (Apotheke) oder direkt bei den Firmen Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) bzw. Sigma (München) bezogen.

5.2.3 Enzyme

Alle Enzyme wurden bei Thermo Scientific erworben.

5.3 Kits

Produkt	Firma	Katalognummer
Luciferase Assay System	Promega GmbH	E1910/ E1941
Luciferase-ELISA Kit	Bioo Scientific GmbH	3420-02
NucleoBond PC100	Macherey & Nagel GmbH & Co.KG	740573.100
NucleoBond PC500	Macherey & Nagel GmbH & Co.KG	740 574.50
Quick Ligation Kit	New England Biolabs	M2200S
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen GmbH	28104
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen GmbH	28704
RNA Isolation Kit	Qiagen GmbH	74704
ViraPower Adenoviral Expression System	Invitrogen-Thermo Fisher GmbH	K4930-00

5.4 Lösungen und Puffer

5.4.1 DNA-Elektrophorese

50x TAE-Puffer (Tris-Acetat-EDTA):

Komponente ([g/mol])	Stocklösung	Menge	Endkonzentration
Tris (121,14)		242 g	2 mM
Acetat (60,05)		57,1 ml	1 mM
EDTA (292,25)	0.5M pH 8.0	100 ml	0,05 mM
dH ₂ O		ad 1000 ml	

6 x loading dy

Komponente	Endkonzentration
Bromphenol blau	0,25 %
Xylen Cyanol	0,25 %
Glycerol	30 – 60 %

5.4.2 Western Blot

MHC-Probenpuffer

Komponente ([g/mol])	Menge/100 ml	Endkonzentration
NaCl	1,75 g	0,3 M
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	1,38 g	0,1 M
Na ₂ HPO ₄	0,71 g	0,05 M
Na ₄ P ₂ O ₇	0,27 g	0,01 M
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	0,02 g	0,001 M
EDTA	0,37 g	0,01 M
dH ₂ O	ad 100 ml	

Anschließend wurden 83,98 mg NaF und 18,39 mg Na₃VO₄ zu der Lösung gegeben und der pH-Wert auf 7,4 eingestellt.

Ansatz-Puffer

Komponente	Endkonzentration
PMSF	1:1000
Proteinase Inhibitor, EDTA frei	1 x
MHC-Puffer	ad 100 ml

4 x Laemmli-Puffer

Komponente	Menge/100 ml
1M TRIS pH 6,8	2,4 ml
β-Mercaptoethanol	1 ml
SDS	0,8 g
Glycerol	4 ml
Bromphenolblau	0,01%
dH ₂ O	2,8 ml

1, 5 M Tris pH 8,8:

Komponente ([g/mol])	Menge/100 ml	Endkonzentration
Tris (121,14)	18,15 g	1,5 M
dH ₂ O	ad 100 ml	

1 M Tris pH 6,8

Komponente ([g/mol])	Menge/100 ml	Endkonzentration
Tris (121,14)	6 g	1 M
dH ₂ O	ad 100 ml	

10 % SDS (Natriumdodecylsulfat)

Komponente	Gewicht/ 100 ml	Endkonzentration
SDS	10 g	10 %
dH ₂ O	ad 100 ml	

5 x PBS pH 7,4

Komponente ([g/mol])	Menge/5 l	Endkonzentration (5x)	Endkonzentration (1x)
NaCl (58,44)	20 g	342 mM	68,4 mM
NaH ₂ PO ₄ * H ₂ O (137,99)	11,73 g	85 mM	17 mM
Na ₂ HPO ₄ (141,96)	41,17 g	290 mM	58 mM
dH ₂ O	ad 5000 ml		

5x Elektrophorese-Puffer

Komponente ([g/mol])	Menge/5 l	Endkonzentration (5x)	Endkonzentration (1x)
Tris (121,14)	75 g	0,62 M	124 mM
Glycin (75,07)	360 g	4,8 M	960 mM
SDS	25 g	0,5 %	0,1 %
dH ₂ O	ad 5000 ml		

Transfer-Puffer

Komponente ([g/mol])	Stocklösung	Volumen (1l)	Endkonzentration (1x)
5x Elektrophorese Puffer	5x	200 ml	1x
Methanol		200 ml	20 %
dH ₂ O		ad 1000 ml	

Waschpuffer

Komponente [g/mol]	Stocklösung	Volumen (1l)	Endkonzentration (1x)
5x PBS pH 7,4	5x	200 ml	1x
Tween 20		0,5 ml	0,05 %
dH ₂ O		ad 1000 ml	

Block-Lösung

Komponente [g/mol]	Stocklösung	Volumen (1l)	Endkonzentration (1x)
5x PBS pH 7,4	5x	20 ml	1x
Magermilchpulver		5 g	5 %
dH ₂ O		ad 100 ml	

SDS-Gele:**Trenngel:**

Komponente	7,5 %	10 %	12 %	15 %
dH ₂ O	9,69 ml	8,02 ml	6,69 ml	4,69 ml
1,5 M Tris pH 8,8	5 ml	5,0 ml	5,0 ml	5,0 ml
10 % SDS	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml
Acrylamid/Bis (30%ige Stocklösung)	5 ml	6,67 ml	8 ml	10 ml
10 % APS	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml
TEMED	0,01 ml	0,01 ml	0,01 ml	0,01 ml

Sammelgel:

Komponente	2 Gele
dH ₂ O	5,65 ml
0,5 M Tris pH 6,8	2,5 ml
10 % SDS	0,1 ml
Acrylamid/Bis (30%ige Stocklösung)	1,7 ml
10 % APS	0,05 ml
TEMED	0,01 ml

Luminol zur Entwicklung von Western Blots

Komponente [g/mol]	Endkonzentration
Luminol (199,1)	1,25 mM
Tris HCl; pH 8,6 (157,6)	100 mM
dH ₂ O	ad 1 L

Cumarinsäure

Komponente [g/mol]	Menge	Endkonzentration
DMSO	100 µl	
Cumarinsäure	110 mg	6,7 mM

Die Entwicklerlösung wird jeweils frisch angesetzt: 5 ml Luminollösung + 0,5 ml Cumarinsäure + 5 µl 30 % H₂O₂. Die Mischung wird mit der Western Blot-Membran 2-3 min inkubiert, anschließend wird das Signal detektiert.

5.4.3 Kardiomyozyten-Isolierung und Zellkultur**CBFHH (Calcium- und Bicarbonate-Free Hank's Solution with HEPES)**

Komponente [g/mol]	Endkonzentration
NaCl (58,44)	137 mM
KCl (74,55)	5,36 mM
MgSO ₄ * 7 H ₂ O (246,48)	0,81 mM
Dextrose (180,16)	5,55 mM
KH ₂ PO ₄ (136,09)	0,44 mM
NaHPO ₄ (141,96)	0,34 mM
Hepes, pH 7,4	20,06 mM
dH ₂ O	ad 1 L

Danach wurden die CBFHH-Lösung mit einem Einweg- Bottle Top-Filter steril filtriert und Penicillin G (50 U/ml) sowie Streptomycin (50 µg/ml) zugegeben.

T & D (Trypsin & DNase)-Lösung

Komponente	Endkonzentration
DNase	10 mg/ml
Trypsin	1,5 mg/ml
CBFHH	ad 500 ml

MEM (Minimal Essential Medium)

Komponente [g/mol]	Endkonzentration / Menge
MEM HBS mit NEAA ohne L-Glutamin, Phenolrot, NaHCO ₃ (Bioconcept, Schweiz)	10,5 g
L-Glutamin (146,15)	2 mM
NaHCO ₃ (84,01)	4,2 mM
Vitamin B12	2 µg/ml
Penicillin (1600 U/mg)	50 U/ml
Streptomycin	50 µg/ml
BrdU	0,1 mM
dH ₂ O	ad 1 L

MEM/5: wie oben angesetzt und Zugabe von 5 % FCS

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium mit 10 % FCS) + Glutamax für HEK293A-Zellen

Komponente	Endkonzentration / Volumen
DMEM + Glutamax (Invitrogen)	500 ml
Fetales Kalbserum	10 %
L-Glutamin	1 %
NEAA	1 %

Opti-MEM (Thermo Fisher Katalog-Nr.31985062): wurde bei Transfektionen verwendet.

5.4.4 Isolierung adulter muriner Kardiomyozyten**Tyrode-Waschlösung (Ca²⁺-frei)**

Komponente	Endkonzentration
NaCl	135 mM
KCl	4,7 mM
KH ₂ PO ₄	0,6 mM
Na ₂ HPO ₄ * H ₂ O	0,6 mM
MgSO ₄ * 7 H ₂ O	1,2 mM
HEPES	20 mM
Taurin	30 mM
D-Glucose	10 mM
BDM	10 mM

Verdauung

Komponente	Menge
CaCl ₂	11,25 µl
Liberase	0,225 mg/ml
Trypsin	0,05 mg/ml

Stopplösung

Komponente	Endkonzentration
CaCl ₂	12,5 µM
FCS	10 %

5.4.5 Immunhistochemie

5x PBS (Phosphat-gepufferte Salzlösung) pH 7,4

Komponente [g/mol]	Endkonzentration (5x)	Endkonzentration (1x)
NaCl (58,44)	685 mM	137 mM
KCl (74,6)	13,5 mM	2,7 mM
Na ₂ HPO ₄ * 2 H ₂ O (177,99)	40,5 mM	8,1 mM
KH ₂ PO ₄ (136,09)	7,5 mM	1,5 mM
dH ₂ O	ad 1 L	ad 1 L

0,1 % Triton in PBS: Zugabe von 100 µl Triton® X100 zu 100 ml 1x PBS

4 % PFA: Zugabe von 4 g Paraformaldehyd zu 100 ml 1x PBS

5.4.6 Bakterienkultur

LB-Medium

Komponente	Menge
Bacto-Pepton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	10 g
dH ₂ O	ad 1000 ml

LB-Agar: Zugabe von 15 g Agar zu 1000 ml LB-Medium

5.5 Antibiotika

Antibiotikum	Stock	Endkonzentration	Selektion
Kanamycin	25 mg/ml in dH ₂ O	50 µg/ml	<i>E. coli</i>
Ampicillin	100 mg/ml in dH ₂ O	100 µg/ml	<i>E. coli</i>

5.6 Peptide

Peptid	Sequenz
IBP 1	AAVALLPAVLLALLAKQECKIKYSERV
ctr	AAVALLPAVLLALLAAQECAIAYSEAV
IBP 3	AAVALLPAVLLALLAKQEXKIKYSERV
IBP 4	AAVALLPAVLLALLAKQECKIKYAERV
IBP 5	AAVALLPAVLLALLAKQEXKIKYAERV
IBP 1-TAMRA	AAVALLPAVLLALLAKQECKIKYSERV-TAMRA
IBP 3 - TAMRA	AAVALLPAVLLALLAKQEXKIKYSERV-TAMRA
IBP 4 -TAMRA	AAVALLPAVLLALLAKQECKIKYAERV-TAMRA
IBP 5-TAMRA	AAVALLPAVLLALLAKQEXKIKYAERV-TAMRA

5.7 Antikörper

Primäre Antikörper

Antikörper	Spezies	Hersteller	Katalognummer
α -ANP	Kaninchen	Millipore	AB2232
α -BNP	Maus	Santa Cruz	sc67455
α -CnA	Kaninchen	Enzo	SPA610
α -GAPDH	Maus	Abcam	Ab125247

Sekundäre Antikörper

Antikörper	Spezies	Hersteller	Katalognummer
AntiRabbit IgG HRP-linked	Esel	GE Healthcare	NA9340V
AntiMouse IgG HRP-linked	Esel	GE Healthcare	NA9310V
AntiGoat IgG HRP-linked	Esel	Santa Cruz	SC2020

5.8 RNA-Sonden für Realtime-PCR

RNA-Sonde	Spezies	RNA-Sequenz	Hersteller
Calcineurin (PPP3CA)	Maus	Mm_0131768_m1	Thermo Scientific
GAPDH	Maus	Mm_99999915_g1	Thermo Scientific
ANP (NPPA)	Maus	Mm_1255747_g1	Thermo Scientific
BNP (NPPB)	Maus	Mm_01255770_g1	Thermo Scientific

5.9 Bakterienstämme

Stämme	Genetischer Hintergrund	Herkunft
<i>E. coli</i> DH5 α	<i>F- ϕ80d lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169 recA1 endA1 hsdR17 (rk-mk-) phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 λ-</i>	Invitrogen; Karlsruhe, Germany; Kompetente Zellen (Katalognr.: #18263-012)

5.10 Zelllinien

Zelllinie	Herkunft
Humane embryonale Leberzellen (HEK 293A)	eigener Stock Kommerziell: ATCC, USA (Katalognr.: #CRL-1573)

5.11 Tiermodelle

Stamm	Genetischer Hintergrund	Lieferant
<i>Rattus norvegicus</i>	Wistar-Ratte	Charles River, Sulzfeld, Deutschland
<i>Mus musculus</i>	FVB/NCRL	Charles River, Sulzfeld, Deutschland
<i>Mus musculus</i>	C57BL/6N	Charles River, Sulzfeld, Deutschland
<i>Mus musculus</i>	FVB/NCRL-IP ₃ -Sponge	Bereitgestellt von Jeff Molkentin

Die tierexperimentellen Arbeiten wurden von der Regierung von Unterfranken genehmigt.

5.12 Zellkultur

5.12.1 Isolierung von neonatalen Ratten-Kardiomyocyten (NRCMs)

Die Isolierung neonataler Ratten-Kardiomyozyten wurde nach den Richtlinien der NIH durchgeführt. 1-2 Tage alte neonatale Wistar-Ratten wurden unter der Sterilbank mit einer sterilen Schere dekapitiert. Dann wurden mit einer feineren sterilen Schere der Thorax aufgeschnitten und mit einer Pinzette das Herz im Sulcus atrioventricularis abgezipft. Die Herzen wurden in einer Petrischale mit 20 ml CBFHH + 1 ml Heparin gesammelt und gleich in die nächste Petrischale mit 1,5 ml CBFHH und 1,5 ml Heparin überführt. Um das restliche Blut aus den Herzen zu entfernen, wurden diese mit einer Pinzette ausgedrückt und mit einer kleinen Schere grob geschnitten. Anschließend erfolgte der Verdau der Herzen. Sie wurden mit einem Skalpell zerkleinert und mit 10 ml T & D in ein 50 ml Falcon-Tube überführt. Die Petrischale wurde mit 5 ml T & D ausgewaschen und die Lösung mit 300 µl DNase ebenfalls in das Falcon-Tube überführt. Die Suspension wurde bei niedrigster Geschwindigkeit 20 min mit einem Rührfisch gerührt. Danach wurde das Gewebe absinken gelassen und der Überstand verworfen. Dieser Vorgang wurde wiederholt – alle 10 min wurde von der langsam gerührten Zellsuspension der Überstand abgenommen, in Falcon-Tubes mit 7,5 ml FCS überführt und bei 37 °C und 1% CO₂ inkubiert – bis sich in der Lösung mikroskopisch keine Kardiomyozyten mehr nachweisen ließen. Anschließend erfolgte die Zentrifugation der Falcon-Tubes mit dem verdauten Gewebe für 5 min bei 1600 Umdrehungen/min und Raumtemperatur. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in 40 ml MEM/5 aufgenommen und resuspendiert. Nachdem die Zellsuspension durch einen 70 µm-Zellfilter filtriert und in einer 10 cm Petrischale aufgefangen worden war, schloss sich eine 90minütige Inkubation bei 37 °C und 1 % CO₂ an. Danach wurde die Suspension in eine kleine Zellkulturflasche überführt und die Schale mit 5 ml MEM/5 gewaschen, um leicht haftende Kardiomyozyten zu lösen. Die leere Schale wurde 3-mal auf dem Tisch geklopft und noch einmal mit 5 ml MEM/5 gespült. Der letzte Schritt war die Bestimmung der Zellzahl und das Ausplattieren der Zellen in der gewünschten Dichte. Am folgenden Tag wurden die Zellen je nach Verschmutzungsgrad 1-2mal mit 1x PBS gewaschen und frisches Medium zugegeben.

5.12.2 Isolation von adulten murinen Kardiomyozyten

Linksventrikuläre Kardiomyozyten wurden aus 12 Wochen alten C57B6-Mäusen isoliert, die mit Isofluran anästhesiert worden waren. Nach Entnahme der Herzen erfolgte die Befestigung in einer Langendorf-Apparatur. Es schloss sich die rückläufige Perfusion der Herzen mit einer Waschlösung an. Nach 3 min wurden die Waschlösung durch eine Verdau-Lösung ersetzt und die Herzen für 12 min bei 37 °C verdaut. Nach Zerkleinerung, Filtrierung und Waschen des verdauten Gewebes mit einer Stopp-Lösung erfolgte die schrittweise Zugabe von Ca²⁺ bei RT. Die Ca²⁺-

Konzentration stieg dabei in 3 Schritten bis auf 1 mM an. Die Myocyten wurden in Laminin-beschichteten Petrischalen ausplattiert. Die Ca^{2+} -Messungen erfolgten am Tag der Isolation.

5.13 Generierung von Expressionskonstrukten

CnA β (1-...), pNP3Luci

Die Konstrukte CnA β (1-525) und CnA β (1-425) wurden per PCR amplifiziert und in mit Hilfe der XbaI- und XhoI-Schnittstellen in einen pEGFP-C3-Vektor kloniert.

Für die CnA-Isoform mit defekter CnB-Bindestelle wurden die entsprechende Domäne per Mutagenese-PCR modifiziert. Je zwei Deletionen und Insertionen änderten das Leseraster in der CnB-Bindedomänen (766delC, 786_787insC, 912_913insC, 930delA).

Um die AdCnA-Isoformen und AdNP3Luci zu generieren, wurden die jeweiligen cDNAs in einen pShuttle-CMV-Vektor mit Hilfe des AdEasy XL Adenoviral Vector Systems (Stratagene) subkloniert.

AdIP₃R2-Luci

Der mit der Luciferase-cDNA gekoppelte IP₃R2-Promotor wurde in ein pENTR1A dual selection-Plasmid (Life technologies) subkloniert. Es schloss sich die Rekombination mit einem pAD/CMV/V5-Vektor (Life technologies) an. Die Virus-Herstellung erfolgte den Angaben des Herstellers entsprechend.

5.14 Transduktion von NRCM

Die Ratten-Kardiomyozyten wurden einmal mit 1x PBS gewaschen. Das Virus mit einer MOI von 50 wurde in OptiMEM gelöst und je 1 ml pro Well mit $1,5 \times 10^6$ Zellen pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 4 Stunden bei 37°C und 5 % CO₂ erfolgte die Abnahme des Mediums und – je nach Experiment – die Zugabe frischer Nährlösung. Nach 48 Stunden wurden die Zellen abgeerntet.

5.15 Western Blot

Bei der Gewinnung der Proteinextrakte aus Zellen oder Herzgewebe kam der Ansatz-Puffer zur Anwendung. Um Zellreste zu entfernen, wurden die Extrakte dann 15 min bei 1500 g und 4°C zentrifugiert, der Überstand abgenommen und die Pellets bis zum nächsten Schritt bei - 80°C gelagert. Die Proteinbestimmung erfolgte am Tag der Auftrennung im SDS-Gel spektralphotometrisch mittels Nanodrop. Anschließend wurden 20 μg in Laemmli-Puffer gelöst und bei 95°C 10 min aufgekocht, um die Proteine zu denaturieren. Es folgte die Auftrennung der Proben in SDS-Gelen, deren Konzentration je nach Größe des zu detektierenden Proteins zwischen 7,5 und 15 % lag. Anschließend wurden die Proteine elektrophoretisch auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert und diese zur Vermeidung unspezifischer Antigen-Antikörper-Reaktionen in Blockierungslösung 1 h bei RT inkubiert. Darauf folgte die Inkubation der Membran

mit dem 1. Antikörper bei 4°C über Nacht in einem Schüttler. Am nächsten Tag wurde die Membran zunächst mit 1 x PBS-Tween gewaschen, dann mit dem 2. Antikörper für 1 Stunde bei RT inkubiert und anschließend erneut mit 1x PBS-Tween gewaschen. Die Signaldetektion erfolgte nach Inkubation der Membran in Luminol-Lösung für 2-3 min mit Hilfe von Röntgenfilmen.

5.16 Quantitative Real Time-PCR

Die Real Time-PCR ermöglicht die Quantifizierung eines PCR-Produktes in Echtzeit anhand eines Fluoreszenzsignals. Dieses Signal steigt proportional zur Menge des zu untersuchenden PCR-Produktes. Die mRNA aus dem Herzgewebe wurde entsprechend den Angaben des verwendeten Qiagen-Kits isoliert. Anschließend erfolgte die cDNA-Synthese aus der mRNA. Die cDNA-Menge wurde anhand des $2^{-\Delta C_t}$ -Wertes quantifiziert.

5.17 Luciferase-Assay

Der Luciferase-Assay ermöglichte es, die transkriptionelle Aktivität von Calcineurin mit Hilfe eines Marker-Gens (Luciferase) zu untersuchen und zu quantifizieren. Der Assay wurde nach Angaben des Herstellers (Promega; Mannheim, Deutschland) durchgeführt.

Zunächst wurden neonatale Rattenkardiomyozyten mit dem NFAT-Reporter-Plasmid AdNP3Luci in einer 6-well-Platte transfiziert, mit 1 x PBS gewaschen und mit 200 µl Lyse-Puffer pro well versetzt. Anschließend wurden die Zellen mit einem Zellschaber abgeerntet, 2 min bei 12.000 g zentrifugiert und der Überstand in Eppendorf-Röhrchen für die spätere Messung der Luciferase-Aktivität überführt.

Der Luciferase-Assaypuffer wurde auf 37°C vorgeheizt. 100 µl des Puffers wurden in Luminometer-Röhrchen pipettiert und zur Bestimmung des Hintergrundsignals analysiert. Nach Zugabe von 20 µl der jeweiligen Proben erfolgte eine Doppelmessung des Lumineszenz-Signals für 10 s. Anschließend wurde die Proteinkonzentration der Proben bestimmt.

5.18 Herstellung von IBP-Lösungen

Zunächst wurden die verschiedenen IBP-Formen in DMSO auf eine Konzentration von 5 mg/ml gelöst und dann in den zu testenden Lösungsmitteln auf eine Konzentration von 0,1 mM weiter verdünnt. Die Zellen wurden mit einer Konzentration von 1 µM inkubiert.

5.19 Messung von Ca²⁺-Transienten unter dem Konfokalmikroskop

Um Änderungen von zytosolischem und nukleärem Ca²⁺ verfolgen zu können, wurde ein Konfokalmikroskop (Zeiss LSM 780) verwendet. Intakte adulte murine Kardiomyozyten wurden mit dem Ca²⁺-Farbstoff Fluo-4-AM mit einer Konzentration von 8-20 µM 20 min bei RT gefärbt und anschließend mit Tyrode-Waschlösung mit 1 mM Ca²⁺ 10-15 min bei RT gewaschen. Anschließend

wurden die Ca^{2+} -Schwankungen anhand der Fluo-4-AM-Fluoreszenz unter dem Konfokalmikroskop aufgenommen.

5.20 Immunhistochemische Methoden

5.20.1 Immunhistochemie mit gefrorenen murinen Herzen

Frische 10 μM -Kryoschnitte aus murinen Ventrikeln wurden auf einen Objektträger aufgebracht und mit 4 % Paraformaldehyd in PBS 10 min bei RT fixiert. Nun erfolgte das Permeabilisieren mit 1 % Triton X-100 in PBS für 20 min bei RT. Danach wurden die Kryoschnitte 6-mal mit 1 x PBS gewaschen und mit 10 % Serum in PBS blockiert. Anschließend erfolgte die Inkubation ü. N. bei 4 °C mit dem primären Antikörper, gelöst in 10 % Serum. Am nächsten Tag wurden die Schnitte 3-mal mit 1 x PBS gewaschen und mit dem fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörper 1 Stunde bei RT inkubiert. Zur Sichtbarmachung der Zellkerne schloss sich eine 10-minütige Inkubation der Schnitte in DAPI-Lösung bei RT an. Nach erneutem Waschen mit 1 x PBS wurden die Schnitte eingedeckt und mit Hilfe eines Konfokalmikroskops ausgewertet.

5.20.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Anhand der Hämatoxylin-Eosin-Färbung können strukturelle Veränderungen innerhalb des Herzens nachgewiesen werden. Dafür wurden 10 μM -Kryoschnitte verschiedener Gewebeproben angefertigt und 1 std. getrocknet. Anschließend wurden die Schnitte 3 min in Aceton fixiert, 10 min getrocknet und 3 x 5 min in 1 x PBS gewaschen. Es folgten die Färbung der Schnitte mit Hämatoxylin für 8 min lang, eine Spülung mit Aqua dest. und eine 10-minütige Wässerung in Leitungswasser. Anschließend wurden die Schnitte 12 min mit Eosin gefärbt und 2 x mit Aqua dest. gespült. Nach 2-maligem kurzem Tauchen der Schnitte in 100 %igem Alkohol gedrängt wurden sie der Reihe nach je 10 min lang in 50 % Alkohol, 50 % Xylol und Xylol/Rothistol getränkt. Die fertig gefärbten Objekte wurden eingedeckt und unter einem Lichtmikroskop ausgewertet.

5.20.3 Cardiomyocyte Cross Sectional Area-Färbung (CCSA)

Fixierte und permeabilisierte Kryoschnitte wurden 3-mal mit rotem Weizen-Agglutinin und DAPI 30 min bei RT gefärbt, 4 x mit PBS gewaschen und eingedeckt. Mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops wurden Bilder von den Präparaten aufgenommen und diese unter Verwendung der Software „ImageJ“ hinsichtlich der Kardiomyozytengröße ausgewertet.

5.21 Hypertrophie-Induktion bei Mäusen durch Ang II

Hierfür wurden osmotische Pumpen (Alzet Nr. 1004; DURECT, Cupertino, CA) mit Ang II (2 mg/kg/d) oder physiologischer Kochsalzlösung (Kontrollen) befüllt und chirurgisch in 2 Monate alte Mäuse eingesetzt. Für die Betäubung der Mäuse wurde Isofluran verwendet. Die Pumpen gaben

ihren Inhalt über einen Zeitraum von 4 Wochen kontinuierlich ab. Bei den mit Ang II behandelten Tieren wurde so im Herzen eine hypertrophe Antwort induziert.

5.22 IBP-Bestimmung im Urin

Um die IBP-Konzentration im Urin von Mäusen zu messen, kam eine TAMRA-markierte Peptidvariante zum Einsatz, die sich über ihr Fluoreszenzsignal nachweisen ließ. Es wurden jeweils 100 µl der Urin-Proben in eine 96-well-Platte pipettiert und die Fluoreszenz mit Hilfe eines IVIS-Spektralphotometers bestimmt.

5.23 Statistische Auswertung

Alle Ergebnisse sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe von SigmaPlot 11.0. Für 2 Gruppen wurde der ungepaarte t-Test verwendet, für 4-6 Gruppen eine einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA).

6 Ergebnisse

Die Daten in den Abschnitten 6.1 bis 6.3 der Dissertation sind meine Hauptergebnisse und wurden von mir alleine erarbeitet, insbesondere die Generierung der Expressionskonstrukte, Präparation von neonatalen Ratten-Kardiomyozyten, Isolation von adulten Maus-Kardiomyozyten, Messungen von Ca^{2+} -Transienten unter dem Konfokalmikroskop und der NFAT-Luciferase Assay. Wenige spezifische Hilfestellungen von anderen Personen sind immer direkt angegeben.

6.1 Die Funktion von Calcineurin im Zellkern

Um die genaue Funktion von Calcineurin im Zellkern zu untersuchen, wurden zunächst die Phosphatase-Aktivität und deren Einfluss auf die transkriptionelle Aktivität von NFAT analysiert. Hierfür diente eine konstitutiv aktive Calcineurin-Isoform, deren AID deletiert war, um ihre nukleäre Lokalisation zu gewährleisten (1-425; Abb. 7). Parallel dazu wurde eine konstitutiv aktive Calcineurin-Variante generiert, deren Phosphatase-Domäne deletiert war (1-425 Δ P; Abb. 7). Um sicherzustellen, dass nur Calcineurin-Effekte in die Messungen einfließen, wurden die neonatale Rattenkardiomyozyten jeweils mit den konstitutiv aktiven Isoformen von Calcineurin (1-425 und 1-425 Δ P Abb. 7) transfiziert, die im Zellkern akkumulierten. Es schloss sich die Behandlung der Zellen mit IBP an, um den Transport von zelleigenem Calcineurin in den Zellkern zu verhindern. In einem letzten Schritt wurden die Zellen mit Ang II stimuliert, um zytosolisches Calcineurin zu aktivieren und folglich die Dephosphorylierung von NFAT und dessen Import in den Zellkern zu induzieren.

Beide konstitutiv aktiven Calcineurin-Isoformen (mit und ohne Phosphatase-Domäne) verursachten Hypertrophie in neonatalen Rattenkardiomyozyten – unabhängig von der Phosphatase-Aktivität. Dies zeigte sich in der Zunahme der Zellgröße (Abb. 8 A). Die Cotransfektion mit dem NFAT-Luciferase-Reporterplasmid (AdNP3-luci) zeigte einen Anstieg der NFAT-Aktivität trotz deletierter Phosphatase-Domäne im Vergleich zu den Kontrollen mit nur dem Luciferase-Reporterplasmid (AdNP3-luci) oder mit dem Luciferase-Reporterplasmid (AdNP1-luci) (Abb. 8 B).

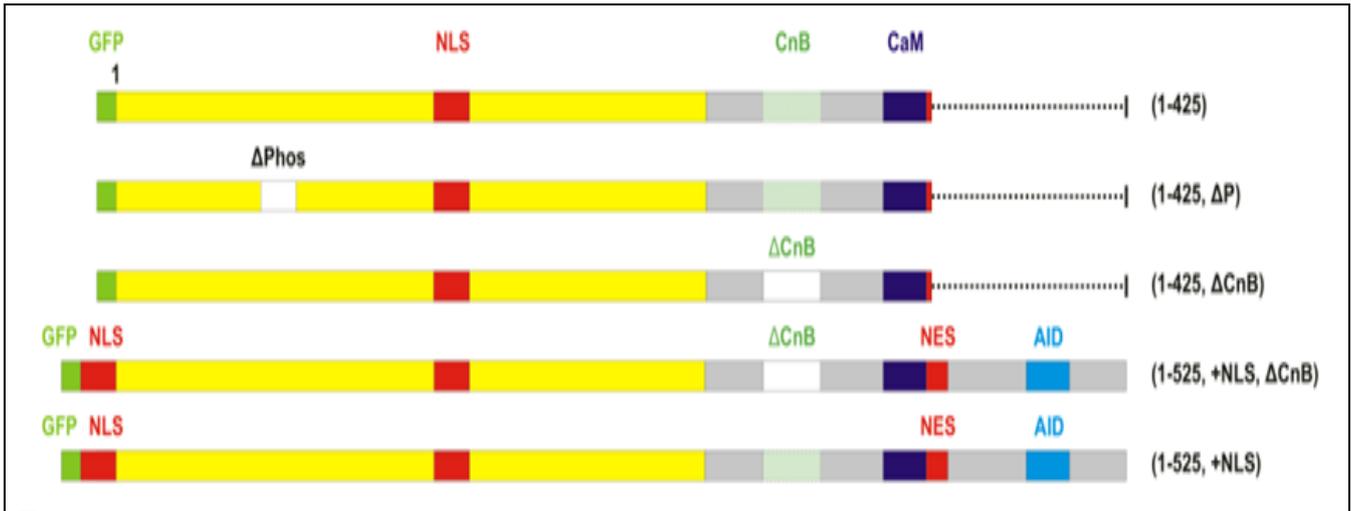


Abb.7 Schematische Darstellung von Calcineurin-Vektoren mit schrittweiser C-terminaler Verkürzung, Deletion der Phosphatase-Domäne oder der CnB-Bindungsdomäne.

NLS, nuclear localization sequence; NES, nuclear export signal; CnB, calcineurin B binding domain; CaM, calmodulin binding domain; AID, autoinhibitory domain.

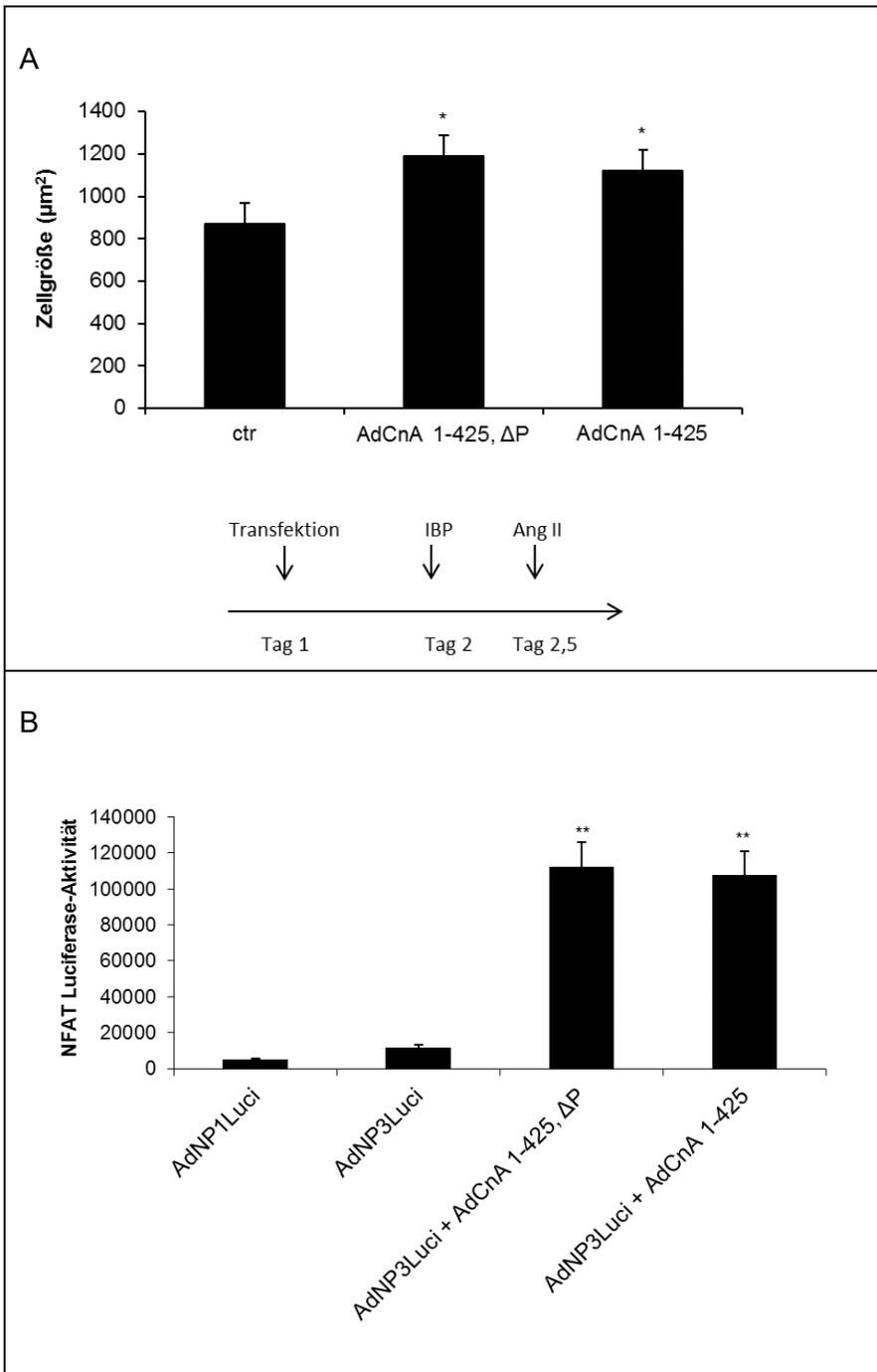


Abb. 8 Funktion der Phosphatase-Aktivität nukleären Calcineurins.

A) Neonatale Rattenkardiomyozyten wurden mit einer konstitutiv aktiven, nukleären Calcineurin-Isoform ohne Phosphatase-Domäne transduziert, um die Bedeutung der enzymatischen Aktivität im Zellkern zu untersuchen. Als Kontrolle diente Calcineurin-Variante mit intakter Phosphatase-Domäne. Die Phosphatase-Aktivität hatte keinen Einfluss auf die Zellgröße nach Stimulation mit Ang II. B) Gleiches Experiment wie in A), jedoch Cotransfektion der Zellen mit einem NFAT-Luciferase-Reporterkonstrukt (AdNP3Luci) als Readout für die NFAT-Aktivität.

Um die Bedeutung nukleären Calciums für Calcineurin zu ergründen, wurde eine Calcineurin-Isoform generiert, die eine nicht-funktionierende CnB-Bindedomäne besaß und auf eine Aktivierung durch Ca^{2+} nicht reagieren konnte (1-525+NLS Δ CnB; Abb. 7). Die Transfektionen isolierter adulten murinen Kardiomyozyten mit dem Konstrukt 1-525+NLS Δ CnB oder mit der Calcineurin-Isoform 1-525+NLS, zeigten eine Akkumulation von Calcineurin, das mit einer

zusätzlichen NLS versehen war, im Nukleus, unabhängig von der CnB-Bindung (1-525+NLS; Abb. 9 A) und die Unfähigkeit von Calcineurin mit defekter CnB-Bindedomäne, mit CnB zu interagieren (Abb. 9 B).

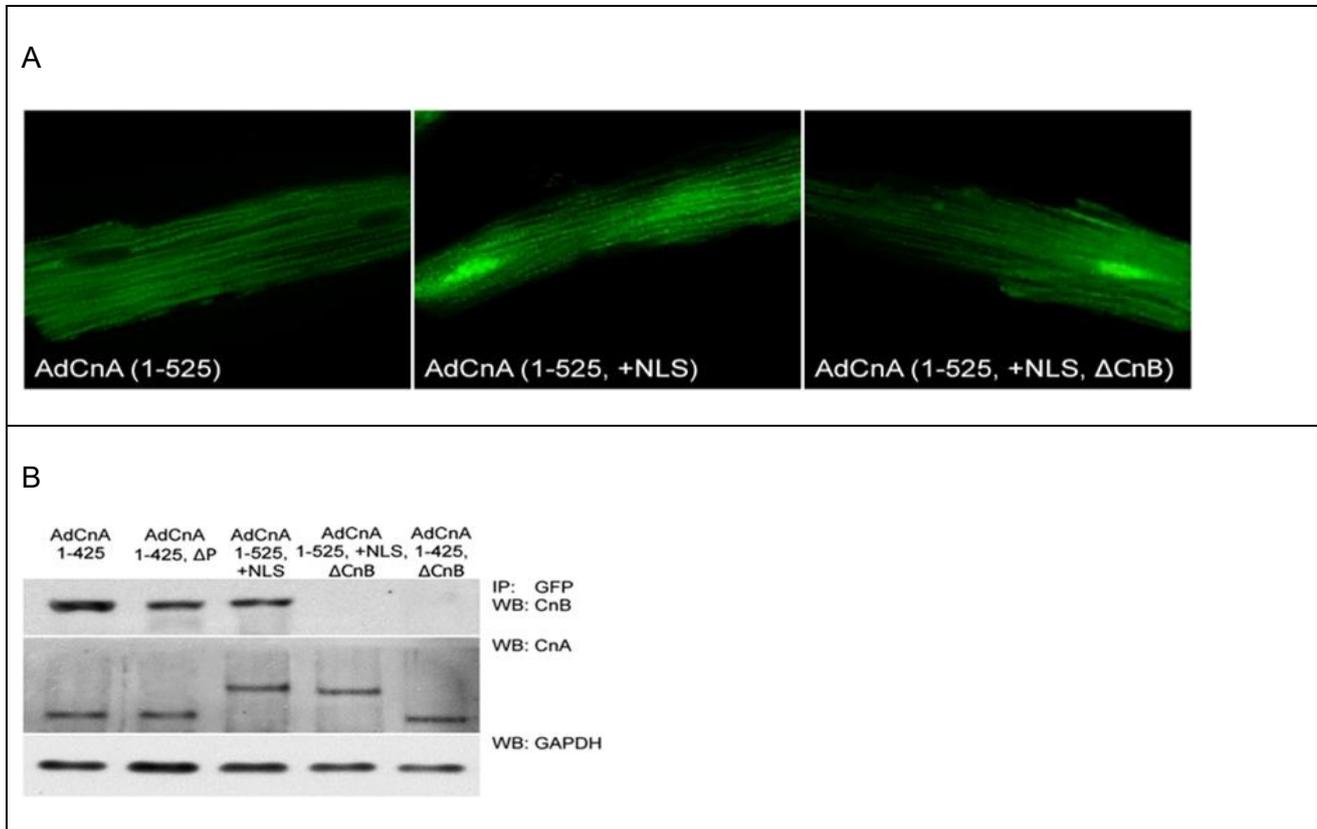


Abb. 9 Untersuchungen zur Bedeutung von nukleärem Calcium für Calcineurin.

A) Darstellung der Akkumulation nukleärer Calcineurin-Isoformen mit und ohne CnB-Bindedomäne im Zellkern von unstimulierten adulten murinen Kardiomyozyten. B) Ein Co-IP-Experiment (oberes Feld) zeigt, dass die Deletion der CnB-Bindestelle in CnA die Bindung von CnB effektiv verhinderte. Im mittleren Feld sind die verschiedenen Calcineurin-Isoformen im Western Blot dargestellt. Das untere Feld zeigt GAPDH als Ladekontrolle. Die CoIP wurde von M. Czolbe durchgeführt.

Nun wurde untersucht, ob nukleäres Calcineurin von Ca^{2+} abhängig ist. Dazu wurden adulte murine Kardiomyozyten mit einer CnA-Variante transfiziert, die auf eine Ca^{2+} -Aktivierung nicht reagieren konnte und durch die zusätzliche NLS im Zellkern akkumulierte (1-525+NLS Δ CnB, Abb. 9 A). Eine Ang II-Stimulation führte zum Anstieg des nukleären Ca^{2+} , die nur Calcineurin-Isoformen mit intakter CnB-Bindedomäne aktivieren und damit die NFAT-Aktivität erhöhen konnte – ausgelesen über ein NFAT-Luciferase-Konstrukt (Abb.10).

Ebenso konnte eine konstitutiv aktive CnA-Variante (1-425; Abb. 7) nur auf eine Erhöhung nukleären Ca^{2+} reagieren, wenn die CnB-Bindungsstelle intakt war und sich somit das Calcineurin-Heterodimer (CnA/CnB) konstituieren konnte (Abb. 10).

Um zu testen, ob IP_3 -Rezeptoren an der Kernmembran nukleärer Calcineurin aktivieren könnte, wurden diese durch die Zugabe von 2-APB inhibiert. Dies zeigte sich in einer Inhibierung des

Anstiegs der Luciferase-Aktivität und zeigte die Bedeutung der Ca^{2+} -Freisetzung durch $\text{IP}_3\text{R2}$ für die Calcineurin-Aktivität im Zellkern (Abb. 10).

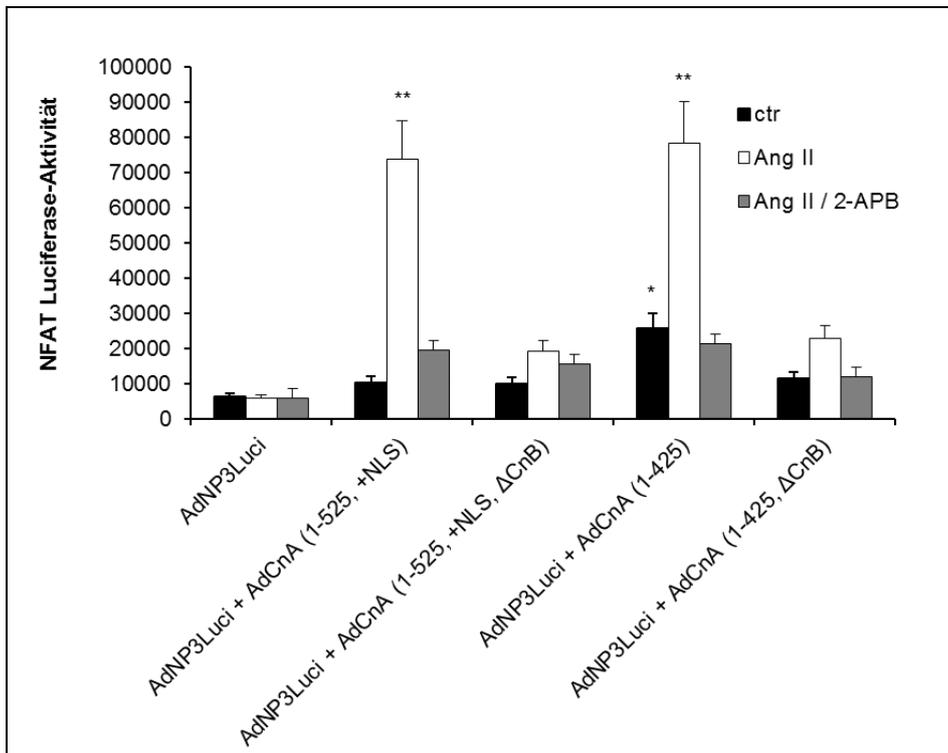


Abb. 10 Untersuchungen zur Funktion von Calcineurin im Zellkern.

Um zu testen, ob die Calcineurin/NFAT-Aktivität von nukleärem Ca^{2+} abhängig ist, wurde der Einfluss verschiedener CnA-Isoformen auf die Luciferase-Expression (AdNP3Luci) gemessen. Nur die CnA-Isoformen mit intakter CnB-Bindestelle (und damit auch der Fähigkeit, Ca^{2+} zu detektieren) konnten auf einen Anstieg des intranukleären Ca^{2+} nach Ang II-Stimulation ($2 \mu\text{M}$) reagieren. Eine Inhibierung des intranukleären Ca^{2+} durch 2-APB ($3 \mu\text{M}$) führte auch zur Blockierung der transkriptionellen Aktivität von NFAT.

6.2 Angiotensin II erhöht die Ca^{2+} -Konzentration im Zellkern

Die bisherigen Ergebnisse legten eine Rolle von Calcineurin als ein Sensor für Ca^{2+} im Nukleus und somit als ein wichtiger Vermittler kardialer Hypertrophie nahe. Daher wurde in der Folge untersucht, ob der Zellkern eine Mikrodomäne für Ca^{2+} darstellt. In früheren Arbeiten wurde bereits gezeigt, dass CnA in neonatalen Kardiomyozyten eine Hypertrophie nach IP_3 -vermittelter Ca^{2+} -Freisetzung aus der Kernmembran induzieren konnte [83]. Ein ähnlicher Mechanismus war zuvor schon für die Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (CaMKII) vorgeschlagen worden. Hier erfolgte eine IP_3 -abhängige Aktivierung durch Ca^{2+} im perinukleären Bereich von Kardiomyozyten [38].

Um zu bestätigen, dass Ca^{2+} in der Lage ist, lokal nukleäres CnA zu aktivieren, wurden ruhende (nicht elektrisch stimuliert), intakte murine Kardiomyozyten mit Ang II ($2 \mu\text{M}$) stimuliert und mit einem Konfokalmikroskop analysiert. Ein Anstieg des Ca^{2+} wurde sowohl im Zytosol als auch im Kern beobachtet. Allerdings war das Signal nach 10minütiger Stimulation im Kern signifikant stärker erhöht als im Zytosol (bei 10 min cyto $170 \pm 41 \text{ nM}$, $n=7$; nuc $209 \pm 41 \text{ nM}$, $n=7$) (Abb. 11 A und B).

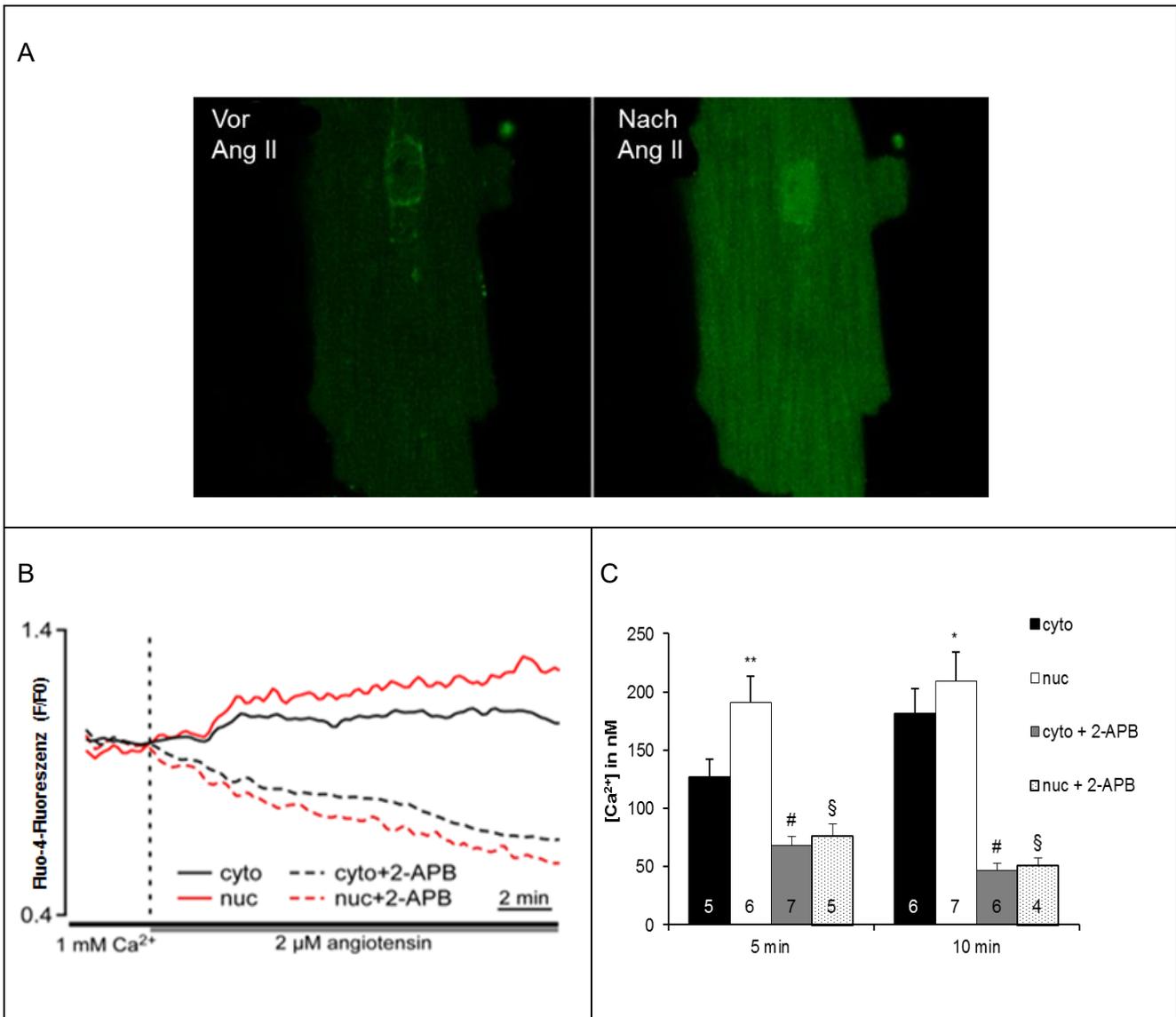


Abb. 11 Einfluss von Ang II auf die Ca²⁺-Konzentration im Kern adulter muriner Kardiomyozyten.

A) Konfokalmikroskopische Aufnahmen eines mit Fluo-4 gefärbten, murinen ventrikulären Kardiomyozyten vor und nach Stimulation mit Ang II. B) Original-Aufnahmen der [Ca²⁺]-Änderungen in ruhenden, intakten Kardiomyozyten nach Stimulation mit 2 μM Ang II, mit und ohne IP₃R-Blocker (2-APB, 3 μM) in Zytoplasma (schwarz) und Nukleus (rot). C) Mittelwerte der Ca²⁺ Konzentration nach Ang II Zugabe. Fluoreszenz-Werte wurden kalibriert zu [Ca²⁺] in nM. Amplituden wurden bei 5 und 10 min jeweils im Cytoplasma und Nukleus. *P<0,05 zum Cytoplasma, **P<0,01 zum Cytoplasma, #P<0,05 zum Cytoplasma ohne 2-APB und §P<0,01 zum Nukleus ohne 2-APB.

Ähnliche Ergebnisse wurden durch die Stimulation der Zellen mit IP₃-Estern erzielt (Abb. 12). Die Erhöhung des Fluoreszenz-Signals konnte jeweils durch die Zugabe von 2-APB (3 μM) gehemmt werden. Dies zeigt, dass Ang II einen Anstieg des IP₃-Spiegels induziert und IP₃ wiederum eine Erhöhung des intranukleären Ca²⁺-Levels zur Folge hat (Abb. 13 A-C).

Im nächsten Schritt wurden der zytosolische und nukleäre Ca²⁺-Spiegel unter chronischer Ang II-Stimulation untersucht. Diese führte zu einer Erhöhung der Ca²⁺-Spiegel in beiden Kompartimenten. Allerdings war – wie bei ruhenden Zellen – der Anstieg der Ca²⁺-Menge im Zellkern deutlich ausgeprägter, vor allem während der Diastole. Hier fiel der Ca²⁺-Spiegel nicht

unter 300 nM. Nach Beseitigung des Stimulus waren die Ca^{2+} -Schwankungen, sogenannte Transienten, in beiden Kompartimenten deutlich geringer (Abb. 14 A).

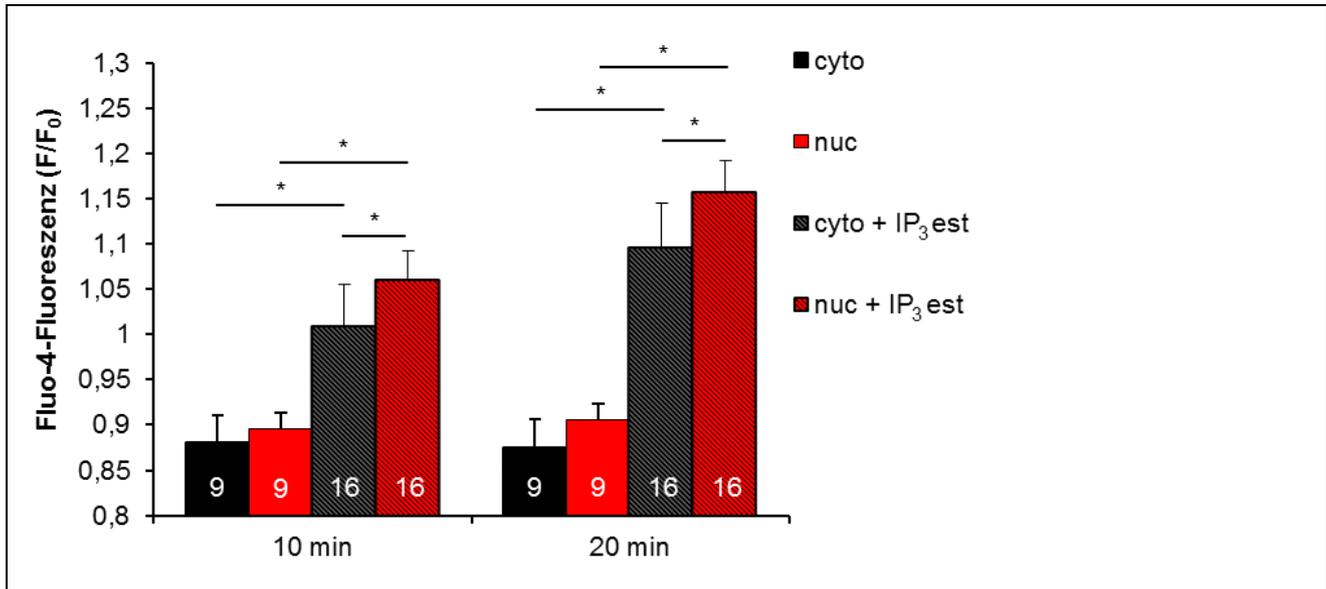


Abb. 12 Simultane konfokale Aufnahmen von zytoplasmatischen (cyto) und nukleären (nuc) Transienten in isolierten, ruhenden adulten Kardiomyozyten.

Die Mittelwerte für diastolisches $[\text{Ca}^{2+}]$ zeigen einen deutlichen Anstieg des ruhenden $[\text{Ca}^{2+}]$ im Kern nach Stimulation der Kardiomyozyten mit IP_3 -Estern. Die Messungen erfolgten bei 10 min und 20 min in Zytoplasma und Nukleus. * $p < 0,05$ zu Zytoplasma.

Um unsere Hypothese zu bestätigen, dass nukleäres Ca^{2+} hauptsächlich über den IP_3 -Rezeptor ($\text{IP}_3\text{R2}$) gesteuert wird, wurden transgene Mäuse mit einem konditionalen Funktionsverlust („loss-of-function“) für den IP_3R -Signalweg (IP_3 -Sponge-Mäuse) verwendet. Diese wurden mit Ang II stimuliert, anschließend die Herzen entnommen und dann die Ca^{2+} -Transienten innerhalb der Kompartimente gemessen. Die Wiederholung der vorherigen Versuche in IP_3 -Sponge-Mäusen zeigte ein signifikantes Defizit dieser Kardiomyozyten bei der Erhöhung des Ca^{2+} -Spiegels im Kern während der Diastole (Abb. 13 A-C).

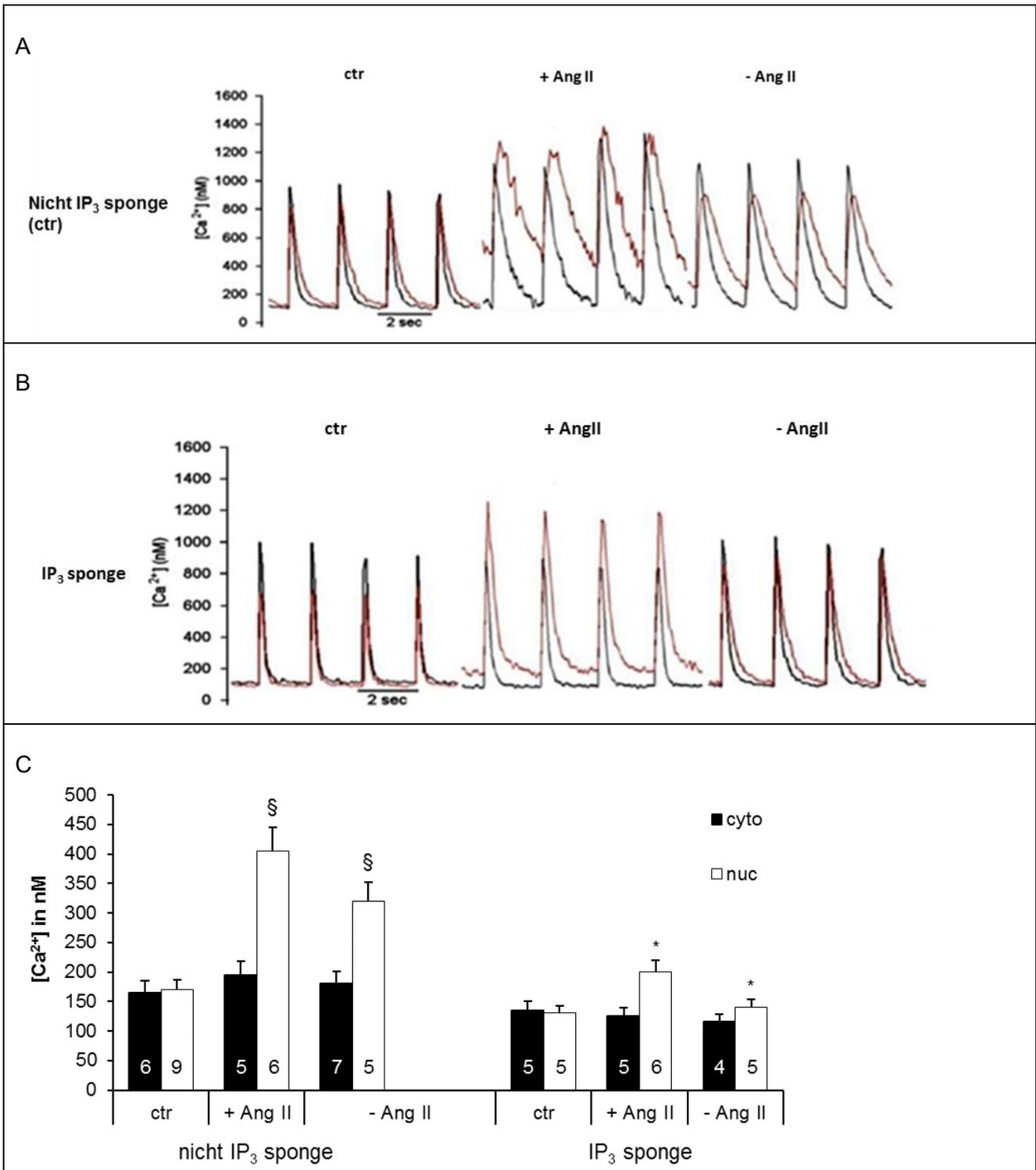


Abb. 13 Wirkung von Angiotensin II auf nukleäres Ca²⁺ und cytoplasmatisches Ca²⁺.

Zytosolische und nukleäre Ca²⁺-Transienten wurden in isolierten, adulten Kardiomyozyten aus ungestressten Maus-Herzen (ctr), nach 4 Wochen Ang II-Stimulation (+ Ang II) und nach 4 Wochen Ang II-Stimulation mit weiteren 4 Wochen Erholungsphase (- Ang II) gemessen. A) zeigt Original-Aufnahmen von Ca²⁺-Transienten nicht IP₃-Sponge-Mäusen B) zeigt IP₃-Sponge-Mäuse mit gestörtem IP₃-Signalling. Die chronische Gabe von Ang II führt zu einer anhaltenden Zunahme nukleärer Ca²⁺-Transienten während der Diastole. C) Diastolische Ca²⁺-Konzentrationen (in nM) aus den oben genannten Gruppen. Die funktionelle Deletion des IP₃-Signalwegs (Induktion von IP₃-Sponge) blockierte die Ang II-vermittelte Zunahme von nukleärem Ca²⁺. *p<0,01 zu der entsprechenden Gruppe bei den nicht IP₃-Sponge-Tieren, § p<0,01 zur ctr-Gruppe. Die Zahlen innerhalb der Säulen stehen für die Anzahl der gemessenen Zellen. Die Ermittlung nMolarer Ca²⁺-Konzentrationen aus Ca²⁺-Transienten wurde von L. Seidlmayer durchgeführt.

Folglich wurden die pathophysiologischen Folgen einer anhaltenden Erhöhung des Ca^{2+} -Spiegels im Nukleus auf den Calcineurin- und den CaMKII-Signalweg analysiert. Hierfür wurden die transkriptionelle NFAT-Aktivität und die Phosphorylierung nukleärer CaMKII untersucht. Um die NFAT-Aktivität bestimmen zu können, wurden NFAT-Luciferase-Mäuse mit IP_3 -Sponge-Mäusen gekreuzt und die Aktivierung des Calcineurin/NFAT-Signalwegs während und nach Ang II-Stimulierung quantifiziert. Wie erwartet, war die NFAT-Aktivität in nicht IP_3 -Sponge-Mäusen erhöht, bei IP_3 -Sponge-Mäusen aber auch erhöht (Abb. 14 A). Im Gegensatz dazu stieg die nukleäre Phosphorylierung der CaMKII nur während der Ang II-Stimulation an und reduzierte sich schnell nach Beseitigung des Stimulus (Abb. 14 B und C). Diese Ergebnisse zeigen, dass Calcineurin auf nukleäre Ca^{2+} -Veränderungen empfindlicher reagiert als die CaMKII.

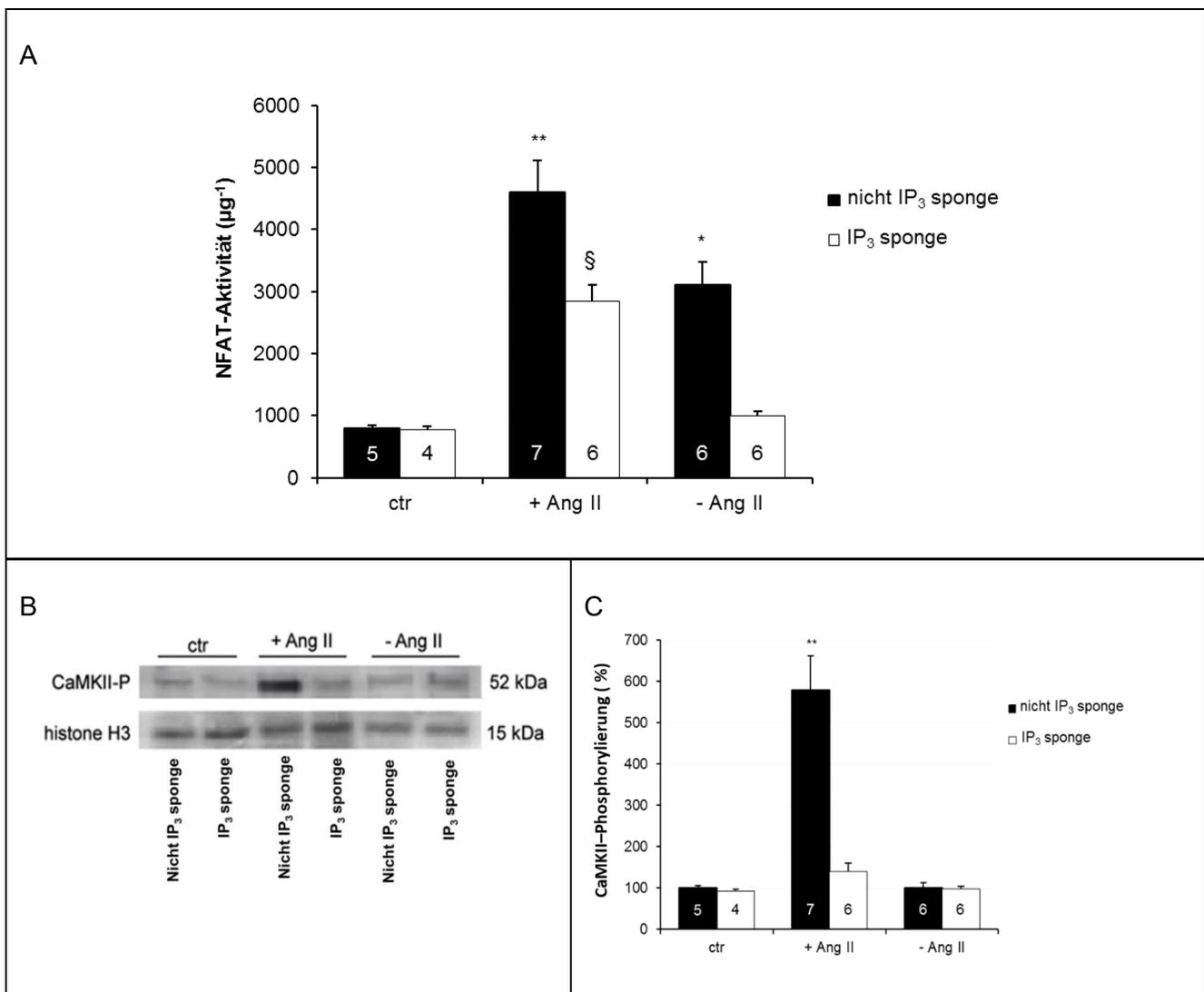


Abb. 14 Einfluss nukleären Ca^{2+} auf den Calcineurin/NFAT-Signalweg im Vergleich zur CaMKII.

A) Die Aktivität des Calcineurin/NFAT-Signalwegs war in Tieren mit funktionierendem IP_3 -Signaling während und nach einer Ang II-Stimulation signifikant erhöht. Ein deutlich geringerer Effekt zeigte sich in IP_3 -Sponge-Mäusen. B) Repräsentativer Western Blot von phosphoryliertes CaMKII. Histon H3 diente als Ladekontrolle für den Nukleus. Im Kontrast dazu war die Phosphorylierung der CaMKII im WB während der Ang II-Stimulation erhöht und erreichte nach Entfernung des Stimulus schnell wieder den Basalwert. C) Inhibierung des IP_3 -Rezeptors in IP_3 Sponge-Mäusen verhinderte diesen Effekt. Die Nummern in den Säulen zeigen die Anzahl an Mäuse pro Gruppe.

6.3 Nukleäre IP₃R2- Expression *in vivo*

Als Nächstes wurde die Expression von IP₃R2 in isolierten Zellkernen untersucht. Es war eine signifikante Erhöhung der IP₃R2-Expression in der Kernmembran von Mäusen unter chronischer Ang II-Stimulation (277 ± 17 %; $n=6$; $p<0,01$) und 3 Wochen nach Entfernung des Stimulus (234 ± 18 %; $n=6$; $p<0,01$) nachweisbar (Abb. 15 A-C).

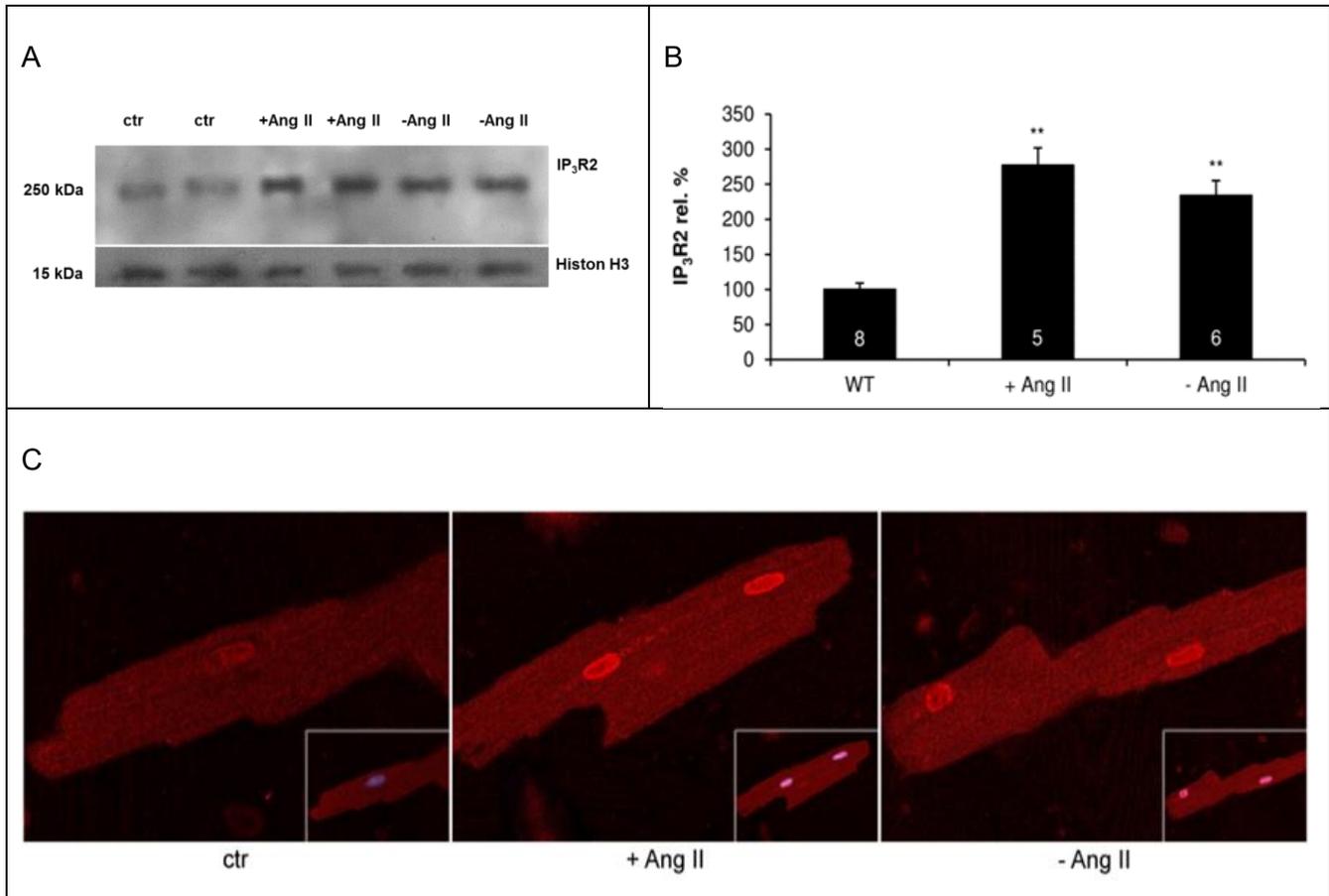


Abb. 15 Untersuchung der nukleären IP₃R2 Expression *in vivo*.

A) + B) Repräsentativer Western Blot von Kernextrakten mit einem α -IP₃R2-Antikörper und Quantifizierung von nukleärem IP₃R2. Die chronische Stimulation von WT-Mäusen mit Ang II (+ Ang II) erhöhte die nukleäre IP₃R2-Expression. Der Anstieg ließ sich auch 3 Wochen nach Entfernung des Ang II (- Ang II) noch nachweisen. Als Ladekontrolle diente Histone H3 verwendet. C) Immunfluoreszenz-Färbung von IP₃R2 in isolierten adulten Kardiomyozyten aus WT-Mäusen (ctr), Mäusen mit chronischer Ang II-Stimulation und Mäusen, deren Ang II-Stimulation 3 Wochen zuvor beendet worden war (- Ang II). Die IP₃R2-Anreicherung bestand auch nach Entfernung des Stimulus fort. Die eingefügten Bilder stellen Kernfärbungen mit DAPI dar. Die Isolierung der Nuclei und Quantifizierung von nucleärem IP₃R2 erfolgte durch M. Czolbe.

Außerdem konnte gezeigt werden, dass die IP₃R2-Expression stark von einer NFAT-Consensus-Stelle innerhalb der Promotor-Region bei 633 aufwärts des ATGs abhängig ist (Abb. 16 A und B.) Die Co-Transduktion mit einem konstitutiv aktiven CnA (AdCnA(1-415)) oder die Ang II-Stimulation von Kardiomyozyten, die mit einem IP₃R2-Luciferase-Konstrukt (AdIP₃R2-Luc) transduziert waren, erhöhte die Aktivität des IP₃R2-Promotors. Eine Mutation innerhalb der NFAT-Consensus-Stelle führte dagegen zu einer verminderten Aktivität des IP₃R2-Promotors (Abb. 17 A). Diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass eine Stimulation des IP₃R2 in adulten ventrikulären

Kardiomyozyten zu einem Anstieg des nukleären Ca^{2+} führt. Diese Erhöhung (besonders während der Diastole) ist wiederum ausreichend, um nukleäres Calcineurin zu aktivieren.

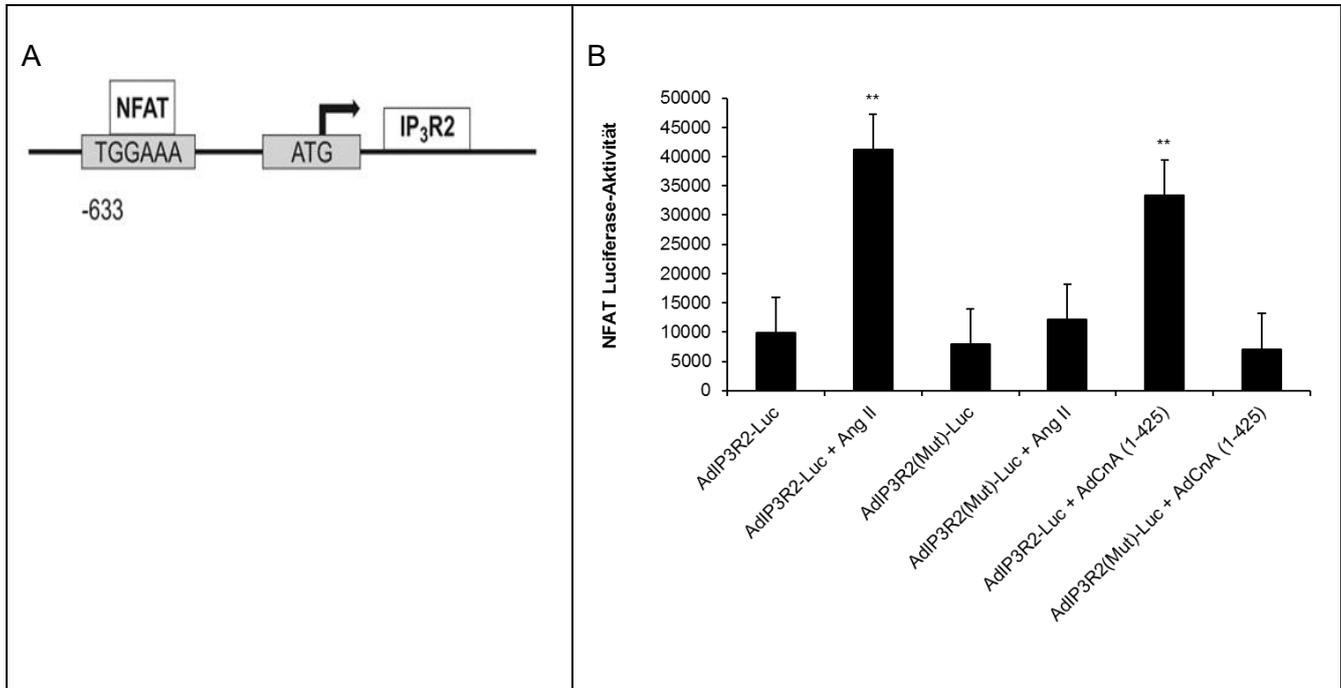


Abb. 16 Untersuchung der nukleären IP₃R2 Expression *in vivo*.

A) Schematische Darstellung des IP₃R2-Promotors. Eine NFAT Consensus-Sequenz ist bei -633 aufwärts vom Startcodon vorhanden. B) Promotorstudien mit einem IP₃R2-Promotor-Luciferase-Plasmid bewiesen, dass die IP₃R2-Expression abhängig vom Calcineurin/NFAT-Signalweg ist.

6.4 Peptidoptimierung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde auch die Optimierung eines Peptides (Import Blocking Peptide, (IBP)) zur Blockierung des Calcineurin/ NFAT-Signalwegs durchgeführt.

6.4.1 Lösung von IBP in verschiedenen Lösungsmitteln (*In vitro*)

Um die Aufnahme des Import Blocking Peptide (IBP) *in vitro* in Kardiomyozyten und danach *in vivo* zu verbessern, wurde ein organisches Lösungsmittel gesucht, das die Hydrophobizität von IBP verringert. Als potentielle Lösungsmittel wurden Kollidon 25®, Kolliphor HS15, Cyclodextrin, Lecithin und Polyoxyethanyl- α -tocopherylsebacat (PTS) getestet. IBP wurde zunächst in DMSO aufgenommen und dann in den verschiedenen Lösungsmitteln weitergelöst.

In 5% PTS und Kollidon 25® löste sich IBP am besten (Abb. 17). PTS ist ein sogenanntes nicht-anionisches Amphiphil, das 25 nm-Mizellen in Wasser bei RT bildet (Lipshutz and Abela 2008). Während Kollidon 25® ein synthetisches Hilfsmittel der Familie der Polyvinylpyrrolidone (Povidone) ist, das bereits in der pharmazeutischen und kosmetischen Industrie verschiedene Anwendungen hat (Volker Bühler, 2008; R. Vieweg 1971). Bei beide Lösungsmitteln fand eine homogene Verteilung des Peptids im Medium ohne Klumpenbildung statt. Wobei PTS das bessere

Lösungsmittel war. Da Kollidon 25 ® bereits als pharmazeutischer Hilfsstoff zugelassen ist, haben wir uns für die weitere Verwendung dieses Lösungsmittel entschieden.

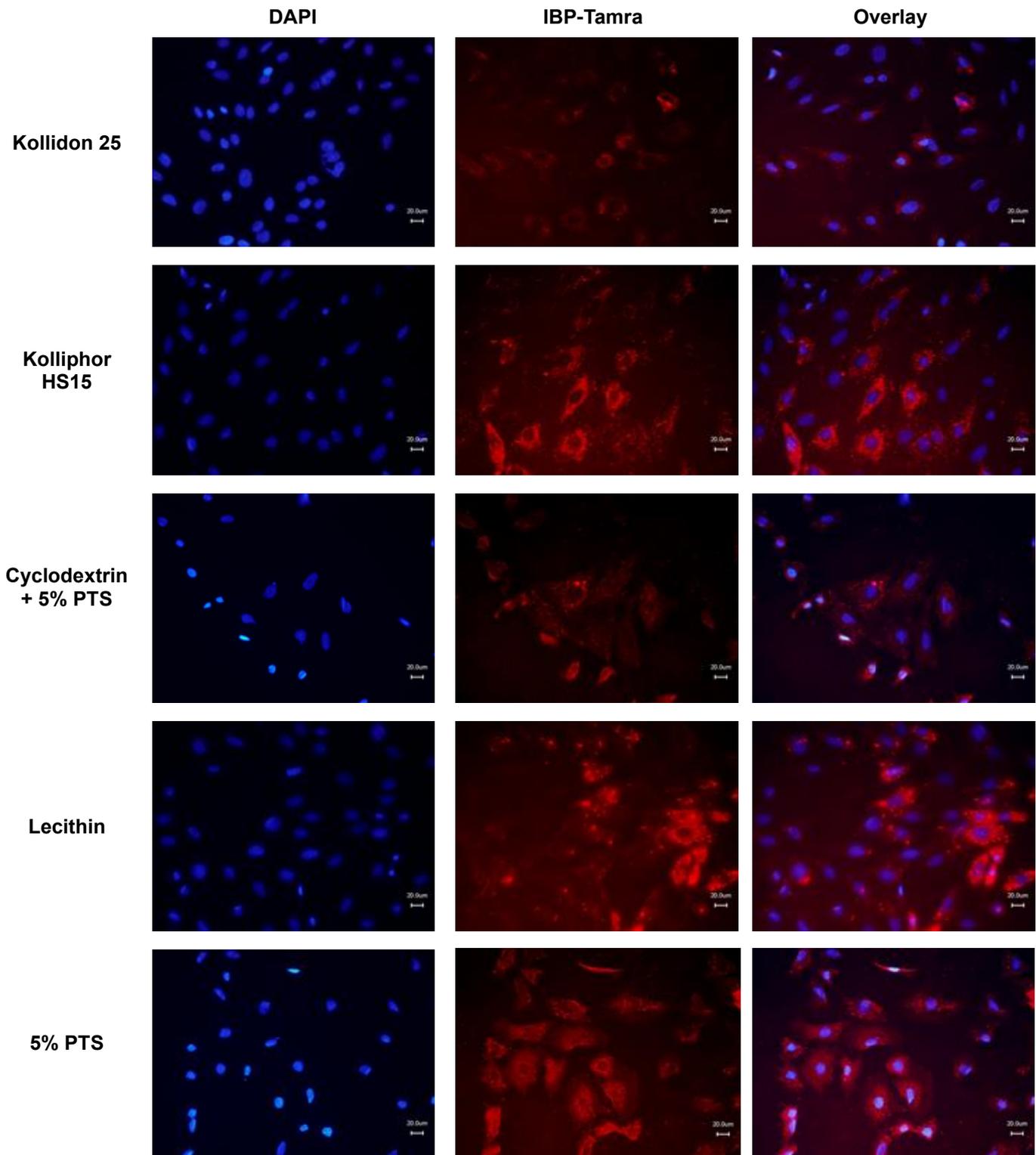


Abb. 17 Verteilung von IBP in verschiedenen Lösungsmitteln.

IBP löste sich am besten in 5%iger PTS-Lösung und Kollidon 25 ©. Die linke Spalte zeigt die Kernfärbung mit DAPI (blau), die mittlere Spalte zeigt, die mit IBP-Tamra beladenen Zellen und die rechte Spalte zeigt einen Overlay beider Kanäle.

6.4.2 Modifikationen des Peptids

Als nächstes wurden Modifikationen an der IBP-Sequenz (s. Tab. 1) *in vitro* in Ratten-Kardiomyozyten angewendet, um die Stabilität anhand unterschiedlicher Aminosäuren zu testen (Abb. 18). Neonatale Rattenkardiomyozyten wurden adenoviral mit einem Calcineurin-Konstrukt (AdCnA1-525) transduziert. Nach einer vierstündigen Inkubation wurden die Zellen mit den verschiedenen IBP-Varianten (1 μ M) versetzt und ü. N. inkubiert. Um die Translokation von Calcineurin in den Zellkern zu induzieren, wurden die Zellen am nächsten Tag mit Ang II (10 μ M) als Hypertrophie-Reiz stimuliert. Nach 4 Stunden erfolgte die Analyse der Zellen unter einem Fluoreszenzmikroskop. Eine Überexpression von Calcineurin in den Kardiomyozyten durch das adenovirale Konstrukt wurde in 95 % der Zellen beobachtet. Die Zugabe von Ang II führte beim überwiegenden Teil der Zellen zu einer Translokation von Calcineurin in den Zellkern.

Nach der Behandlung der Kardiomyozyten mit IBP 1 und 5 wurde Calcineurin in 60 % der Zellkerne beobachtet. Zellen, die mit den Peptidvarianten IBP 3 und IBP 4 inkubiert worden waren, zeigten zu 80 % eine zytoplasmatische Calcineurin-Lokalisierung, nur 20 % der Kerne enthielten Calcineurin. Somit wurde der Calcineurin/NFAT-Signalweg erfolgreich blockiert (Abb.18).

Name	MPS	codierende Sequenz	Modifikationen
IBP 1	AAVALLPAVLLALLA	KQECKIKYSERV	Originalsequenz
IBP 3	AAVALLPAVLLALLA	KQEXKIKYSERV	α -Aminobuttersäure gegen Cystein
IBP 4	AAVALLPAVLLALLA	KQECKIKYAERV	Alanin gegen Serin
IBP 5	AAVALLPAVLLALLA	KQEXKIKYAERV	α -Aminobuttersäure gegen Cystein und Alanin gegen Serin
IBP 1-Tamra	AAVALLPAVLLALLA	KQECKIKYSERV	Originalsequenz + TAMRA
IBP 3 -TAMRA	AAVALLPAVLLALLA	KQEXKIKYSERV	α -Aminobuttersäure gegen Cystein + TAMRA
IBP 4 -TAMRA	AAVALLPAVLLALLA	KQECKIKYAERV	Alanin gegen Serin + TAMRA
IBP 5-TAMRA	AAVALLPAVLLALLA	KQEXKIKYAERV	α -Aminobuttersäure gegen Cystein und Alanin gegen Serin + TAMRA

Tab. 1 Modifikationen des ursprünglichen Peptids (IBP 1). Bei IBP 3 und 4 wurde jeweils eine Aminosäure innerhalb der kodierenden Sequenz ausgetauscht, bei IBP 5 erfolgten 2 Substitutionen. Für die Visualisierung und Lokalisierung der Peptide in Zellen und im Körper, wurde TAMRA als Fluoreszenzmarker verwendet.

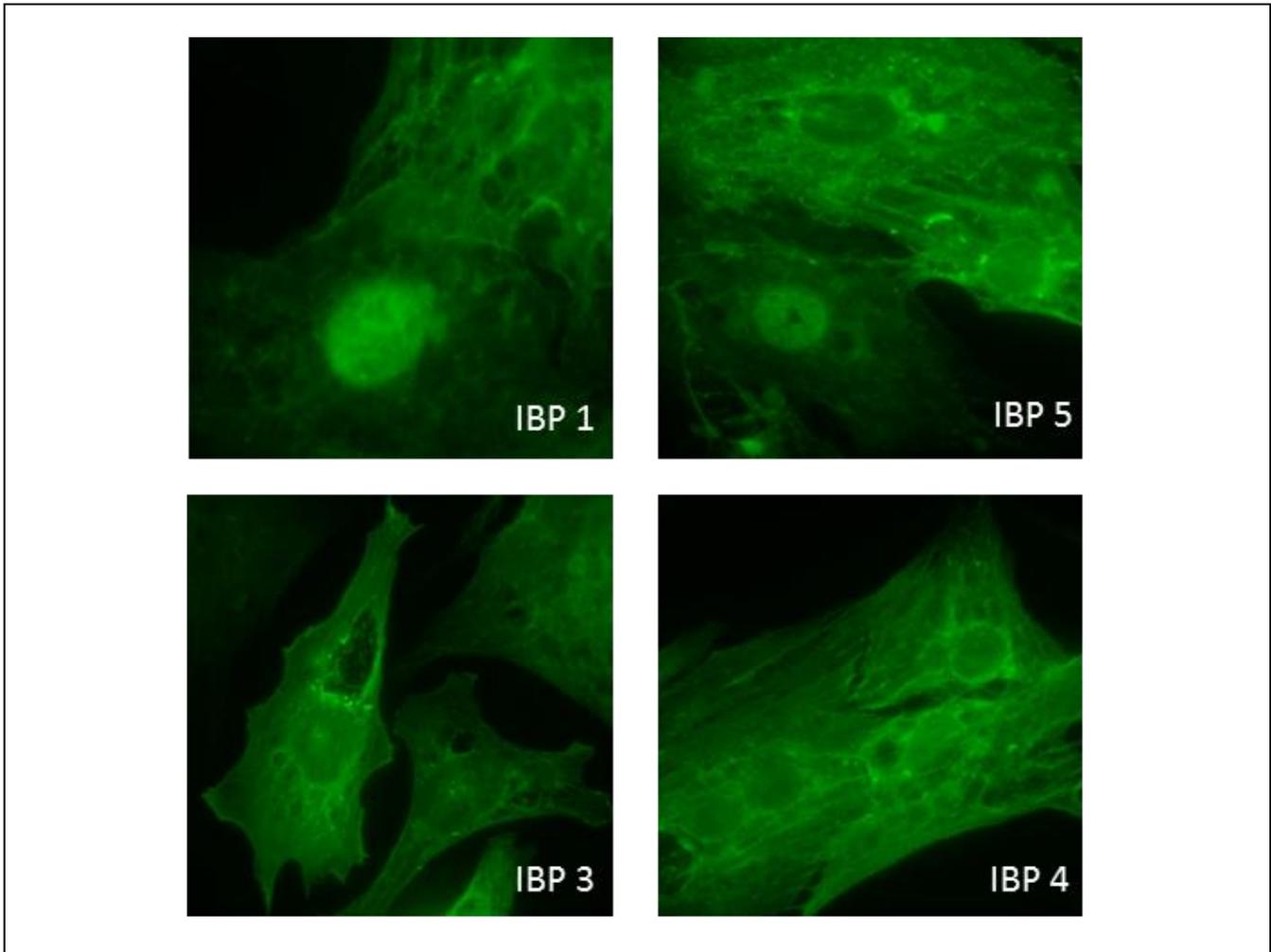


Abb. 18 Einfluss verschiedener IBP-Varianten auf den Kern-Import von Calcineurin.

Die Isoformen IBP 1 und IBP 5 verhinderten den Import von Calcineurin in den Zellkern nur in 60 % der Kardiomyozyten. Die Varianten IBP 3 und IBP 4 wiesen einen besseren Effekt auf – hier wurde Calcineurin überwiegend (90 %) im Zytoplasma gefunden.

6.4.3 Einfluss von IBP auf die NFAT-Aktivität

Um die Peptidvarianten weiter zu testen und die bereits vorliegenden Ergebnisse zu unterstützen, wurde die Wirkung der verschiedenen IBPs auf die Aktivierung von NFAT in einem Luciferase-Assay untersucht. Dafür wurden murine neonatale Kardiomyozyten mit einem adenoviralen Luciferase-Konstrukt (AdNP3Luci) transduziert, das einen NFAT-abhängigen Promotor enthielt. Die gleichzeitige Überexpression von Calcineurin (AdCnA1-525) und zusätzliche Gabe von Ang II (10 μ M) führte zu einem signifikanten Anstieg der NFAT-Aktivität um 331 % (Ang II, Abb. 20). Erneut zeigte IBP 3 einen niedrigen Effekt auf die NFAT-Aktivität. Durch die Applikation von IBP 4 wurde die NFAT-Aktivität noch stärker gehemmt, so dass es keinen signifikanten Unterschied zwischen den Kontrollzellen (ctr) und den mit IBP 4 behandelten Zellen mehr gab. IBP 4 reduzierte die transkriptionelle Aktivität von NFAT um die Hälfte.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde IBP 4 als geeigneter Kandidat für die weiteren Arbeiten gewählt.

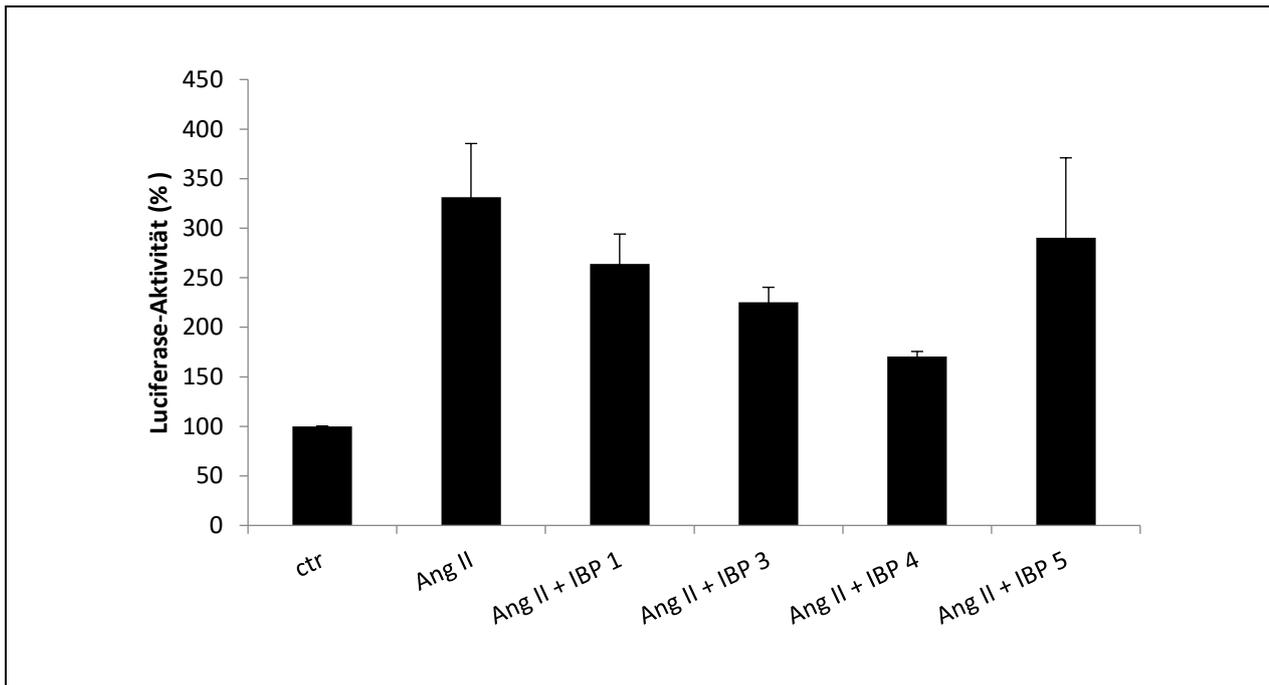


Abb. 19 Der Einfluss von IBP auf die NFAT-Aktivität in neonatalen Ratten-Kardiomyozyten.

Die Aktivität von NFAT als Transkriptionsfaktor wurde mittels Luciferase Assay gemessen. Bei der Zugabe von Ang II war die NFAT-Aktivität stark erhöht. Dieser Effekt ließ sich durch die Applikation von IBP 3 schon unterdrücken, durch Verwendung von IBP 4 jedoch deutlich unterdrücken.

6.5 Verteilung von IBP im Körper und Ausscheidung

Um zu testen, wie schnell IBP metabolisiert wird und auf welchem Weg die Ausscheidung erfolgt, wurden FVB-Mäusen IBP 4 (25 mg/kg) intraperitoneal injiziert. Zum Nachweis der Peptide im Körper wurden TAMRA-gekoppelte IBP-Varianten verwendet. Als Kontrolle wurde nur der Farbstoff (TAMRA in 0,9% NaCl-Lösung) intraperitoneal injiziert. Die Mäuse wurden einzeln in metabolische Käfige gesetzt, um den Urin sammeln und jeden Tag entnehmen zu können. Nach 5 Tagen wurde die Fluoreszenz des Farbstoffes im Urin mittels IVIS Spektralphotometer gemessen. Bei der Zugabe von IBP 4 wurde nach 48 Stunden die höchste Ausscheidung 570 µg/ml) gemessen. Danach erfolgte eine langsamere Ausscheidung von IBP 4, das noch nach 168 Tage nachweisbar war. Dieses Ergebnis zeigt, dass die Ausscheidung des Peptids aus dem Blutkreislauf hauptsächlich über die Nieren und den Urin erfolgt. Die Untersuchung in anderen Organen nach IBP 4 zeigte auch eine Akkumulation von beiden IBP-Varianten im Herz (Abb. 20, C)

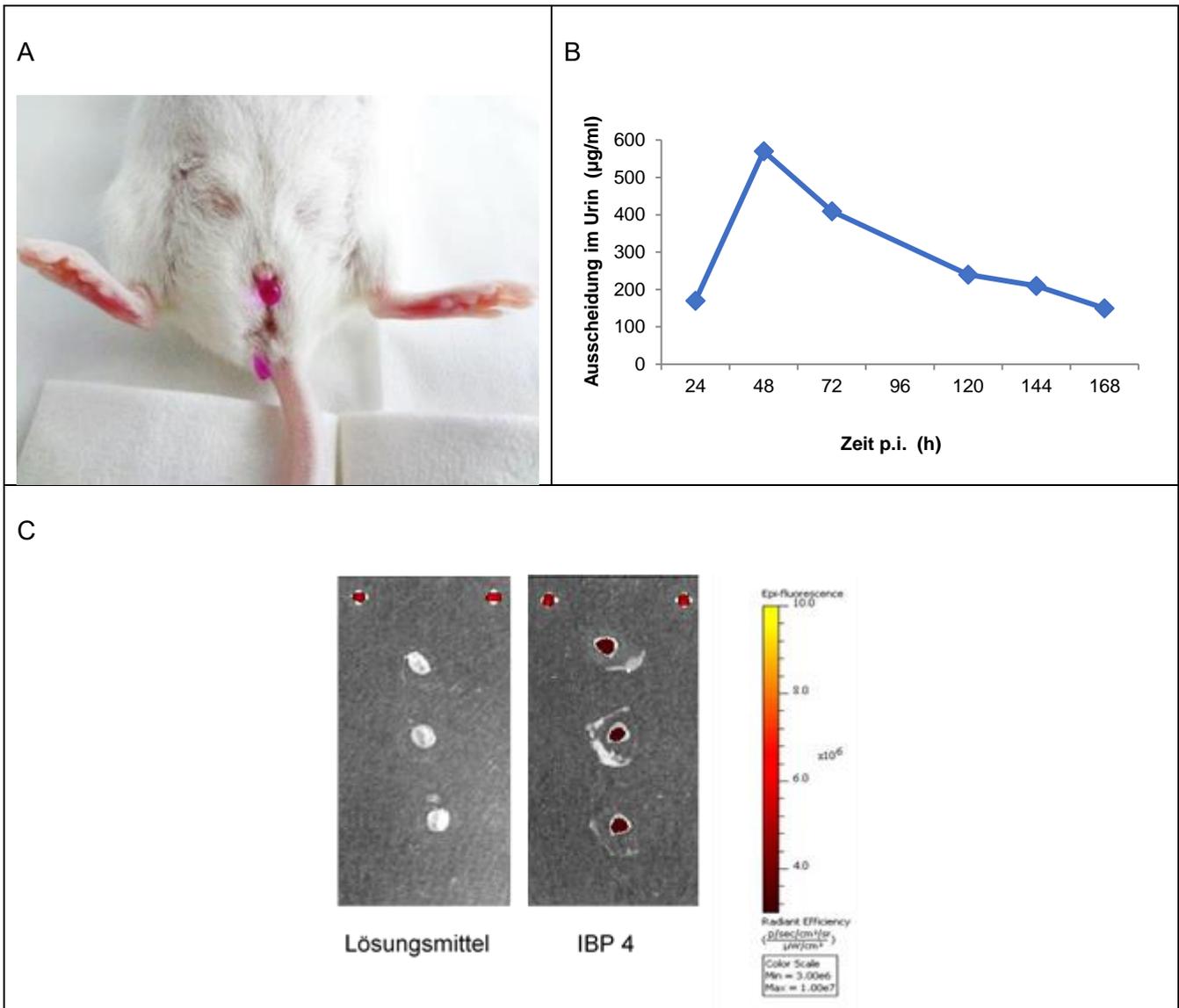


Abb. 20 Ausscheidung von IBP im Urin von FVB-Mäusen nach Einmal-Gabe.

A) Ausscheidung von TAMRA-IBP 4 über den Urin (FVB-Maus). B) Ausscheidungskurve von IBP 4 nach 24, 48, 72, 96, 120, 144 und 168 Stunden. C) Anreicherung von TAMRA-IBP 4 in Querschnitten in den Mäuse-Herzen nach Einmal-Gabe. Die Verabreichung von IBP 4 an die Mäuse wurde mit Hilfe von M. Mühlfelder durchgeführt.

6.6 Dosis-Optimierung für IBP 4 *in vivo*

Als nächstes wurde die zu verwendende Dosis von IBP 4 *in vivo* optimiert. In früheren Versuchsreihen war mit einer IBP-Dosis von 25 mg/kg/Woche gearbeitet worden. Dieser Wert sollte soweit wie möglich gesenkt werden – bei intakter Wirkung von IBP auf den Calcineurin/NFAT-Signalweg unter Hypertrophie-Bedingungen. Dafür bekamen 12 Wochen alte FVB-Mäuse Ang II-Pumpen bzw. NaCl-Pumpen (als Kontrolle) implantiert, die über einen Zeitraum von 4 Wochen Ang II bzw. NaCl entsprechend, die 2 mg/kg pro Tag freisetzen. Zusätzlich wurden die Mäuse jeweils mit IBP 4 in den Dosen 5 mg/kg/Woche, 10 mg/kg/Woche, 20 mg/kg/Woche oder 0 mg/kg/Woche (nicht) behandelt. Die Implantation der osmotischen Pumpen wurde von P. Arias durchgeführt. Auch wurde die Verabreichung von IBP und die darauffolgende Organentnahme wurde von ihr unterstützt.

Um den Einfluss von IBP 4 auf die Hypertrophie-Entwicklung zu bestimmen, wurden das Verhältnis von Herzgewicht zu Körpergewicht, der Kardiomyozytendurchmesser, die Translokation von Calcineurin in den Zellkern und die Expression von ANP und BNP auf transkriptioneller Ebene als Hypertrophie Marker in qRT-PCRs untersucht.

Das Verhältnis von Herzgewicht zu Körpergewicht stieg von $3,5 \pm 0,06$ (ctr) auf $5,8 \pm 0,28$ bei der Zugabe von Ang II an (Ang II). Bei 5 mg/kg/d wurde ein Verhältnis von $4,7 \pm 0$ und 10 mg/kg/Woche wurde ein Verhältnis von $4,6 \pm 0$ Herzensgewicht/Körpergewichtsverhältnisses verzeichnet (Abb. 21). Das beste Ergebnis erzielte erwartungsgemäß die Dosis 20 mg/kg/d mit einem Verhältnis von $4,3 \pm 0,13$.

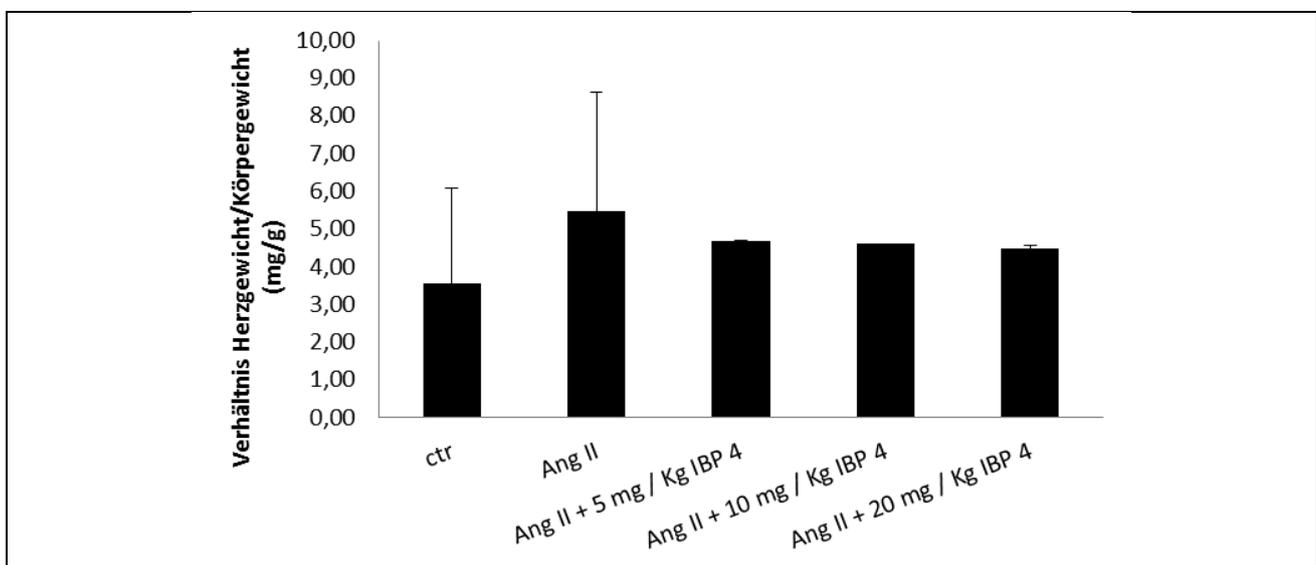


Abb. 21 Der Einfluss der IBP-Dosis auf das Herzgewicht und den Kardiomyozytendurchmesser Angiotensin II-stimulierter Mäuse.

Kardiomyozytengröße (in μm^2), bestimmt über den Zellumfang.

Die Untersuchung des Kardiomyozytendurchmessers bei Ang II-stimulierten Mäuse ergab einen Mittelwert von $381 \mu\text{m}^2 \pm 12$. Durch die Behandlung mit IBP 4 in der Dosis 20 mg/kg/d wurde eine Verminderung auf die Hälfte des Kardiomyozytendurchmessers ($175 \mu\text{m}^2 \pm 39$) im Vergleich zu unbehandelten Tieren ($137 \mu\text{m}^2 \pm 13$) gemessen. Dieser war somit vergleichbar mit dem unstimulierter Mäuse (NaCl). Mit einer Dosis von 5 mg/kg/d wurde nur eine leichtere Verminderung des Zelldurchmessers erreicht ($333 \mu\text{m}^2 \pm 43$) (Abb.22).

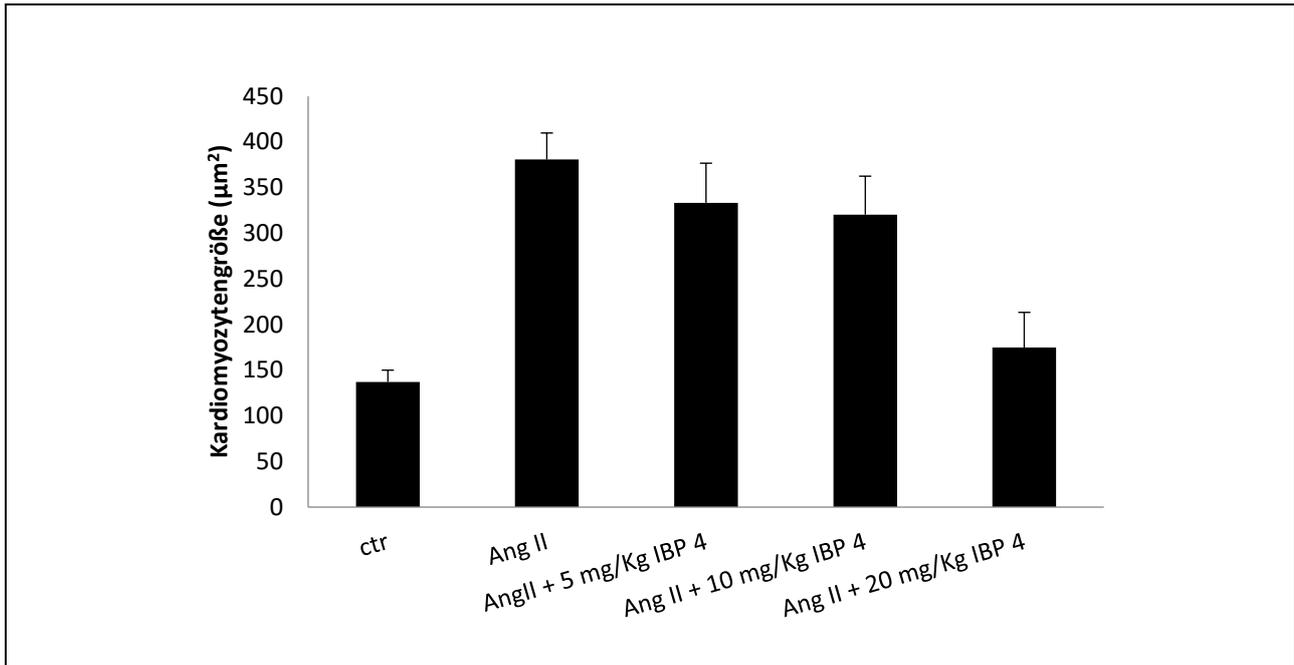


Abb. 22 Der Einfluss der IBP-Dosis auf das Herzgewicht und den Kardiomyozytendurchmesser Angiotensin II-stimulierter Mäuse.

Kardiomyozytengröße (in µm²), bestimmt über den Zellumfang.

Als nächstes wurde in Gewebeproben des ventrikulären Myokards die Translokation von Calcineurin in den Zellkern untersucht. Wie erwartet, war der stärkste Effekt bei 20 mg/kg/d IBP 4 nachweisbar, jedoch führte auch die Dosis von 10 mg/kg/d bereits zu einer signifikanten Blockade der Calcineurin-Translokation (Abb. 23).

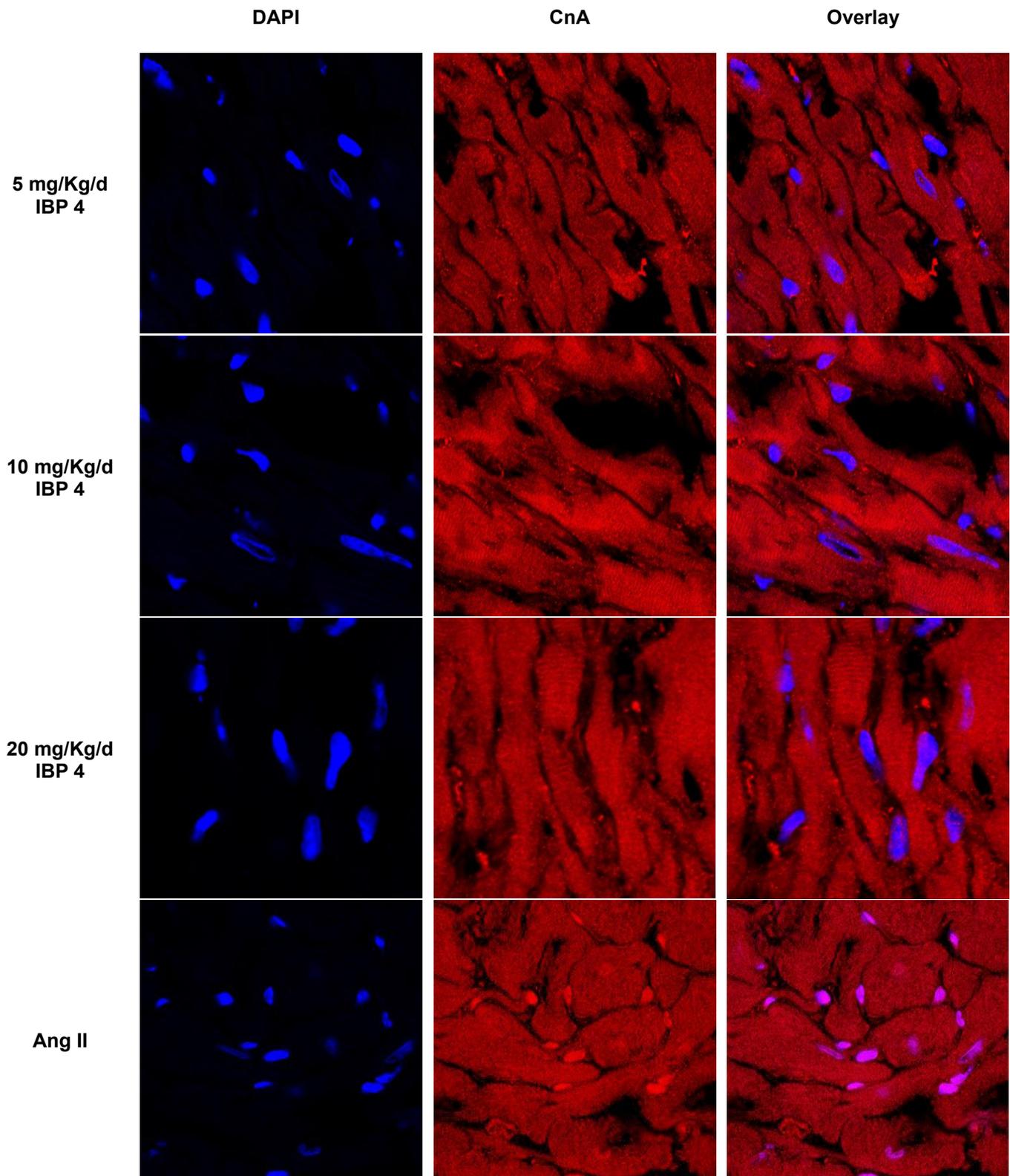


Abb. 23 IBP 4 verhinderte *in vivo* die Translokation von Calcineurin in den Zellkern.

Immunhistochemische Färbung eines Ventrikel-Querschnitts Angiotensin II-stimulierter Mäuse (10 μ M) ohne und mit IBP-Behandlung in unterschiedlichen Dosen (5/10/20 mg/kg/d). Durch den Ang II-Stress transloziert Calcineurin in den Zellkern. Nach Zugabe von IBP 4 in den Dosen 10 mg/kg/d und 20 mg/kg/d konnte kaum noch Calcineurin im Zellkern nachgewiesen werden. Es wurde ein Antikörper gegen Calcineurin verwendet (rot), die Zellkerne sind mit DAPI gefärbt (blau).

Bei der Expression sowohl von ANP als auch von BNP kam es, wie vorher bereits gezeigt, durch die Zugabe von Ang II als Hypertrophie-Stimulus zu einem starken Anstieg der Aktivität. Bei ANP kam es zu einer Verdopplung der Expression im Vergleich zur Kontrolle (Zugabe von NaCl). Diese Steigerung konnte – in Abhängigkeit von der applizierten Dosis – durch die Zugabe von IBP 4 unterdrückt werden. Auch hier zeigte die mittlere Dosis bereits einen ausreichend starken Effekt; die stärkste Wirkung erzielte erneut die Gabe von 20 mg/kg/d IBP 4, sowohl auf transkriptioneller Ebene (Abb. 24) als auch auf Proteinebene (Abb. 25).

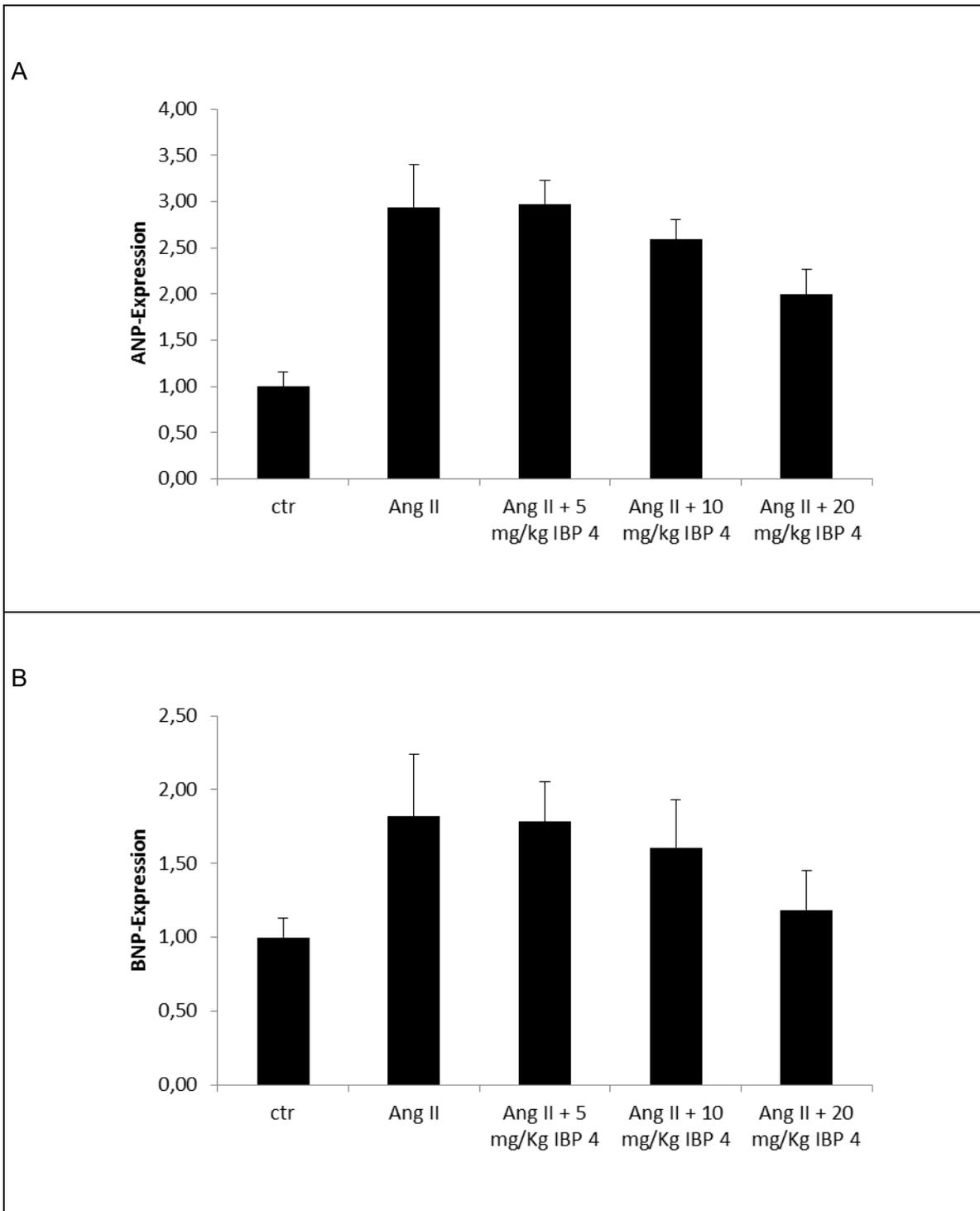


Abb. 24 IBP 4 verringerte die Expression der Hypertrophiemarker ANP und BNP auf transkriptioneller Ebene.

qRT-PCR von cDNA aus Ventrikeln unstimulierter, mit Ang II stimulierter und zusätzlich mit IBP behandelter Mäuse. Als Sonden wurden ANP und BNP verwendet, zur Normalisierung diente eine GAPDH-Sonde. Bei Ang II-stimulierten Mäusen wurde eine dreifach gesteigerte ANP-Expression im Vergleich zu unstimulierten Mäusen gemessen. Dieser Effekt wurde nach Zugabe von 10 mg/kg/d IBP 4 deutlich verringert. Die BNP-Expression verdoppelte sich bei Ang II-stimulierten Mäusen im Vergleich zu unstimulierten Tieren. Dieser Effekt wurde durch die Behandlung mit IBP 4 wiederum verringert, wobei nur die Konzentrationen 10 mg/kg/d und 20 mg/kg/d eine signifikante Reduktion zur Folge hatten.

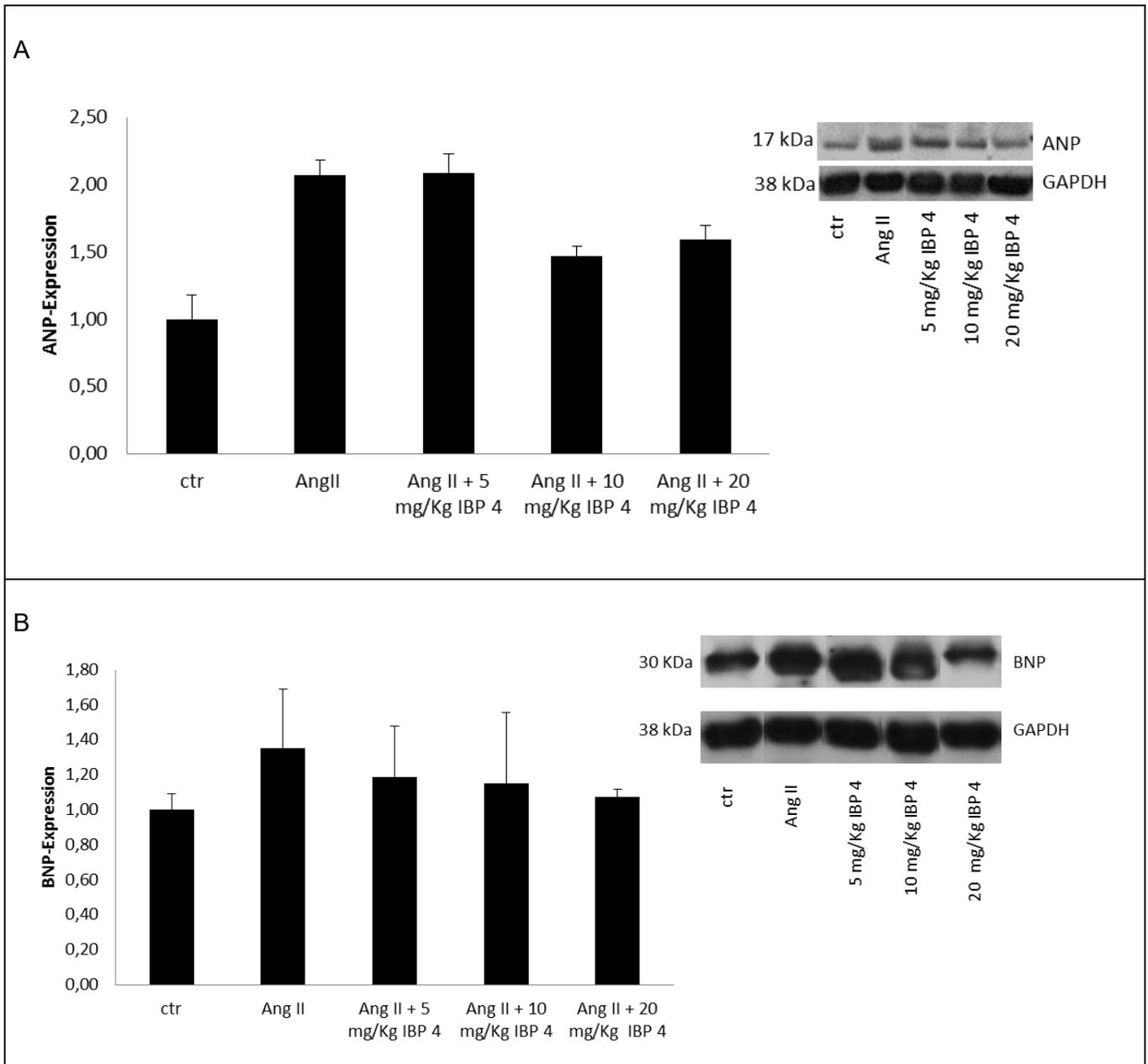


Abb. 25 Einfluss von IBP 4 auf die Expression der Hypertrophiemarker ANP und BNP auf Proteinebene.

Die Proteinexpression der verschiedenen Gruppen wurde mit Western Blots untersucht. Erneut zeigten sich bereits bei einer Dosis von 10 mg/kg/Woche und 20 mg/kg/Woche Reduktionseffekte.

7 Diskussion

7.1 Funktion von Calcineurin im Kern

In früheren Arbeiten wurde gezeigt, dass die Phosphatase-Aktivität einer trunkeierten Calcineurin Isoform ohne C-terminale regulatorische Domäne (Reste 392-521) Calmodulin-unabhängig ist, aber trotzdem die Bindung von Ca^{2+} an CnB benötigt (Stemmer and Klee 1994, Yang and Klee 2000).

Ca^{2+} spielt eine wichtige Rolle bei der Kontraktion von Kardiomyozyten. Hier schwankt der zytosolische Ca^{2+} -Spiegel zwischen der Systole und Diastole, um eine rhythmische Kontraktion zu gewährleisten. Gleichzeitig ist Ca^{2+} als Botenstoff in Signaltransduktionswegen von Bedeutung. Diese Schwankungen des Ca^{2+} -Spiegels sind bedeutend kleiner. In dieser Arbeit wurde untersucht, wie Kardiomyozyten zwischen Ca^{2+} für die Kontraktion und Ca^{2+} für die Umsetzung von Signalwegen unterscheiden können. Bei Zellen mit ständigen Ca^{2+} -Schwankungen, wie es Kardiomyozyten sind, würde eine räumliche Trennung der Prozesse diese Unterscheidung ermöglichen. Entsprechende Mikrodomänen wurden bereits durch verschiedene Autoren postuliert/beschrieben. Des Weiteren wurde untersucht, ob innerhalb dieser Mikrodomänen ein Sensor vorhanden ist, der Ca^{2+} -Signale in transkriptionelle Prozesse umwandeln kann.

Zunächst wurde die Bedeutung der Phosphatase-Aktivität von Calcineurin im Nukleus analysiert. Interessanterweise spielte die Phosphatase-Funktion von Calcineurin nur im Zytosol eine wichtige Rolle. Denn nach Translokation in den Nukleus zeigte die Calcineurin-Mutante mit einem Defekt innerhalb der Phosphatase-Domäne (CnA 1-425 Δ P) keinen Einfluss auf die Zellgröße und NFAT-Aktivität. Ähnliche Ergebnisse wurden bereits im Vorfeld in BHK-Zellen erzielt. Zhu *et al.* zeigten, dass die Bindung von Calcineurin an NFAT – und nicht seine Phosphatase-Aktivität – die Affinität von Crm1 für NFAT verringerte. Crm1 konnte kaum mit NFAT interagieren und dieses aus dem Nukleus exportieren, wenn Calcineurin an NFAT gebunden war (Zhu and McKeon 1999).

Unsere Ergebnisse sowie die von Zhu *et al.* führten zu der Frage, ob Calcineurin im Kern eine hypertrophe Entwicklung ausschließlich dadurch induziert, dass es den Export von NFAT verhindert. Dafür wurden zunächst Calcineurin-Mutanten generiert, die eine zusätzliche NLS enthielten, um die Akkumulation von Calcineurin in Kern zu gewährleisten. Zusätzlich wurde die CnB-Bindungsdomäne deletiert, so dass Calcineurin nicht mehr auf Ca^{2+} -Schwankungen reagieren konnte. In der Tat konnte diese Mutante die NFAT-Aktivität nach Stimulierung mit Ang II nicht erhöhen.

Die Transfektion von Kardiomyozyten mit der konstitutiv aktiven CnA-Isoform (1-425) führte zu einer Erhöhung der NFAT-DNA-Bindungsaktivität. Nach Transfektion mit CnA (1-525+NLS, Δ CnB) war dagegen nur eine schwache NFAT-DNA-Bindung nachweisbar. Intaktes CnA wiederum führte

nach Ang II-Stimulation zu einer verstärkten DNA-Interaktion von NFAT. Die Deletion der CnB-Bindungsstelle führte sogar zu einer Verringerung der NFAT-DNA-Bindungskapazität, während andere Calcineurin-Isoformen mit intaktem Ca^{2+} -Sensor (CnB) die NFAT-DNA-Bindungskapazität nach Ang II-Stimulation erhöhten (Olivares-Florez et al. 2018). Zusammenfassend führten diese Ergebnisse zu der Schlussfolgerung, dass Calcineurin den Export von NFAT aus dem Kern verhindert und somit dessen Aktivität als Transkriptionsfaktor verlängert. Außerdem zeigten sie, dass Calcineurin im Kern auf Ca^{2+} -Signale anspricht, die es über seine B-Untereinheit detektiert und dass diese Ca^{2+} -Signale die NFAT-Aktivität ebenfalls beeinflussen.

7.2 Angiotensin II erhöht die Ca^{2+} -Konzentration im Nukleus

Anschließend wurde die mögliche Rolle des Nukleus als eine Ca^{2+} -Mikrodomäne untersucht. Frühere Studien dieser und anderer Arbeitsgruppen zeigten, dass ET-1 intranukleäres Ca^{2+} über die $\text{IP}_3\text{R2}$ auf der Kernmembran von Kardiomyozyten erhöht (Higazi, Fearnley et al. 2009). In ventrikuläre Myozyten sind IP_3 -Rezeptoren fast ausschließlich in der Kernmembran lokalisiert und bilden einen Komplex mit CaMKII. Dieser Komplex kann IP_3 -Rezeptoren phosphorylieren und dadurch ihre Aktivität als Ca^{2+} -Kanal modulieren (Bare, Kettlun et al. 2005). In der vorliegenden Arbeit wurden diese Studien mit Ang II als Stimulanz in ruhenden adulten Maus-Kardiomyozyten fortgesetzt. Ang II führte zu einer Erhöhung des Ca^{2+} -Spiegels im Kern über die $\text{IP}_3\text{R2}$, wobei dieser Anstieg im Zellkern deutlich ausgeprägter war als im Zytosol. Da die Experimente in ruhenden Kardiomyozyten durchgeführt wurden, war dieser Vorgang unabhängig von den zyklischen Ca^{2+} -Schwankungen während der Exzitations-Kontraktions-Kopplung. Dies wurde in elektrisch-stimulierten adulten Maus-Kardiomyozyten bestätigt.

Als nächstes wurde der Mechanismus des Ca^{2+} -Anstiegs innerhalb des Kerns bei chronischer myokardialer Hypertrophie untersucht. In isolierten Maus-Zellen, die mit Ang II über 4 Wochen stimuliert wurden, war eine signifikante Erhöhung des Ca^{2+} im Kern zu beobachten, die selbst während der Diastole nicht unter $0,2 \mu\text{M}$ sank. Überraschenderweise bestand dieser erhöhte intranukleäre Ca^{2+} -Spiegel auch nach Entfernen des Ang II-Stimulus fort, wenn auch in verringertem Maße. Parallel dazu wurde eine anhaltende Erhöhung des $\text{IP}_3\text{R2}$ -Spiegels im Kern beobachtet. Eine daraufhin initiierte Wiederholung dieser Experimente in IP_3 -Sponge-Mäusen mit fehlerhaftem IP_3 -Signalling (Nakayama, Bodi et al. 2010) ergab, dass es nicht zu einer Ca^{2+} -Erhöhung im Nukleus nach chronischer Stimulation mit Ang II kam. Die Ang II-vermittelte Aktivierung von $\text{IP}_3\text{R2}$ auf der Kernmembran und die anschließende Freisetzung von Ca^{2+} führte zu einer Ca^{2+} -abhängigen Aktivierung von Calcineurin, welche wiederum eine NFAT-abhängige Transkription zur Folge hatte. Dies erklärt wie Ca^{2+} in adulten ventrikulären Kardiomyozyten die Transkription über IP_3 -Rezeptoren und Calcineurin als Antwort auf neurohumorale Signale im Zellkern als eine Ca^{2+} -Mikrodomäne regulieren kann.

Ein ähnliches Szenario wurde bereits für CaMKII beschrieben. Wu *et al.* zeigten, dass CaMKII durch hohe lokale Ca^{2+} -Spiegel ($>10 \mu\text{M}$) aktiviert wurde (Wu, Zhang *et al.* 2006). In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass der Ca^{2+} -Spiegel im Zellkern während der Diastole unter Ang II-Stimulation konstant erhöht ist. Da Calcineurin bereits auf eine Ca^{2+} -Konzentration von $0,1 \mu\text{M}$ anspricht (Perrino, Ng *et al.* 1995, Feng and Stemmer 2001), führt eine anhaltende Erhöhung des Ca^{2+} -Spiegels (Timmerman, Clipstone *et al.* 1996) zu einer permanenten Aktivierung von nukleärem Calcineurin.

Die Affinität der CaMKII für Ca^{2+} ist viel geringer als die von Calcineurin ($\sim 1/100$). Somit kann intranukleäres Calcineurin als ein zusätzlicher Mechanismus betrachtet werden, um schon geringste Anstiege der Ca^{2+} -Konzentration im Zellkern zu detektieren. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass nach Auftreten eines Hypertrophie-Reizes – in diesem Fall Ang II – beide „Detektoren“, sowohl die nukleäre CaMKII als auch Calcineurin, über eine IP_3 -vermittelte Erhöhung des Ca^{2+} -Spiegels im Zellkern aktiviert wurden. Nach Eliminierung des Stimulus war die Ca^{2+} -Konzentration in der nukleären Mikrodomäne weiterhin schwach erhöht, vorausgesetzt der IP_3 -Signalweg war intakt. Diese leicht erhöhte Konzentration genügte, um Calcineurin aktiv zu halten, nicht jedoch die CaMKII-Aktivierung, welche offensichtlich nur auf höhere Ca^{2+} -Level ansprach.

Diese Ergebnisse unterstützen die These, dass Calcineurin nach Translokation in den Nukleus von Kardiomyozyten als ein Ca^{2+} -Sensor agiert. Dieser Ca^{2+} -Sensor kann schon geringste Schwankungen des Ca^{2+} -Spiegels, wie sie für eine Signaltransduktion charakteristisch sind, wahrnehmen und so die Transkription von Hypertrophie-Genen unterstützen bzw. initiieren. Dabei kommt CnB als der Ca^{2+} -bindenden Untereinheit des Calcineurin-Dimers eine besondere Bedeutung zu. Dies zeigen auch die Ergebnisse von Maillet *et al.* (Maillet, Davis *et al.* 2010). Hier konnte aktiviertes CnA in CnB-defizienten Mäusen keine effiziente Transkription eines NFAT-Luciferase-Konstrukts induzieren. Eine weitere Voraussetzung für eine anhaltende hypertrophe Antwort ist neben einem Calcium-Sensor die permanente Erhöhung des Ca^{2+} -Spiegels im Nukleus, wobei möglicherweise eine verstärkte Expression von IP_3 -Rezeptoren in der Kernmembran eine Rolle spielt.

7.3 Nukleäre $\text{IP}_3\text{R}2$ - Expression *in vivo*

Der Nachweis einer NFAT-Consensus-Sequenz innerhalb des $\text{IP}_3\text{R}2$ -Promotors bei -633 zeigt, dass die Expression von $\text{IP}_3\text{R}2$ unmittelbar von Calcineurin/NFAT abhängt. Unterlegt wird dieses Ergebnis durch die Arbeit von Sankar *et al.* (Sankar, deTombe *et al.* 2014). Letztendlich führt der beschriebene Feedback-Mechanismus zu einem „circulus vitiosus“: nukleäres Calcineurin verstärkt die $\text{IP}_3\text{R}2$ -Expression, was wiederum einen gesteigerten Fluss von Ca^{2+} in den Zellkern und die weitere Aktivierung von Calcineurin zur Folge hat. Ist die Ca^{2+} -Konzentration im Nukleus längerfristig erhöht, verbleibt Calcineurin im aktivierten Zustand und assoziiert mit NFAT, was dessen transkriptionelle Aktivität fördert (Bootman, Fearnley *et al.* 2009). Ein ähnliches Konzept

wurde bereits für das „cyclic AMP response element-binding protein“ (CREB) gezeigt. CREB ist ein im Kern lokalisierter Transkriptionsfaktor, der von nukleären und zytosolischen Ca^{2+} -Signalen in Neuronen reguliert wird (Dolmetsch, Pajvani et al. 2001). Ein weiteres Beispiel für eine Ca^{2+} -abhängige Signaltransduktion im Zellkern stellt der Transkriptionsregulator „downstream regulatory element antagonist modulator“ (DREAM) dar (Ledo, Kremer et al. 2002).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Translokation eines Transkriptionsfaktors oder -Cofaktors (hier: Calcineurin) vom Zytoplasma in den Nucleus nicht automatisch zu einer Genexpression führt. Hier greift ein zusätzlicher Regulationsmechanismus, so dass die Genexpression in Abhängigkeit vom nukleären Ca^{2+} -Spiegel aktiviert wird. Nukleäres Calcineurin spricht auf sehr schwache, lokale Ca^{2+} -Signale an und ist – nicht zuletzt durch die räumliche Abgrenzung (Zellkern) – größtenteils unabhängig von den großen Ca^{2+} -Schwankungen im Zytoplasma während der Muskelkontraktion. So lässt sich erklären, wie Kardiomyozyten neurohumorale Signale über Ca^{2+} -abhängige Signalwege wahrnehmen können, ohne dass diese Signale durch die großen zytosolischen Ca^{2+} -Transienten überlagert werden.

Der Calcineurin/NFAT-Signalweg spielt eine wichtige Rolle bei der Entwicklung einer myokardialen Hypertrophie und einer Herzinsuffizienz. Im Zytoplasma von Kardiomyozyten (aber auch anderen Zellen) wird die Phosphatase Calcineurin nach Stimulation der Zellen mit Hypertrophieereizen wie Ang II oder Endothelin I und dem daraus resultierenden intrazellulären Ca^{2+} -Strom aktiviert. Dies führt zu einer Dephosphorylierung und damit zu einer Demaskierung von Phosphoserin-Resten innerhalb der Nuclear Localisation Sequence von NFAT und hat die Translokation des Transkriptionsfaktors in den Zellkern zur Folge. Hallhuber *et al.* identifizierten eine NLS für den Import von Calcineurin in den Zellkern und eine NES für seinen Export (Hallhuber, Burkard et al. 2006).

Die nicht-klassische NLS von Calcineurin bindet unmittelbar an Importin- β 1 und initiiert so den Transport der Phosphatase über den Nuclear pore complex (Chook and Blobel 2001). Das Nuclear Export Signal führt – ebenso wie bei NFAT – im Kern zur Bindung an das Karyopherin-Protein Crm1.

Sinkt die Aktivität von Calcineurin, so wird NFAT rephosphoryliert, aus dem Nucleus exportiert und die Transkription von Genen durch NFAT ist beendet (Shibasaki, Price et al. 1996). Calcineurin wirkt dem Crm1-bedingten nukleären Export von NFAT entgegen, indem es mit Crm1 um entsprechende Bindungsstellen innerhalb der NFAT-Sequenz konkurriert (Zhu and McKeon 1999).

7.4 IBP

Ausgehend von den Ergebnissen von Ritter *et al.* und anderen Arbeitsgruppen zu diesem Thema wurde das Import Blocking Peptid (IBP) zur Behandlung bzw. Verhinderung einer Herzinsuffizienz entwickelt. Dieses Peptid sättigt die Calcineurin-Bindungsstellen der Importin- β 1-Moleküle ab und beugt so der Translokation von Calcineurin in den Kern, der transkriptionellen Aktivität von

Calcineurin/NFAT und dadurch einer kardialen Hypertrophie nach Angiotensin II-Stimulation in isolierten Kardiomyozyten vor (Hallhuber, Burkard et al. 2006).

IBP imitiert die NLS von Calcineurin und bindet im Zytoplasma an Importin- β 1. So wird die Translokation von Calcineurin in den Zellkern verhindert, was wiederum den Export von NFAT aus dem Zellkern zur Folge hat. Auf diesem Weg wird die Transkription von Hypertrophie-Genen blockiert. Eine ähnliche therapeutische Maßnahme wurde vorher für NF κ B entwickelt (Torgerson, Colosia et al. 1998, Cunningham, Cleaveland et al. 2003) und auch die Calcineurin/NFAT-Interaktion wurde bereits mit einem kompetitiven Peptid beeinflusst (Aramburu, Yaffe et al. 1999). IBP wurde in der Vergangenheit nur *in vitro* getestet.

Ziel dieser Arbeit war es, das IBP weiter zu optimieren sowie seine Wirksamkeit und andere Eigenschaften *in vivo* zu testen. Wichtige Entwicklungsschritte waren die Identifizierung eines geeigneten Lösungsmittels, das Einführen verschiedener Modifikationen in die Peptidsequenz, um die Spezifität und Stabilität des Wirkstoffs zu verbessern, die Eingrenzung der erforderlichen Dosis zur Verhinderung einer hypertrophen Entwicklung in der Maus und das Sammeln erster Informationen zu Körperdistribution, Abbau und Ausscheidung des Peptids. In dieser Arbeit wurde die Löslichkeit des Peptides hinsichtlich der Verträglichkeit in Mäusen untersucht, mit dem Ausblick später die Verträglichkeit für Menschen besser abschätzen zu können.

IBP besteht aus einer 15 Aminosäuren langen Sequenz, die der Membrandurchdringung dient (MPS), und der 12 Aminosäuren langen Wirksequenz, die die putative NLS von Calcineurin enthält (AAVALLPAVLLALLA KQECKIKYSERV). Die MPS macht das Peptid stark hydrophob, so dass die Verwendung von Wasser als Lösungsmittel nicht in Frage kommt. Dementsprechend wurden verschiedene Lösungsmittel getestet, die die Löslichkeit in Wasser steigern. Dies war der Fall mit einer 5 %igen Polyoxyethanyl- α -tocopherylsebacat (PTS)-Lösung oder bei Verwendung von Kollidon 25. Bei beiden Lösungsmitteln erkennt man eine homogene Verteilung des Peptides in dem Zytoplasma der Kardiomyozyten, ohne dass sich Klumpen im Medium bilden. Andere herkömmliche organische Lösungsmittel wie Cyclodextrin oder Lecithin verbesserten die Löslichkeit des Mediums nur bedingt. Außerdem trennten sich schnell im Reagenzglas die organische und die wässrige Phase. Bei Kollidon 25 und der 5-prozentige PTS-Lösung löste sich das Peptid schnell und blieb im gelösten Zustand.

Da PTS vorher als Lösungsmittel für einen Medikament nicht verwendet wurde, mussten neue Toxizitätsversuche mit dem neuen Lösungsmittel in verschiedenen Zelllinien durchgeführt werden. Aufgrund dessen wurde zusätzlich das Lösungsmittel Kollidon[®] 25 getestet. Kollidon[®] 25 besteht aus der Verbindung Polyvinylpyrrolidon entdeckt bei der Firma BASF und ist ein pharmazeutischer Hilfsstoff, das unterschiedliche Funktionen erfüllt. Kollidon[®] 25 und seine Derivate werden unter anderem als Bindemittel in Tabletten, Kapseln und Granulaten eingesetzt. Darüber hinaus werden sie auch als Filmbildner für Tablettenbezüge, Suspensionsstabilisatoren, Enzymstabilisatoren und zur Erhöhung der Bioverfügbarkeit verwendet. Als Suspensionsstabilisator wurde Kollidon[®] 25 in

zugelassene Medikamente wie Acyclovir, Ibuprofen, Magaldrate, Nystatine und Antibiotika verwendet. Im Hinblick auf die weitere klinische Entwicklung haben wir mit Kollidon® 25 weitergearbeitet, da es im Menschen bereits zugelassen ist.

Das nächste Ziel war, die Stabilität des Peptides in der Zelle zu steigern. Um zum Beispiel den Abbau der Peptide durch Proteasen oder Aggregationen des Peptides in Lösung zu verhindern. Dafür wurden verschiedene Aminosäuresubstitutionen innerhalb der NLS-Sequenz entworfen, diese IBP-Isoformen kommerziell synthetisiert und anschließend in Zellkulturversuchen getestet. Die Translokationsrate von Calcineurin in den Nukleus wurde nach Aktivierung des Calcineurin/NFAT-Signalwegs durch die Zugabe von Ang II bei gleichzeitiger Applikation der Peptide untersucht. Die IBP-Isoformen 3 und 4 waren bei der Verhinderung der Translokation von Calcineurin in den Zellkern effektiver als die Ausgangsform und die anderen Alternativsequenzen. Bei IBP 3 lag ein Aminosäuren-Austausch von Serin gegen Alanin und bei IBP 4 eine Substitution von Cystein durch α -Aminobuttersäure vor. α -Aminobuttersäure auch AABA genannt ist eine nicht-proteinogene α -Aminosäure, dass aus der Aminosäure Threonin durch Hydrolyse von Salzsäure gewonnen wird. α -Aminobuttersäure wird in der Peptidsynthese oft benutzt als Ersatz von Cystein, da es isosterisch zu Cystein ist (Ferrer, Woodward et al. 1992, Karim, Paterlini et al. 2001) und die Struktur des Peptides durch Erhalt der sterischen Konformation stabilisiert.

Zusätzlich wurde die transkriptionelle Aktivität von NFAT untersucht. Dafür wurden die Kardiomyozyten mit Calcineurin transfiziert und mit den IBP-Isoformen 1, 3, 4 und 5 behandelt. Wie erwartet, führte die Überexpression von Calcineurin zu einer erhöhten NFAT-Aktivität. Die Zugabe von IBP 3 und IBP 4 führten zu einer Abnahme der transkriptionellen Aktivität von NFAT. Wobei die IBP-Isoform 5 keine Reduktion der NFAT-Aktivität aufwies. Dies bestätigte unser Ergebnis der Immunofluoreszenz. Die Messung der NFAT-Aktivität anhand dessen Lumineszenz ergab hohe Variabilitäten zwischen den einzelnen Messwerten. Alternativ wurde eine Messung der NFAT-Aktivität mittels eines kommerziellen ELISA-Assay untersucht. Allerdings zeigte diese Messung auch hohe Schwankungen zwischen den einzelnen Versuchswiederholungen, wodurch eine Aussage schwer zu treffen war. Eine mögliche Erklärung für diesen Effekt wäre, dass das NFAT-Luciferase Plasmid unterschiedliche Transfektionsraten aufwies. Es ist auch nicht aufzuschließen, dass NFAT an andere Gene bindet und sie verstärkt exprimiert. Dies wurde in dieser Arbeit nicht nachgewiesen. Eine alternative Methode, die parallel die Messung der NFAT-Aktivität unterstützen würde, wäre die Messung der Proteinmenge von NFAT im phosphorylierten und nicht-phosphorylierten Zustand und dies in einem Western Blot zu überprüfen.

Um den Abbau des Peptids und seine Ausscheidung *in vivo* zu untersuchen, wurden Kot und Urin von FVB-Mäusen nach der Applikation von TAMRA-getagtem IBP 4 oder TAMRA allein (als Kontrolle) gesammelt. Die Proben wurden aufbereitet und die Fluoreszenz des Farbstoffs mit Hilfe des IVIS-Systems analysiert. In den Kontrolltieren wurde der Farbstoff innerhalb der ersten 48 Stunden über den Urin komplett aus dem Körper ausgeschieden. Im Gegensatz dazu erreichte IBP

4 seine höchste Ausscheidung bei 600 µg/ml nach 48 Stunden und wurde dann langsamer weiter aus dem Körper ausgeschieden. Diesem Versuch nach ist es ersichtlich, dass das IBP hauptsächlich über die Nieren ausgeschieden wird.

Ein erstes Screening der Akkumulation von IBP 4 in verschiedenen Organen, hat eine Anreicherung von IBP 4 im Herzen nachgewiesen. Allerdings konnte keine signifikante Anreicherung in anderen Organen, v. a. nicht in Lymphknoten oder im Thymus, nachgewiesen werden. Aufgrund der Natur des Wirkstoffs ist es schwierig, einen eindeutigen Nachweis zu führen, da die TAMRA-Markierung des Peptids sein Verhalten verfälscht. Dafür sollte ein Assay mit einem radioaktiv markierten Peptid durch ein Auftragsforschungsunternehmen durchgeführt werden.

Das standardmäßige Screening der Organe im Rahmen der durchgeführten Untersuchungen und auch auf histologischer Ebene hat keine pathologischen Veränderungen gezeigt, die auf IBP zurückzuführen sind.

Wichtig wäre die Leber als Hauptort des Metabolismus von Medikamenten zu untersuchen, um die Verteilung des Peptides im Körper zu verfolgen. Außerdem könnten bestimmte Marker im Plasmaspiegel, wie zum Beispiel der Creatinin-Wert, Glutamat-Oxaloacetat-Transaminase-Wert (GOT), Glutamat-Pyruvat Transaminase (GPT), Kreatinin-Phosphokinase (CPK) und Alkalin-Phosphatase, durch ein Auftragsforschungsinstitut untersucht werden.

Um die optimale Dosis von IBP zu finden, wurden verschiedene Dosen in FVB-Mäuse getestet. Die IBP-Dosis sollte so niedrig wie möglich sein, ohne eine Einschränkung der Wirkung zu bedingen. Die Mäuse wurden in 5 Gruppen (2 Kontrollgruppen sowie 3 Gruppen mit unterschiedlichen Dosen) geteilt: NaCl-Kontrolle, Ang II-Kontrolle, Ang II + 5 mg/kg/Woche IBP 4, Ang II + 10 mg/kg/Woche IBP 4 und Ang II + 20 mg/kg/Woche IBP 4. Als Hypertrophie-Parameter wurden unter anderem das Verhältnis von Herz- zu Körpergewicht und die Kardiomyozyten-Größe gemessen. Auch wenn das Verhältnis Herzgewicht zu Körpergewicht kein eindeutiges Ergebnis lieferte, war die Größe der Kardiomyozyten nach Zugabe von 20 mg/kg/Woche IBP 4 deutlich niedriger als bei 5 bzw. 10 mg/kg/Woche. Die Immunhistochemischen Aufnahmen von Calcineurin im Myokardium zeigten eine Anreicherung von Calcineurin in den Zellkern bei der Aktivierung des Calcineurin/NFAT-Signalwegs nach Zugabe von Ang II. Dieser Vorgang wurde durch die Zugabe von 20 mg/kg/Woche IBP 4 verhindert. In diesen Gewebe-Aufnahmen war Calcineurin überwiegend im Zytoplasma zu sehen. Diese Ergebnisse bestätigen unsere und die *in vitro* Ergebnisse von (Hallhuber, Burkard et al. 2006). Die Untersuchung des Einflusses von IBP auf transkriptionelle Ebene durch die qPCR zeigte eine erhöhte ANP-Expression um das 3-fache nach Ang II Zugabe. Nach 20 mg/kg/Woche ging die Expression auf das 2-fache runter. Die Untersuchung der BNP-Expression im Myokardium ergab kein eindeutiges Ergebnis, da die BNP-Expression bei den Ang II-Mäusen nicht ausreichend erhöht war.

Die Ergebnisse der einzelnen Versuchsdurchführungen und Experimente waren nicht immer konsistent und zum Teil auch widersprüchlich, so dass nicht für alle Werte ein wünschenswertes

Signifikanzniveau erreicht werden konnte. Durch eine Erhöhung der Stichprobenzahl – spätestens im Zuge der erforderlichen toxikologischen Untersuchungen – können die entsprechenden Unterschiede mit hoher Wahrscheinlichkeit bestätigt werden.

Die Mäuse, die mit 10 mg/kg/Woche IBP 4 behandelt wurden, zeigten eine hohe Variabilität. Aufgrund dessen passen die Ergebnisse nicht zum Trend, aber es wäre durchaus möglich die Dosis von 10 mg/kg/Woche IBP 4 zu verwenden.

Nichtsdestotrotz deuten die Ergebnisse in diesem Versuch auf eine Wirkung von IBP 4 bei 20 mg/kg/Woche. Frühere *in vivo* Experimenten mit dem Import Blocking Peptid dieser Arbeitsgruppe, wurden mit einer Dosis von 25 mg/kg/ Woche durchgeführt. Also ist es in dieser Arbeit gelungen, die Dosis zu reduzieren. Verglichen mit dem NFAT-Inhibitor, VIVIT (Yu, van Berkel et al. 2007) dessen verwendete Dosis von (20 mg/kg/2 Tage) beträgt, ist die hier verwendete Dosis gering, da es nur eine Einmalige Gabe / Woche von IBP nötig ist, um einen Effekt zu erzielen.

7.5 Ausblick

Um die Studie unter realistischeren Bedingungen weiter durchzuführen wäre es nötig IBP 4 als Therapeutikum nach der Entwicklung einer Hypertrophie zu testen. Zunächst müsste eine Hypertrophie durch den Einsatz von Ang II-Pumpen über einen Zeitraum von mindestens 4 Wochen in Mäusen hervorgerufen werden. Nach Feststellung einer kardialen Hypertrophie, würde der Einsatz von IBP 4 in den gewünschten Konzentrationen einmal pro Woche über einen Zeitraum von weiteren 4 Wochen den Mäusen injiziert. Kontrolltiere bekämen stattdessen NaCl injiziert. Nach Entnahme der Organe könnten, wie bereits durchgeführt bei der Dosis-Optimierung für IBP 4 *in vivo*, mehrere Parameter untersucht werden. Zum einen die Lokalisation von IBP 4 in verschiedenen Organen unter anderem Herz, Leber und Milz. Zum anderen die Untersuchung von Hypertrophie-Parametern wie das Verhältnis von Herz zu Körpergewicht, die Zellgröße, die Expression von ANP und BNP und die enzymatische Aktivität von Calcineurin anhand der Aktivität von NFAT.

8 Abkürzungsverzeichnis

AID	Autoinhibitorische Bindedomäne
ANP	Atriales natriuretisches Peptid
AAC	Abdominal aortic constriction
Ang II	Angiotensin II
BNP	Natriuretisches Peptid Typ B
β -Blocker	Beta-Adrenorezeptor-Antagonisten
β -MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex β Untereinheit
CamKII	Ca ²⁺ /Calmodulin-abhängige Protein Kinase II
CnA	Calcineurin A
CnB	Calcineurin B
ECC	Exzitation-Kontraktions-Kopplung
ET-1	Endothelin-1
ETC	Exzitation-Transkriptions-Kopplung
FCS	Fetales Kalbserum
IBP	Import Blocking Peptide
IP ₃	Inositoltriphosphat
IP ₃ R2	Inositoltriphosphat-Rezeptor 2
Mg	Milligramm
ml	Milliliter
μ M	Mikromolar

nM	Nanomolar
NES	Nuclear Export Signal
NLS	Nuclear Localization Signal
PE	Phenylephrin
PTS	Polyoxyethanyl- α -tocopherylsebacat
RyR2	Ryanodin Rezeptor 2
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
SOD	Superoxid-Dismutase
TAC	Transverse aortic constriction
üN	Über Nacht

9 Referenzen

- Alberts, A. S., A. M. Thorburn, S. Shenolikar, M. C. Mumby and J. R. Feramisco (1993). "Regulation of cell cycle progression and nuclear affinity of the retinoblastoma protein by protein phosphatases." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(2): 388-392.
- Anthony, F. A., M. A. Winkler, H. H. Edwards and W. Y. Cheung (1988). "Quantitative subcellular localization of calmodulin-dependent phosphatase in chick forebrain." J Neurosci **8**(4): 1245-1253.
- Antos, C. L., T. A. McKinsey, N. Frey, W. Kutschke, J. McAnally, J. M. Shelton, J. A. Richardson, J. A. Hill and E. N. Olson (2002). "Activated glycogen synthase-3 beta suppresses cardiac hypertrophy in vivo." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(2): 907-912.
- Aramburu, J., M. B. Yaffe, C. Lopez-Rodriguez, L. C. Cantley, P. G. Hogan and A. Rao (1999). "Affinity-driven peptide selection of an NFAT inhibitor more selective than cyclosporin A." Science **285**(5436): 2129-2133.
- Bare, D. J., C. S. Kettlun, M. Liang, D. M. Bers and G. A. Mignery (2005). "Cardiac type 2 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor: interaction and modulation by calcium/calmodulin-dependent protein kinase II." J Biol Chem **280**(16): 15912-15920.
- Barford, D. (1996). "Molecular mechanisms of the protein serine/threonine phosphatases." Trends Biochem Sci **21**(11): 407-412.
- Barford, D., A. K. Das and M. P. Egloff (1998). "The structure and mechanism of protein phosphatases: insights into catalysis and regulation." Annu Rev Biophys Biomol Struct **27**: 133-164.
- Bootman, M. D., C. Fearnley, I. Smyrniak, F. MacDonald and H. L. Roderick (2009). "An update on nuclear calcium signalling." J Cell Sci **122**(Pt 14): 2337-2350.
- Bootman, M. D., D. Harzheim, I. Smyrniak, S. J. Conway and H. L. Roderick (2007). "Temporal changes in atrial EC-coupling during prolonged stimulation with endothelin-1." Cell Calcium **42**(4-5): 489-501.
- Bosser, R., R. Aligue, D. Guerini, N. Agell, E. Carafoli and O. Bachs (1993). "Calmodulin can modulate protein phosphorylation in rat liver cells nuclei." J Biol Chem **268**(21): 15477-15483.
- Braz, J. C., O. F. Bueno, Q. Liang, B. J. Wilkins, Y. S. Dai, S. Parsons, J. Braunwart, B. J. Glascock, R. Klevitsky, T. F. Kimball, T. E. Hewett and J. D. Molkenin (2003). "Targeted inhibition of p38 MAPK promotes hypertrophic cardiomyopathy through upregulation of calcineurin-NFAT signaling." J Clin Invest **111**(10): 1475-1486.
- Buch, M. H., A. Pickard, A. Rodriguez, S. Gillies, A. H. Maass, M. Emerson, E. J. Cartwright, J. C. Williams, D. Oceandy, J. M. Redondo, L. Neyses and A. L. Armesilla (2005). "The sarcolemmal calcium pump inhibits the calcineurin/nuclear factor of activated T-cell pathway via interaction with the calcineurin A catalytic subunit." J Biol Chem **280**(33): 29479-29487.

- Bueno, O. F., E. van Rooij, J. D. Molkentin, P. A. Doevendans and L. J. De Windt (2002). "Calcineurin and hypertrophic heart disease: novel insights and remaining questions." Cardiovasc Res **53**(4): 806-821.
- Bueno, O. F., B. J. Wilkins, K. M. Tymitz, B. J. Glascock, T. F. Kimball, J. N. Lorenz and J. D. Molkentin (2002). "Impaired cardiac hypertrophic response in Calcineurin Abeta - deficient mice." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(7): 4586-4591.
- Burkard, N., J. Becher, C. Heindl, L. Neyses, K. Schuh and O. Ritter (2005). "Targeted proteolysis sustains calcineurin activation." Circulation **111**(8): 1045-1053.
- Butcher, S. P., D. C. Henshall, Y. Teramura, K. Iwasaki and J. Sharkey (1997). "Neuroprotective actions of FK506 in experimental stroke: in vivo evidence against an antiexcitotoxic mechanism." J Neurosci **17**(18): 6939-6946.
- Chook, Y. M. and G. Blobel (2001). "Karyopherins and nuclear import." Curr Opin Struct Biol **11**(6): 703-715.
- Chow, C. W., M. Rincon, J. Cavanagh, M. Dickens and R. J. Davis (1997). "Nuclear accumulation of NFAT4 opposed by the JNK signal transduction pathway." Science **278**(5343): 1638-1641.
- Clipstone, N. A. and G. R. Crabtree (1992). "Identification of calcineurin as a key signalling enzyme in T-lymphocyte activation." Nature **357**(6380): 695-697.
- Civici, A. and M. Ikura (1995). "Molecular and structural basis of target recognition by calmodulin." Annu Rev Biophys Biomol Struct **24**: 85-116.
- Cunningham, M. D., J. Cleaveland and S. G. Nadler (2003). "An intracellular targeted NLS peptide inhibitor of karyopherin alpha:NF-kappa B interactions." Biochem Biophys Res Commun **300**(2): 403-407.
- De Windt, L. J., H. W. Lim, O. F. Bueno, Q. Liang, U. Delling, J. C. Braz, B. J. Glascock, T. F. Kimball, F. del Monte, R. J. Hajjar and J. D. Molkentin (2001). "Targeted inhibition of calcineurin attenuates cardiac hypertrophy in vivo." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(6): 3322-3327.
- Dolmetsch, R. E., U. Pajvani, K. Fife, J. M. Spotts and M. E. Greenberg (2001). "Signaling to the nucleus by an L-type calcium channel-calmodulin complex through the MAP kinase pathway." Science **294**(5541): 333-339.
- Fagard, R. H. (1992). "Impact of different sports and training on cardiac structure and function." Cardiol Clin **10**(2): 241-256.
- Faulds, D., K. L. Goa and P. Benfield (1993). "Cyclosporin. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic use in immunoregulatory disorders." Drugs **45**(6): 953-1040.
- Feng, B. and P. M. Stemmer (2001). "Ca²⁺ binding site 2 in calcineurin-B modulates calmodulin-dependent calcineurin phosphatase activity." Biochemistry **40**(30): 8808-8814.

- Ferreira, A., R. Kincaid and K. S. Kosik (1993). "Calcineurin is associated with the cytoskeleton of cultured neurons and has a role in the acquisition of polarity." Mol Biol Cell **4**(12): 1225-1238.
- Ferrer, M., C. Woodward and G. Barany (1992). "Solid-phase synthesis of bovine pancreatic trypsin inhibitor (BPTI) and two analogues. A chemical approach for evaluating the role of disulfide bridges in protein folding and stability." Int J Pept Protein Res **40**(3-4): 194-207.
- Flanagan, W. M., B. Corthesy, R. J. Bram and G. R. Crabtree (1991). "Nuclear association of a T-cell transcription factor blocked by FK-506 and cyclosporin A." Nature **352**(6338): 803-807.
- Frey, N. and E. N. Olson (2003). "Cardiac hypertrophy: the good, the bad, and the ugly." Annu Rev Physiol **65**: 45-79.
- Frey, N., J. A. Richardson and E. N. Olson (2000). "Calsarcins, a novel family of sarcomeric calcineurin-binding proteins." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(26): 14632-14637.
- Gorlich, D. and I. W. Mattaj (1996). "Nucleocytoplasmic transport." Science **271**(5255): 1513-1518.
- Gorlich, D., M. J. Seewald and K. Ribbeck (2003). "Characterization of Ran-driven cargo transport and the RanGTPase system by kinetic measurements and computer simulation." EMBO J **22**(5): 1088-1100.
- Grigoriu, S., R. Bond, P. Cossio, J. A. Chen, N. Ly, G. Hummer, R. Page, M. S. Cyert and W. Peti (2013). "The molecular mechanism of substrate engagement and immunosuppressant inhibition of calcineurin." PLoS Biol **11**(2): e1001492.
- Guerini, D., C. Montell and C. B. Klee (1992). "Molecular cloning and characterization of the genes encoding the two subunits of *Drosophila melanogaster* calcineurin." J Biol Chem **267**(31): 22542-22549.
- Hallhuber, M., N. Burkard, R. Wu, M. H. Buch, S. Engelhardt, L. Hein, L. Neyses, K. Schuh and O. Ritter (2006). "Inhibition of nuclear import of calcineurin prevents myocardial hypertrophy." Circ Res **99**(6): 626-635.
- Haq, S., G. Choukroun, H. Lim, K. M. Tymitz, F. del Monte, J. Gwathmey, L. Grazette, A. Michael, R. Hajjar, T. Force and J. D. Molkentin (2001). "Differential activation of signal transduction pathways in human hearts with hypertrophy versus advanced heart failure." Circulation **103**(5): 670-677.
- Heineke, J., M. Auger-Messier, R. N. Correll, J. Xu, M. J. Benard, W. Yuan, H. Drexler, L. V. Parise and J. D. Molkentin (2010). "CIB1 is a regulator of pathological cardiac hypertrophy." Nat Med **16**(8): 872-879.
- Heineke, J. and O. Ritter (2012). "Cardiomyocyte calcineurin signaling in subcellular domains: from the sarcolemma to the nucleus and beyond." J Mol Cell Cardiol **52**(1): 62-73.

- Heineke, J., H. Ruetten, C. Willenbockel, S. C. Gross, M. Naguib, A. Schaefer, T. Kempf, D. Hilfiker-Kleiner, P. Caroni, T. Kraft, R. A. Kaiser, J. D. Molkentin, H. Drexler and K. C. Wollert (2005). "Attenuation of cardiac remodeling after myocardial infarction by muscle LIM protein-calcineurin signaling at the sarcomeric Z-disc." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(5): 1655-1660.
- Higazi, D. R., C. J. Fearnley, F. M. Drawnel, A. Talasila, E. M. Corps, O. Ritter, F. McDonald, K. Mikoshiba, M. D. Bootman and H. L. Roderick (2009). "Endothelin-1-stimulated InsP3-induced Ca²⁺ release is a nexus for hypertrophic signaling in cardiac myocytes." Mol Cell **33**(4): 472-482.
- Hogan, P. G., L. Chen, J. Nardone and A. Rao (2003). "Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT." Genes Dev **17**(18): 2205-2232.
- Hubbard, M. J. and C. B. Klee (1989). "Functional domain structure of calcineurin A: mapping by limited proteolysis." Biochemistry **28**(4): 1868-1874.
- Jain, J., P. G. McCaffrey, Z. Miner, T. K. Kerppola, J. N. Lambert, G. L. Verdine, T. Curran and A. Rao (1993). "The T-cell transcription factor NFATp is a substrate for calcineurin and interacts with Fos and Jun." Nature **365**(6444): 352-355.
- Jiang, H., F. Xiong, S. Kong, T. Ogawa, M. Kobayashi and J. O. Liu (1997). "Distinct tissue and cellular distribution of two major isoforms of calcineurin." Mol Immunol **34**(8-9): 663-669.
- Kar, P. and A. B. Parekh (2015). "Distinct spatial Ca²⁺ signatures selectively activate different NFAT transcription factor isoforms." Mol Cell **58**(2): 232-243.
- Karim, C. B., M. G. Paterlini, L. G. Reddy, G. W. Hunter, G. Barany and D. D. Thomas (2001). "Role of cysteine residues in structural stability and function of a transmembrane helix bundle." J Biol Chem **276**(42): 38814-38819.
- Karsner, H. T., O. Saphir and T. W. Todd (1925). "The State of the Cardiac Muscle in Hypertrophy and Atrophy." Am J Pathol **1**(4): 351-372 351.
- Kitajima, T. S., T. Sakuno, K. Ishiguro, S. Iemura, T. Natsume, S. A. Kawashima and Y. Watanabe (2006). "Shugoshin collaborates with protein phosphatase 2A to protect cohesin." Nature **441**(7089): 46-52.
- Klee, C. B., T. H. Crouch and M. H. Krinks (1979). "Calcineurin: a calcium- and calmodulin-binding protein of the nervous system." Proc Natl Acad Sci U S A **76**(12): 6270-6273.
- Klee, C. B., G. F. Draetta and M. J. Hubbard (1988). "Calcineurin." Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol **61**: 149-200.
- Klee, C. B., H. Ren and X. Wang (1998). "Regulation of the calmodulin-stimulated protein phosphatase, calcineurin." J Biol Chem **273**(22): 13367-13370.
- Kockskamper, J., L. Seidlmayer, S. Walther, K. Hellenkamp, L. S. Maier and B. Pieske (2008). "Endothelin-1 enhances nuclear Ca²⁺ transients in atrial myocytes through

- Ins(1,4,5)P₃-dependent Ca²⁺ release from perinuclear Ca²⁺ stores." J Cell Sci **121**(Pt 2): 186-195.
- Kuno, T., H. Mukai, A. Ito, C. D. Chang, K. Kishima, N. Saito and C. Tanaka (1992). "Distinct cellular expression of calcineurin A alpha and A beta in rat brain." J Neurochem **58**(5): 1643-1651.
- Ledo, F., L. Kremer, B. Mellstrom and J. R. Naranjo (2002). "Ca²⁺-dependent block of CREB-CBP transcription by repressor DREAM." EMBO J **21**(17): 4583-4592.
- Lim, H. W. and J. D. Molkentin (1999). "Calcineurin and human heart failure." Nat Med **5**(3): 246-247.
- Lipshutz, B. H. and A. R. Abela (2008). "Micellar catalysis of Suzuki-Miyaura cross-couplings with heteroaromatics in water." Org Lett **10**(23): 5329-5332.
- Liu, J. O. (2003). "Endogenous protein inhibitors of calcineurin." Biochem Biophys Res Commun **311**(4): 1103-1109.
- Loh, C., J. A. Carew, J. Kim, P. G. Hogan and A. Rao (1996). "T-cell receptor stimulation elicits an early phase of activation and a later phase of deactivation of the transcription factor NFAT1." Mol Cell Biol **16**(7): 3945-3954.
- Loh, C., K. T. Shaw, J. Carew, J. P. Viola, C. Luo, B. A. Perrino and A. Rao (1996). "Calcineurin binds the transcription factor NFAT1 and reversibly regulates its activity." J Biol Chem **271**(18): 10884-10891.
- Maillet, M., J. Davis, M. Auger-Messier, A. York, H. Osinska, J. Piquereau, J. N. Lorenz, J. Robbins, R. Ventura-Clapier and J. D. Molkentin (2010). "Heart-specific deletion of CnB1 reveals multiple mechanisms whereby calcineurin regulates cardiac growth and function." J Biol Chem **285**(9): 6716-6724.
- McCaffrey, P. G., C. Luo, T. K. Kerppola, J. Jain, T. M. Badalian, A. M. Ho, E. Burgeon, W. S. Lane, J. N. Lambert, T. Curran and et al. (1993). "Isolation of the cyclosporin-sensitive T cell transcription factor NFATp." Science **262**(5134): 750-754.
- McKinsey, T. A. and E. N. Olson (1999). "Cardiac hypertrophy: sorting out the circuitry." Curr Opin Genet Dev **9**(3): 267-274.
- Mihl, C., W. R. Dassen and H. Kuipers (2008). "Cardiac remodelling: concentric versus eccentric hypertrophy in strength and endurance athletes." Neth Heart J **16**(4): 129-133.
- Mognol, G. P., F. R. Carneiro, B. K. Robbs, D. V. Faget and J. P. Viola (2016). "Cell cycle and apoptosis regulation by NFAT transcription factors: new roles for an old player." Cell Death Dis **7**: e2199.
- Molkentin, J. D., J. R. Lu, C. L. Antos, B. Markham, J. Richardson, J. Robbins, S. R. Grant and E. N. Olson (1998). "A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy." Cell **93**(2): 215-228.
- Moriya, M., K. Fujinaga, M. Yazawa and C. Katagiri (1995). "Immunohistochemical localization of the calcium/calmodulin-dependent protein phosphatase, calcineurin, in the

- mouse testis: its unique accumulation in spermatid nuclei." Cell Tissue Res **281**(2): 273-281.
- Muramatsu, T., P. R. Giri, S. Higuchi and R. L. Kincaid (1992). "Molecular cloning of a calmodulin-dependent phosphatase from murine testis: identification of a developmentally expressed nonneural isoenzyme." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(2): 529-533.
- Nakayama, H., I. Bodi, M. Maillet, J. DeSantiago, T. L. Domeier, K. Mikoshiba, J. N. Lorenz, L. A. Blatter, D. M. Bers and J. D. Molkentin (2010). "The IP3 receptor regulates cardiac hypertrophy in response to select stimuli." Circ Res **107**(5): 659-666.
- Nasmyth, K. (2005). "How might cohesin hold sister chromatids together?" Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **360**(1455): 483-496.
- Nigg, E. A. (1997). "Nucleocytoplasmic transport: signals, mechanisms and regulation." Nature **386**(6627): 779-787.
- Olivares-Florez, S., Czolbe, M., and Riediger, F. (2018). "Nuclear calcineurin is a sensor for detecting Ca²⁺ release from the nuclear envelope via IP₃R." J Mol Med **96**(11): 1239-1249.
- Park, S., M. Uesugi and G. L. Verdine (2000). "A second calcineurin binding site on the NFAT regulatory domain." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(13): 7130-7135.
- Parra, V. and B. A. Rothermel (2017). "Calcineurin signaling in the heart: The importance of time and place." J Mol Cell Cardiol **103**: 121-136.
- Pemberton, L. F. and B. M. Paschal (2005). "Mechanisms of receptor-mediated nuclear import and nuclear export." Traffic **6**(3): 187-198.
- Perrino, B. A., L. Y. Ng and T. R. Soderling (1995). "Calcium regulation of calcineurin phosphatase activity by its B subunit and calmodulin. Role of the autoinhibitory domain." J Biol Chem **270**(12): 7012.
- Perrino, C., S. V. Naga Prasad, L. Mao, T. Noma, Z. Yan, H. S. Kim, O. Smithies and H. A. Rockman (2006). "Intermittent pressure overload triggers hypertrophy-independent cardiac dysfunction and vascular rarefaction." J Clin Invest **116**(6): 1547-1560.
- Politino, M. and M. M. King (1990). "Calcineurin-phospholipid interactions. Identification of the phospholipid-binding subunit and analyses of a two-stage binding process." J Biol Chem **265**(13): 7619-7622.
- Rao, A., C. Luo and P. G. Hogan (1997). "Transcription factors of the NFAT family: regulation and function." Annu Rev Immunol **15**: 707-747.
- Ritter, O., S. Hack, K. Schuh, N. Rothlein, A. Perrot, K. J. Osterziel, H. D. Schulte and L. Neyses (2002). "Calcineurin in human heart hypertrophy." Circulation **105**(19): 2265-2269.
- Rout, M. P. and J. D. Aitchison (2001). "The nuclear pore complex as a transport machine." J Biol Chem **276**(20): 16593-16596.
- Rusnak, F. and P. Mertz (2000). "Calcineurin: form and function." Physiol Rev **80**(4): 1483-1521.

- Sankar, N., P. P. deTombe and G. A. Mignery (2014). "Calcineurin-NFATc regulates type 2 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor (InsP3R2) expression during cardiac remodeling." J Biol Chem **289**(9): 6188-6198.
- Shibasaki, F., E. R. Price, D. Milan and F. McKeon (1996). "Role of kinases and the phosphatase calcineurin in the nuclear shuttling of transcription factor NF-AT4." Nature **382**(6589): 370-373.
- Steinberg, S. F. (2000). "Many pathways to cardiac hypertrophy." J Mol Cell Cardiol **32**(8): 1381-1384.
- Stemmer, P. M. and C. B. Klee (1994). "Dual calcium ion regulation of calcineurin by calmodulin and calcineurin B." Biochemistry **33**(22): 6859-6866.
- Stewart, A. A., T. S. Ingebritsen, A. Manalan, C. B. Klee and P. Cohen (1982). "Discovery of a Ca²⁺- and calmodulin-dependent protein phosphatase: probable identity with calcineurin (CaM-BP80)." FEBS Lett **137**(1): 80-84.
- Taigen, T., L. J. De Windt, H. W. Lim and J. D. Molkentin (2000). "Targeted inhibition of calcineurin prevents agonist-induced cardiomyocyte hypertrophy." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(3): 1196-1201.
- Tanaka, N., T. Ryoke, M. Hongo, L. Mao, H. A. Rockman, R. G. Clark and J. Ross, Jr. (1998). "Effects of growth hormone and IGF-I on cardiac hypertrophy and gene expression in mice." Am J Physiol **275**(2 Pt 2): H393-399.
- Tang, Z., H. Shu, W. Qi, N. A. Mahmood, M. C. Mumby and H. Yu (2006). "PP2A is required for centromeric localization of Sgo1 and proper chromosome segregation." Dev Cell **10**(5): 575-585.
- Timmerman, L. A., N. A. Clipstone, S. N. Ho, J. P. Northrop and G. R. Crabtree (1996). "Rapid shuttling of NF-AT in discrimination of Ca²⁺ signals and immunosuppression." Nature **383**(6603): 837-840.
- Torgerson, T. R., A. D. Colosia, J. P. Donahue, Y. Z. Lin and J. Hawiger (1998). "Regulation of NF-kappa B, AP-1, NFAT, and STAT1 nuclear import in T lymphocytes by noninvasive delivery of peptide carrying the nuclear localization sequence of NF-kappa B p50." J Immunol **161**(11): 6084-6092.
- Trinkle-Mulcahy, L. and A. I. Lamond (2006). "Mitotic phosphatases: no longer silent partners." Curr Opin Cell Biol **18**(6): 623-631.
- Ueki, K., T. Muramatsu and R. L. Kincaid (1992). "Structure and expression of two isoforms of the murine calmodulin-dependent protein phosphatase regulatory subunit (calcineurin B)." Biochem Biophys Res Commun **187**(1): 537-543.
- van Berlo, J. H., M. Maillet and J. D. Molkentin (2013). "Signaling effectors underlying pathologic growth and remodeling of the heart." J Clin Invest **123**(1): 37-45.
- Wilkins, B. J. and J. D. Molkentin (2002). "Calcineurin and cardiac hypertrophy: where have we been? Where are we going?" J Physiol **541**(Pt 1): 1-8.

- Wu, X., T. Zhang, J. Bossuyt, X. Li, T. A. McKinsey, J. R. Dedman, E. N. Olson, J. Chen, J. H. Brown and D. M. Bers (2006). "Local InsP₃-dependent perinuclear Ca²⁺ signaling in cardiac myocyte excitation-transcription coupling." *J Clin Invest* **116**(3): 675-682.
- Yang, J., B. Rothermel, R. B. Vega, N. Frey, T. A. McKinsey, E. N. Olson, R. Bassel-Duby and R. S. Williams (2000). "Independent signals control expression of the calcineurin inhibitory proteins MCIP1 and MCIP2 in striated muscles." *Circ Res* **87**(12): E61-68.
- Yang, S. A. and C. B. Klee (2000). "Low affinity Ca²⁺-binding sites of calcineurin B mediate conformational changes in calcineurin A." *Biochemistry* **39**(51): 16147-16154.
- Yu, H., T. J. van Berkel and E. A. Biessen (2007). "Therapeutic potential of VIVIT, a selective peptide inhibitor of nuclear factor of activated T cells, in cardiovascular disorders." *Cardiovasc Drug Rev* **25**(2): 175-187.
- Zhu, J. and F. McKeon (1999). "NF-AT activation requires suppression of Crm1-dependent export by calcineurin." *Nature* **398**(6724): 256-260.
- Zhu, J., F. Shibasaki, R. Price, J. C. Guillemot, T. Yano, V. Dotsch, G. Wagner, P. Ferrara and F. McKeon (1998). "Intramolecular masking of nuclear import signal on NF-AT4 by casein kinase I and MEKK1." *Cell* **93**(5): 851-861.
- Zima, A. V., D. J. Bare, G. A. Mignery and L. A. Blatter (2007). "IP₃-dependent nuclear Ca²⁺ signalling in the mammalian heart." *J Physiol* **584**(Pt 2): 601-611.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Dissertation in allen Teilen selbständig angefertigt und keine anderen als die von mir genannten Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Weiterhin versichere ich, dass ich bisher keinen Promotionsversuch unternommen oder die vorliegende Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegt habe.

Hiermit bewerbe ich mich erstmals um den akademischen Grad „*Doctor rerum naturalium*“ (Dr. rer. nat.) durch ordentliche Promotion an der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg.

München, den 29.08.2019

Silvana Olivares-Baerwald