

**Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I
der Universität Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. G. Ertl**



**Untersuchung des Calcineurin Signalweges
bei der Myokardhypertrophie**

**Inaugural – Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der**

Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Jan Becher

aus Würzburg

Würzburg, September 2006

Referent: Priv.-Doz. Dr. O. Ritter

Korreferent: Prof. Dr. Dr. S. Engelhardt

Dekan: Prof. Dr. G. Ertl

Tag der mündlicher Prüfung: 16.02.2007

Der Promovend ist Arzt

Inhaltsverzeichnis

1.0	Einleitung	1
1.1	Myokardhypertrophie	1
1.1.1	Definition	1
1.1.2	Klinische Bedeutung	2
1.1.3	Auslösende Mechanismen	2
1.1.4	Wege der Signaltransduktion	3
1.1.4.1	Signaltransduktion via G-Protein-gekoppelten Rezeptoren	4
1.1.4.2	Signalwege der kardialen Hypertrophie	5
1.2	Calcineurin im Myokard	6
1.2.1	Morphologie	6
1.2.2	Der Calcineurin-Signalweg	7
1.2.3	Calcineurin bei der Myokardhypertrophie	9
1.2.3.1	Calcineurin als notwendiger Vermittler adulter Herzhypertrophie	9
1.2.3.2	Pharmakologische Beeinflussbarkeit des Calcineurins	10
1.2.3.3	Natürliche Inhibitoren von Calcineurin	12
1.2.4	Calcineurin bei der physiologischen Hypertrophie und bei Entwicklungsprozessen des Herzens	14
1.3	Zielsetzung der Arbeit	16
2.0	Methodik	17
2.1	Isolierung und Kultivierung neonataler Kardiomyozyten	17
2.1.1	Präparation	17
2.1.2	Pre-Plating	18
2.1.3	Plating	18
2.2	HEK 293-Zellen	19
2.3	Transfektion	19
2.4	Stimulation der Zellkulturen	20

2.5	Immunfluoreszenz	21
2.5.1	Patientenpopulation	21
2.5.2	Calcineurinfärbung	21
2.5.3	Troponin- und Kernfärbung	22
2.5.4	Mikroskopie	23
2.6	Methoden für das Arbeiten mit DNA	23
2.6.1	Transformation chemisch kompetenter Bakterien mit Plasmiden	23
2.6.2	Mini- und Maxi-Präparation von Plasmid-DNA	24
2.6.3	Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA	25
2.6.4	Restriktionsverdau	25
2.6.5	Agarose-Gelelektrophorese	26
2.6.6	Eluierung spezifischer Fragmente aus Agarose-Gelen	26
2.6.7	Auswahl der Plasmide	27
2.6.7.1	pcDNA-DEST53	27
2.6.7.2	pCMV-SPORT6 mit Calcineurin A β	27
2.6.8.	Herstellung eines GFP-Calcineurin-Konstruktes	28
2.6.9	Herstellung einer dauerhaft aktiven Form von Calcineurin A β	29
2.7	Herstellung von Proteinextrakten für Luciferase-Assays und Luciferasemessung	30
2.8	Calcineurin Protein-Expression	31
2.8.1	Nukleäre Proteinextraktion	31
2.8.2	Proteinkonzentrationsbestimmung	31
2.8.3	Western-Blot-Analyse	32
2.9	Proteolytische Fragmentierung, Immunopräzipitation und Sequenzierung von Calcineurin	34
2.9.1	Verdau von Calcineurin durch μ -Calpain	34
2.9.2	Immunopräzipitation von Calcineurin	34
2.10	Auswertung, Statistik und graphische Bildbearbeitung	35

3.0	Resultate	36
3.1	Proteolyse von Calcineurin im humanen Myokard	36
3.2	Calpain-Aktivität	39
3.3	Calcineurin A in nukleären Extrakten und Zytosol	41
3.4	Lokalisation von Calcineurin im Humanen Myokard	45
3.5	Transfektion von GFP-Calcineurin A Plasmiden	46
3.5.1	Zelluläre Lokalisation GFP-fusionierten Calcineurin A	46
3.5.2	Zelluläre Lokalisation von GFP-fusionierten Calcineurin A ohne Autoinhibitorische Domäne	48
3.6	Calcineurinaktivität im Luciferase-Assay	50
4.0	Diskussion	53
4.1	Calcineurin im humanen Myokard	53
4.2	Calpain ist verantwortlich für Calcineurinspaltung/aktivierung	55
4.3	Calcineurin ist im aktivierten Zustand nukleär lokalisiert	57
4.4	Calcineurinaktivität	59
4.5	Model der dualen Aktivierung von Calcineurin	60
5.0	Literaturverzeichnis	62
6.0	Appendix	76
6.1	Verwendete Chemikalien und Materialien	76
6.2	Geräteverzeichnis	78
6.3	Verwendete Lösungen	79
6.4	Abkürzungsverzeichnis	83

Danksagung

Lebenslauf

1.0 Einleitung

1.1 Myokardhypertrophie

1.1.1 Definition

Die Myokardhypertrophie ist im klinischen Sprachgebrauch definiert als eine Volumen- und Gewichtszunahme des Herzgewebes, die alters- und geschlechtsspezifische Normwerte überschreitet und eine Reaktion auf sowohl pathologische als auch physiologische Stimuli darstellen kann. Die ventrikuläre Hypertrophie wird generell entweder durch exzentrisches oder konzentrisches Remodeling charakterisiert. Die exzentrische Hypertrophie ist gekennzeichnet durch eine Vergrößerung der ventrikulären Wandstärke und des Herzkammervolumens, typischerweise bedingt durch eine erhöhte Volumenbelastung z.B. in Folge einer chronischen Klappeninsuffizienz. Die konzentrische Hypertrophie ist durch eine Verdickung der ventrikulären Wand auf Kosten des Kammervolumens gekennzeichnet, resultierend aus einer erhöhten Druckbelastung des Herzens z.B. in Folge einer arteriellen Hypertonie oder einer Aortenklappenstenose (4).

Die pathologisch-anatomische Definition der Hypertrophie ist die Volumenzunahme der Zelle ohne zusätzliche Zellteilung. Die Herzhypertrophie beruht also vor allem auf einer Größenzunahme der Kardiomyozyten, welche früh postnatal ihre Teilungsfähigkeit verlieren und sich daher in einem postmitotischen Status befinden (5). Im Gegensatz zur entwicklungsbedingten und physiologische Herzhypertrophie kommt es bei der pathologischen Hypertrophie auch zu einer Vermehrung (Hyperplasie) der Bindegewebszellen (Fibroblasten) und der extrazellulärer Matrix (Kollagen und Fibronectin) (1).

1.1.2 Klinische Bedeutung

Die Hypertrophie erlaubt es dem Myokard seine funktionelle Leistung an Veränderungen anzupassen, welche z.B. entwicklungsbedingt sein können, auf physiologischer Mehrbeanspruchung beruhen oder durch kardiovaskuläre Erkrankungen bedingt sind. Die Herzmuskelhypertrophie stellt also eine kompensatorische Anpassung dar, welche zunächst die ventrikuläre Wandspannung normalisiert und die Auswurfleistung sicher stellt. Mit der Framingham Studie (6) wurde jedoch erstmals die linksventrikuläre Hypertrophie (LVH) als eigenständiger Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen beschrieben. So gilt die LVH als Risikofaktor für die Entstehung von Herzrhythmusstörung und den plötzlichen Herztod (7). Eine dauerhafte Herzhypertrophie ist mit einer erhöhten Inzidenz für kardiovaskuläre Erkrankungen und einer erhöhten Mortalität korreliert (8). Sie ist häufig der erste Schritt zur Progression in eine Herzinsuffizienz, die das Unvermögen des Herzens, den Anforderungen der Peripherie an arteriellem Zufluss und venösem Abfluss gerecht zu werden, beschreibt.

1.1.3 Auslösende Mechanismen

Die Hypertrophie der Kardiomyozyten ist die zelluläre Antwort auf biomechanischen Stress. Sie wird initiiert durch endokrine, parakrine und autokrine Faktoren, welche eine Vielzahl von membrangebundenen Rezeptoren aktivieren können. Solche Faktoren, welche auf para- oder endokrinen Wege die kardiale Hypertrophie bedingen können, sind z.B. Ang II (9), Katecholamine (10, 11), Schilddrüsenhormone (12) oder IGF (13).

Die Umwandlung der auf die Zelle wirkenden mechanischen Kräfte in biochemische Signale wird zum Großteil über Integrine vermittelt. Integrine sind eine Gruppe von Zelloberflächen-Proteinen, welche die extrazelluläre Matrix mit dem Zytoskelett verbinden und somit die physikalische Integration des intra- und extrazellulären Raumes gewährleisten (14).

Die Rezeptoraktivierung triggert zahlreiche zytoplasmatische Signalwege, welche schließlich die Regulation der Genexpression der Zellen beeinflussen, was typischerweise die Re-Expression fetaler Isoformen von kontraktilen Proteinen einbezieht. Die Kardiomyozytenvergrößerung, eine gesteigerte Proteinsynthese und die stärkere Organisation der Sarkomere sind die resultierenden phenotypischen Veränderungen der Zelle (15).

Auch wenn die Hypertrophie induzierenden Stimuli überwiegend identifiziert sind und den Hauptangriffspunkt der heutigen pharmakologischen Therapie darstellen, ist die Kontrolle der Herzhypertrophie mit den heutigen Mitteln nicht immer möglich. Daher liegt das Hauptaugenmerk der heutigen Forschung in der Aufdeckung und Beeinflussung der Signaltransduktionswege, die das Wachstumssignal vom Rezeptor in den Zellkern weiterleiten und damit die Genexpression verändern.

1.1.4 Wege der zelluläre Signalübertragung

Schätzungen besagen, dass von den ca. 50000 menschlichen Genen ca. 1100 Kinasen und ca. 300 Phosphatasen sind (16). Diese Zahlen zeigen wie komplex die humanen Signaltransduktionskaskaden den zellulären Stoffwechsel regulieren.

Besonders in den letzten Jahren ist ein signifikanter Fortschritt in der Identifizierung der hypertrophen Signalwege im Myokard zu verzeichnen (Abb. 1 aus (1)). Hier sollen nur die Wichtigsten exemplarisch erläutert werden.

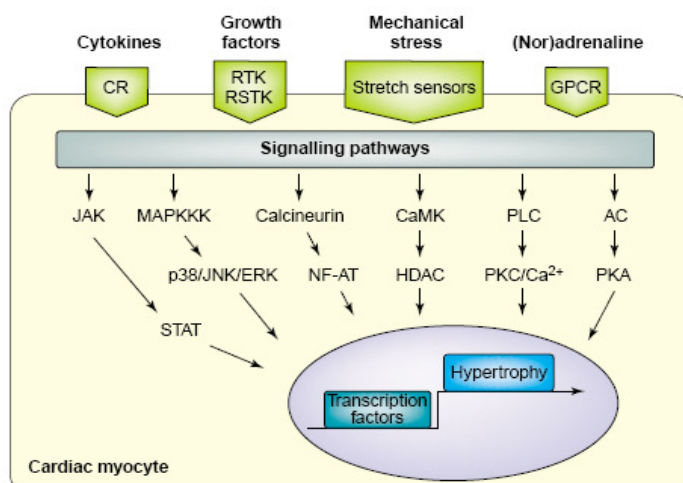


Abb. 1, (aus (1)) Signalwege der Herzhypertrophie. Verschiedene Stimuli aktivieren unterschiedliche Rezeptoren: G-Proteingekoppelten Rezeptor (GPCR), Tyrosin-Kinase Rezeptor (RTK), Serin/Thyrosin-Kinase Rezeptor (RSK), Kardiostrophin Rezeptor (CR). Eine Reihe von unterschiedlichen Signalkaskaden werden ausgelöst, welche sich auf verschiedenen Ebenen überschneiden und beeinflussen.

1.1.4.1 Signaltransduktion via G-Protein-gekoppelten Rezeptoren

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren haben eine große Bedeutung bei der Signaltransduktion im kardiovaskulären System. Veränderungen der Signaltransduktion spielen bei der Hypertrophieentstehung des Herzens eine wichtige Rolle.

Die heterotrimeren G-Proteine übertragen Signale vom 7-transmembran Rezeptor. Alle heterotrimeren G-Proteine bestehen aus separaten G_{α} - und $G_{\beta\gamma}$ -Untereinheiten. Wird ein membrangebundener Rezeptor durch einen Agonisten besetzt, kommt es zu einem GDP-GTP-Wechsel an der G_{α} -Untereinheit und zur Dissoziation der G_{α} - von der $G_{\beta\gamma}$ -Untereinheit (17). Diese freien G-Protein-Untereinheiten können die Aktivität nachgeschalteter Effektorproteine regulieren z.B. die Adenylatcyclase (AC), die Phospholipase C (PLC), die Mitogen-Activated Protein Kinasen (MAPK), die Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K) oder Ras Proteine (18, 19, 20).

Im kardiovaskulären System sind drei funktionelle Klassen dieser G-Proteine von Bedeutung für akut hämodynamische und chronisch morphologische Effekte. β -Adrenorezeptoren sind mit dem G_{α_s} -Protein gekoppelt und vermitteln eine akute Steigerung der Herzfrequenz und Kontraktilität als Antwort auf die Stimulation mit Katecholaminen (21). Cholinerge Rezeptoren sind typischerweise mit G_{α_i} -Proteinen gekoppelt und werden durch Acetylcholin stimuliert. Die dritte Klasse von Rezeptoren, welche an G_{α_q} -Proteine gekoppelt sind, schließen den Angiotensin II-, Endothelin-, und α -adrenergen-Rezeptor ein. Die Aktivierung dieser Rezeptoren spielt eine entscheidende Rolle bei der hypertrophen Reaktion des Herzens auf pathologischen Stimuli. Durch Überexpression dieser Rezeptoren oder der nachgeschalteten Effektoren konnte eine kardiale Hypertrophie ausgelöst werden (22).

Verschiedene Stimuli aktivieren neben den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCRs) auch Rezeptoren wie den Tyrosin-Kinase Rezeptoren (RTK), die Serin/Thyrosin-Kinase Rezeptoren (RSKT) oder die Kardiotrophin Rezeptoren (CR), die unabhängig voneinander intrazelluläre Signalwege aktivieren können.

Ebenso werden Signalwege durch erhöhte intrazelluläre Calcium-Konzentrationen oder durch mechanische Stressestimuli aktiviert (Abb. 1)

1.1.4.2 Signalwege der kardialen Hypertrophie

Für verschiedene Signalwege konnte nachgewiesen werden, dass diese an der hypertrophen Reaktion des Herzens beteiligt sind.

MAPKs (mitogen-aktiviert protein kinase) Signalwege sind eine wichtige Verbindung zwischen den externen Stimuli und dem Zellkern über die Phosphorylierung und Regulierung verschiedener Transkriptionsfaktoren. MAPKs können in drei Subfamilien eingeteilt werden: ERK (extracellular-signal-regulated kinase), JNKs (Jun N-terminal kinases) und p38 MAPKs (23).

MAPK Signalwege werden durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, Tyrosin-Kinase Rezeptoren, Proteinkinase C, Calcium oder Stress Stimuli aktiviert (24, 25). Nachgeschaltet erfolgt die Aktivierung einer Kaskade von Kinasen, welche schließlich in der Phosphorylierung und Aktivierung der drei terminalen MAPKinasen (ERK, JNK, p38) münden. Diese können wiederum Transkriptionsfaktoren aktivieren und damit die Transkription von Genen, die z.B. bei der Hypertrophie hochreguliert werden, induzieren (26, 27).

Studien belegen, dass auch die Proteinkinase C (PKC) Familie im Herzgewebe eine Bedeutung als Hypertrophie-Signalweg (28, 29) hat, ebenso die niedrigmolekularen GTPasen (Ras, Raf-1, RhoA) (30) und die Phosphoinositol 3-Kinase (20, 31).

Calcium ist ein wichtiger Regulator für kardiale Kontraktilität, Wachstum und Gen-Expression (32). Die Calcium abhängigen Signalmoleküle, inklusive dem Calcineurin und der Ca^{2+} /Calmodulin-Kinase (CaMK) sind auch in der Lage hypertrophe Veränderungen der Kardiomyozyten hervorzurufen und die kardiale Genexpression zu induzieren (33). Die MEF2-Transkriptionsfaktoren,

die durch Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Signalwege induziert werden, sind an der Transkription der kardialen Hypertrophie-Gene beteiligt. Die Überexpression von CaMK mit resultierender Stimulation der MEF2-Aktivität führte in Studien zur Herzhypertrophie (34). Auf die Rolle des Calcineurin-Signalweges, bei der Entstehung der kardialen Hypertrophie wird unten genau eingegangen.

1.2 Calcineurin im Myokard

1.2.1 Morphologie von Calcineurin

Die Calcium-abhängige Protein-Phosphatase Calcineurin wurde von Dr. Claude Klee erstbeschrieben und benannt nach deren Regulation durch Calcium und deren Anreicherung im neuronalen Gewebe (35).

Die Serin-Threonin-Protein-Phosphatase Calcineurin ist ein Heterodimer, bestehend aus Calcineurin A (CnA), eine 58 - 61 kDa große Katalytische und Calmodulin-bindende Untereinheit, und Calcineurin B (CnB), eine 19 kDa große Ca^{2+} -bindende Regulatorische Untereinheit, welche fest mit CnA verbunden ist (36). Bei Säugetieren kodieren drei unabhängige Loci für die Katalytische Untereinheit (CnA α , CnA β und CnA γ), während 2 Loci für die Regulatorische Untereinheit (CnB1 und CnB2) codieren. Diese reguliert zusammen mit Calmodulin die Aktivität der Katalytischen Einheit (37). Mit Ausnahme von variablen C- und N-terminalen Resten zeigen die α -, β -, und γ -Isoformen des CnA eine 83-89%ige Homologie in den verbleibenden 90% ihrer Sequenz.

Neben der N-terminalen Katalytischen Domäne/Phosphatase-Domäne besitzt CnA weitere prominente Domänen: eine CnB-bindende Helix, eine Calmodulin-bindende Domäne und eine Autoinhibitorische Domäne (Abb. 2). Inmitten des aktiven Zentrums der Phosphatase-Untereinheit befindet sich ein Zn-Fe Zentrum, welches für die enzymatische Aktivität von CnA notwendig ist (38) und durch oxidative Prozesse geschädigt werden kann (39).

Calcineurin A

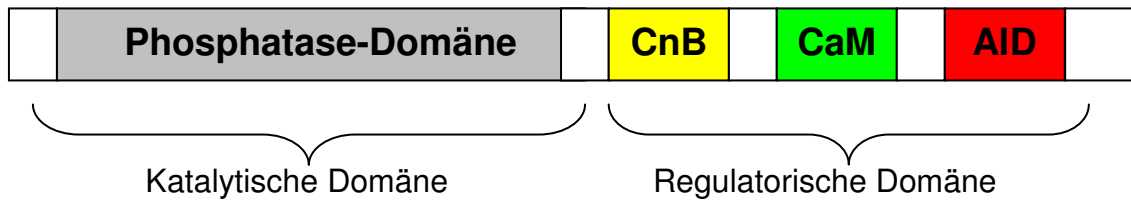


Abb. 2, Schematische Darstellung der Calcineurin A Untereinheit. Phosphatase-Domäne (AS 70-330), Regulatorische Domäne mit Calcineurin B – Bindungsdomäne (CnB) (AS 345-365), Calmodulin – Bindungsdomäne (CaM) (AS 387-411) und Autoinhibitorische Domäne (AID) (AS 463-487)

Das 19 kDa große Calcineurin B besitzt vier „EF-Hand“ Ca^{2+} -bindende Motive und heftet sich schon bei micromolaren Konzentrationen von Ca^{2+} fest an CnA (40). CnB ist eigentlich nicht für die Enzymaktivität notwendig, die CnB-Untereinheit dient jedoch als stabilisierendes strukturelles Element des Enzyms (41).

Bei einem niedrigen Calcium-Spiegel in der Zelle ist Calmodulin nicht an den CnA/CnB-Komplex gebunden und die Autoinhibitorische Domäne blockiert sterisch das aktive Zentrum der Phosphatase. Kommt es zu einer Konzentrationssteigerung von Calcium, bindet dieses an die „EF-Hand“ Ca^{2+} -bindenden Motive des Calmodulins, was zu einer Interaktion von Calmodulin und Calcineurin führt. Daraufhin kommt es zu einer Konformationsänderung der Autoinhibitorische Domäne, so dass diese nicht mehr das Phosphatasezentrum blockiert, was eine Aktivierung des Enzyms zu Folge hat (42).

Die Lokalisation von CnA γ und CnB2 ist zumeist auf das Hodengewebe beschränkt, während sich CnA α , CnA β und CnB1 in vielen Geweben, inklusive dem Herzen, nachweisen lässt (43).

Bis heute konnte die Beteiligung von Calcineurin an Entwicklungsprozessen und der Stress-Adaptation multipler Organsysteme von Säugern charakterisiert werden (44).

1.2.2 Der Calcineurin-Signalweg

Die physiologische Rolle von Calcineurin wurde zuerst für T-Zellen beschrieben. Eine Erhöhung der zytoplasmatischen Calcium-Konzentration begünstigt hier die Assoziation von Calmodulin mit Calcineurin, was schließlich zu einer Aktivierung des Enzyms führt. Calcineurin dephosphoryliert Transkriptionsfaktoren, was die nukleäre Translokation bzw. die DNA-Bindung dieser ermöglicht. Im Falle der Lymphozyten führt dies zu einer Aktivierung der Gene für die Immunantwort wie dem Interleukin 2-Gen, d.h. der Calcineurin-Signalweg verbindet in den Lymphozyten den durch den Antigen-Rezeptor ausgelösten Ca^{2+} -Influx mit der Aktivierung der Interleukin 2-Gene (44).

Die NFAT (nuclear factor of activated T-cells)-Proteine sind die am besten charakterisierten Ziele von Calcineurin. Bisher wurden fünf dieser NFAT-Transkriptionsfaktoren charakterisiert, wobei vier (NFATc1 - NFATc4) durch Calcineurin reguliert werden (45). In unstimulierten Zellen verbleiben NFATc-Faktoren in einem hyperphosphorylierten Status zytosolisch. Die nukleäre Lokalisation von NFAT wird direkt durch Calcineurin-vermittelte Dephosphorylierung der N-terminalen Serin-reichen Region induziert, was die nukleäre Import-Sequenz (NLS) freilegt und zur Translokation von NFAT in den Zellkern führt (46). NFATc-Faktoren können nur sehr schwache DNA-Bindungen herstellen. Um die NFAT-DNA-Bindung zu festigen, interagieren die Faktoren mit anderen nukleären Transkriptionsfaktoren wie AP-1 (c-Jun/c-Fos), GATA-4 und MEF2 (45). Die nukleäre NFATc-Aktivität wird durch eine Reihe von parallel ablaufenden Signalwegen beeinflusst, die bestimmte Gruppen von Kinasen stimulieren. Diese Kinasen begünstigen durch die Rephosphorylierung der NFATc-Residuen, welche zuvor durch Calcineurin dephosphoryliert wurden (47), den nukleären Export oder blockieren den nukleären Import der NFATc-Transkriptionsfaktoren. Mehrere Reports zeigen, dass die Glykogen-Synthetase-Kinase-3 β (GSK-3 β) (48), c-Jun N-terminal-Kinase (JNK) (49) und p38-MAP-Kinase (50), Casein-Kinase 1 (CK1) (51), Proteinkinase A (PKA) (52) und die Mitogen aktivierte Protein-Kinase-Kinase-Kinase 1 (MEKKK1) indirekt

alle den Crm1-Exportprotein-vermittelten nukleären Export der NFATc-Faktoren begünstigen. Um also eine effektive Transkriptionsaktivität der NFATc-Faktoren aufrecht zu erhalten, ist aktiviertes Calcineurin, nicht nur zur Förderung des nukleären Imports sondern auch zur Unterdrückung des NFAT nukleären Exports (53), notwendig.

Der MEF2 (myocyt enhancer factor 2)-Transkriptionsfaktor ist ein weiteres Ziel, das von Calcineurin in unterschiedlichen Zellen aktiviert wird. MEF2-Proteine liegen ausschließlich nukleär vor und sind in ruhenden Zellen durch die Bindung an Klasse II Histon-Deacetylasen (HDACs) inaktiv. Calcineurin kann MEF2 binden und dephosphorylieren und damit die DNA-Bindung und Gen-Expression induzieren (54). Neben dem Calcineurin sind zur Aktivierung von MEF2 noch andere Calcium-regulierte Signalwege (z.B. CaMK) erforderlich (34), die zunächst den MEF2-HDAC-Komplex sprengen müssen (55) und dadurch das MEF2 freigegeben (56).

1.2.3 Calcineurin bei der Myokardhypertrophie

1.2.3.1 Calcineurin als notwendiger Vermittler adulter Herzhypertrophie

1998 wurde von Molkentin und Kollegen (57) der Calcineurin-Signalweg im Herzen entdeckt. Auf der Suche nach interagierenden Faktoren des kardialen Transkriptionsfaktors GATA-4 wurde eine spezifische Interaktion zwischen der Zink-Finger-Domäne von GATA-4 und der DNA-Bindungsdomäne von NFATc4 beobachtet. GATA-4 reguliert als Transkriptionsfaktor fetale kardiale Gene nicht nur vor der Geburt, sondern aktivieren diese auch als Reaktion auf Stresssignale im adulten Herzen (34, 58). Daher wurde angenommen, dass die Ca^{2+} -Calmodulin-abhängige Phosphatase Calcineurin und der nachgeschaltete transkriptionelle Effektor NFAT eine spezifische Rolle bei der hypertrophen Reaktion im Herzen haben.

Um die funktionelle Signifikanz des Calcineurin-NFATc4-Signalweges *in vivo* zu überprüfen, wurden verschiedene Linien transgener Mäuse kreiert. Die transgene Expression der dauerhaft aktiven Formen von Calcineurin oder NFATc4 im Mausherz, unter der Benutzung des Kardiomyozyten spezifischen α -MHC (α -myosin heavy chain)-Promotors, induzierte eine massive Myokardhypertrophie oftmals mit Ausbildung einer schweren dilatativen Kardiomyopathie, interstitiellen Fibrose, Herzinsuffizienz und dem Eintritt des plötzlichen Herztodes. Die Induktion fetaler Programme der Gen-Expression konnte an Hand der Hochregulation von β -MHC, α -Skeletal-Aktin, und BNP in den transgenen Herzen belegt werden. Die pharmakologische Behandlung der Calcineurin-transgenen Mäuse mit dem Calcineurin-Inhibitor CsA konnte die hypertrophe Reaktion unterdrücken. CsA war jedoch nicht in der Lage, die Herzhypertrophie in transgenen Mäusen zu vermindern, in denen eine dauerhaft aktive Form von NFATc4 überexprimiert wurde. Die NFAT-Transkriptionsfaktoren sind im Signalweg dem CsA-sensitiven Calcineurin nachgeschaltet, daher blieb die Hypertrophie der NFAT-transgenen Mäuse durch CsA unaffektiert (59).

Auch in den *in vitro*-Studien konnte das hypertrophe Ansprechen von Kulturen neonataler Kardiomyozyten auf die Stimulation mit Ang II und Phenylephrin durch CsA unterdrückt werden.

Diese initialen Studien zeigten, dass der von den T-Lymphozyten beschriebene Calcineurin-Signalweg auch im Myokard existiert und im Herzen in der Aktivierung fetaler kardialer Gene mündet, was die Hypertrophie des Herzens induziert.

1.2.3.2 Pharmakologische Beeinflussbarkeit des Calcineurins

Cyclosporin A (CsA) und Tacrolimus (FK506) sind pharmakologische Inhibitoren von Calcineurin, welche die Transplantationschirurgie auf Grund deren Fähigkeit, die Immunantwort auf das Fremdgewebe zu unterdrücken, revolutionierten. Der Mechanismus der Wirkung von CsA und FK506 verläuft im

Gegensatz zu vielen anderen Medikamenten indirekt über die Bindung an endogene Immunophilin-Proteine (CsA an Cyclophilin; FK506 an FKBP12) (60). Der Medikament-Protein-Komplex bindet im Zwischenraum des CnA/CnB-Komplexes und blockiert somit die Phosphataseaktivität (38) (Abb. 3).

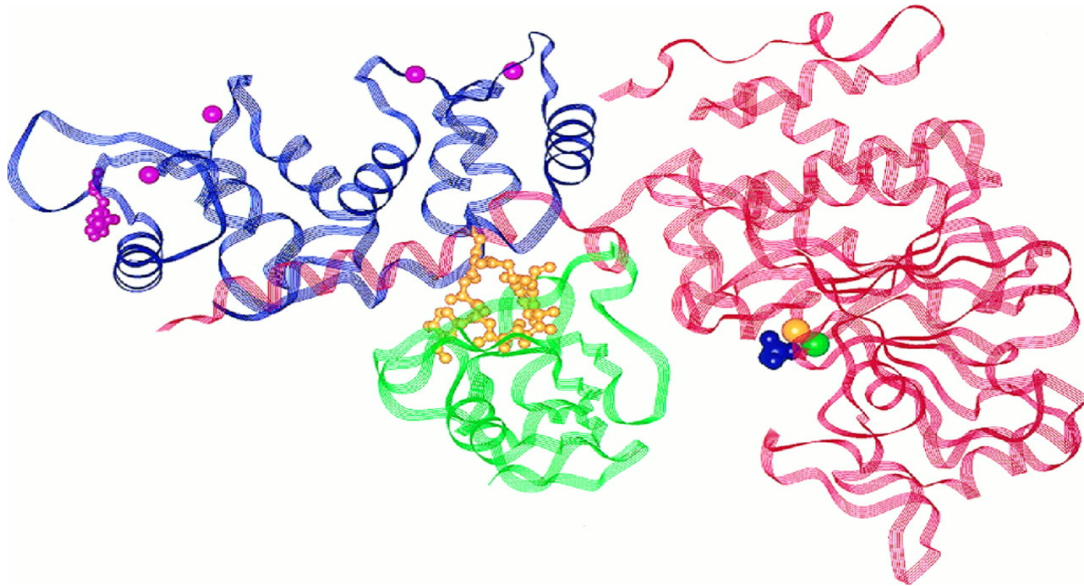


Abb. 3, Kristallstruktur von Calcineurin (ohne Regulatorische Domäne) im Komplex mit FKBP12-FK506. Calcineurin A wird in rot dargestellt, Calcineurin B in blau. Fe und Zn im aktiven Zentrum sind als grüne und rote Kugel, gebundenes Phosphat in blau gezeigt. Die 4 Ca²⁺, welche am CnB gebunden sind, werden als Kugeln (pink) dargestellt. FKBP ist als grüne Struktur, daran gebunden FK506 als gelbe Struktur zu sehen. (Protein Daten Bank – 1TCO)

Seit dem initialen Report von Molkenkin und Kollegen wurde durch den Einsatz von CsA oder FK506 in einer Vielzahl von Studien versucht, die Rolle des Calcineurin-Signalweges bei der Entstehung der Myokardhypertrophie an Hand verschiedener Hypertrophie-Modelle zu bestimmen (Abb. 4).

In den *in vitro*-Studien konnte CsA die Kulturen neonataler Kardiomyozyten vor hypertrophen Wachstum bei Stimulation dieser mit Ang II, Phenylephrin oder Endothelin-1 schützen (57). Die bis heute mehr als 30 veröffentlichten *in vivo*-Studien bei denen CsA und FK506 zum Einsatz kamen, zeigten jedoch unterschiedlichste Ergebnisse (61). Ein Großteil dieser Studien konnte bestätigen, dass durch den Einsatz von CsA und FK506 und damit der Blockierung von Calcineurin, eine signifikante Verminderung der Hypertrophie

in unterschiedlichen transgenen (Überexpression von aktivierten CnA), operativen (z.B. Aortenbanding) und pharmakologischen (Aldosteroninfusion) Hypertrophie-Modellen zu erreichen war (Abb. 4). In anderen Tiermodellstudien hatte der Einsatz der Medikamente keinen Effekt oder führte sogar zu einer Verstärkung der Herzhypertrophie. Als Gründe für die Entstehung dieser widersprüchlichen Ergebnisse werden der uneinheitliche Versuchsaufbau sowie vor allem die nicht spezifischen Effekte von CsA und FK506 angenommen. So beeinflussen die Calcineurin-Inhibitoren die Kardiomyozyten durch Störung von Membranproteinen (L-Typ Calcium Kanal) (62) sowie durch Eingriff in die Funktion des sarkoplasmatischen Retikulums (63) und der Mitochondrien (2). Weiterhin kamen in den Tierversuchen Medikamentendosen zum Einsatz, welche 10fach höher lagen als bei der immunsuppressiven Therapie, was auch zu erheblichen Nebenwirkungen in anderen Organsystemen führte. Z.B. kann die starke renale Toxizität (64) ein Grund für eine sekundäre arterielle Hypertonie sein, was wiederum die Hypertrophieentstehung begünstigt. Alle diese Effekte könnten die eigentlich antihypertrophe Wirkung der Calcineurin-Blockierung verfälschen.

1.2.3.3 Natürliche Inhibitoren von Calcineurin

Um viele der Komplikationen, die aus der Benutzung von CsA und FK506 als Calcineurin-Inhibitoren resultieren zu vermeiden, wurden zahlreiche genetischen Modelle der Calcineurin-Blockierung etabliert (Abb. 4).

Bis heute sind vier zelluläre Inhibitoren des Calcineurin-Phosphatase-Komplexes identifiziert, welche alle die nukleäre Translokation von NFAT verhindern können. Dazu gehört das Calcineurin-bindende AKAP79 (A-kinase anchoring protein 79), das die Interaktion mit dem Substrat verhindert (65). Ein zweiter Calcineurin-Inhibitor ist das Cain-Protein, welches non-kompetitiv die Calcineurinaktivität blockiert und sich typischerweise in den Geweben nachweisen lässt, wo auch Calcineurin stark exprimiert wird (66). Ein dritter

Inhibitor ist das dem CnB analoge CHN, welches sich an CnA bindet aber nicht die Enzymaktivität induzieren kann (67). Weiterhin wurde ein als Down Syndrom Critical Region 1 Gen, auch als MCIP 1 (myocyte-enriched calcineurin interacting protein-1) bezeichnetes Protein, identifiziert, welches die NFATc-Dephosphorylierung und Translokation blockiert (68, 69).

Die Überexpression von MCIP-1 im Herzen konnte die hypertrophe Reaktion auf aktiviertes Calcineurin, Druckbelastung und Mehrbeanspruchung im transgenen Tiermodell unterdrücken (70). Interessanterweise wird MCIP-1 im Herzen hochreguliert als Antwort auf aktiviertes Calcineurin, wobei es sich um ein endogenen Feed-Back Mechanismus handeln könnte (71). Auch die transgene Überexpression von Cain/Cabin-1 und AKAP79 führten zu einer deutlichen Abschwächung der hypertrophen Reaktion nach Aortenbanding und Isoproterenol-Infusion (72). Die gezielte Inhibition von Calcineurin in Kardiomyozytenkulturen durch adenovirale Expression von Cain und AKAP79 unterdrückte die Calcineurinaktivität und die hypertrophe Reaktion der Kardiomyozyten auf die Stimulation mit Ang II, Phenylephrin oder FCS (73). Diese *in vivo*- und *in vitro*-Ergebnisse zeigen im Gegensatz zu den pharmakologischen Studien einheitlich, dass der Calcineurin-NFAT-Signalweg eine zentrale Rolle bei der Entstehung der Herzhypertrophie hat.

Die Kinasen JNK, p38 oder GSK-3 β sind an der Rephosphorylierung von NFAT beteiligt und ermöglichen dadurch den nukleären Export von NFAT und die Beendigung der Transkription kardialer Gene. Die transgene Überexpression von defekten JNK1/2-, p38 α -, GSK-3 β -Mutanten führte zu spontaner Myokardhypertrophie (74, 75) . JNK, p38 und GSK-3 wirken somit als antihypertrophe Faktoren *in vivo*, welche die Calcineurin-vermittelte NFAT-Aktivierung aufheben können.

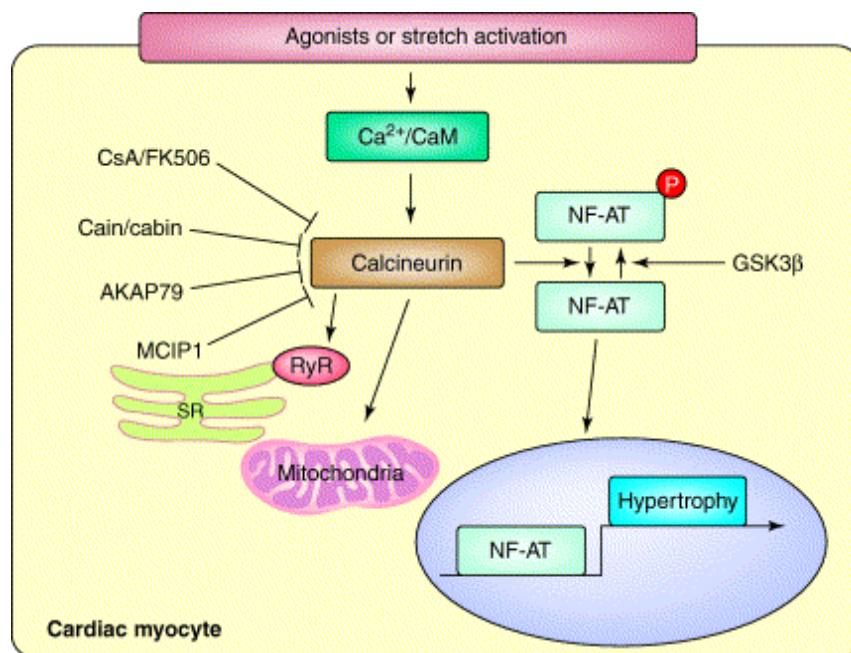


Abb. 4, Calcineurin-Signalweg in der Herzzelle. Eine Vielzahl von Stimuli kann den Calcineurin-Signalweg über eine Erhöhung des intrazellulären Ca²⁺ und anschließender Bindung des Ca²⁺/Calmodulin (CaM) an CnA aktivieren. Die Phosphatase-Aktivität des Calcineurins führt zur Dephosphorylierung von NFAT mit nachfolgender nukleärer Translokation der Transkriptionsfaktoren und Förderung der Hypertrophieentwicklung. Weitere Ziele von Calcineurin sind die Mitochondrien (mitochondriales Membran-Potential) (2) und die Ryanodine Rezeptoren (RyR) des sarkoplasmatischen Retikulums (SR) (3). Die Inhibition von Calcineurin ist mit pharmakologischen (CsA/FK506) und durch endogene Inhibitoren, wie Cain/Cabin, AKAP79 und MCIP1 möglich. GSK 3β ist eine der Kinasen, welche NFAT rephosphorylieren und damit inaktivieren kann (aus (1)).

1.2.4 Calcineurin bei der physiologischen Hypertrophie und bei Entwicklungsprozessen des Herzens

Da Calcineurin eine zentrale Stellung bei der pathologischen Hypertrophie des Herzens einnimmt ist die Phosphatase ein attraktives therapeutisches Ziel zur Verhütung bzw. zur Therapie der Herzinsuffizienz. Es gibt jedoch Hinweise, dass eine basale Calcineurinaktivität im Herzen notwendig ist. So wurde die belastungsinduzierte Hypertrophie in MCIP1-transgenen Herzen unterdrückt (70), was vermuten lässt, dass Calcineurin auch eine Rolle bei der physiologischen Hypertrophie des Herzens spielt. Die physiologische

Hypertrophie wird induziert durch regelmäßiges Training, welches das Wachstum der Myozyten fördert. Diese Veränderungen sind reversibel und führen nicht zur Dekompensation (76). In der postnatalen Phase macht das Herz wie bei der trainingsassoziierten Hypertrophie eine wachstumsbedingte Hypertrophie als Anpassung auf veränderte hämodynamische Bedingungen durch. Auch bei dieser Art von Hypertrophie scheint Calcineurin von entscheidender Bedeutung zu sein. Transgene Tiere, in denen Cain und AKAP79 stark überexprimiert waren, verendeten zwei Wochen nach der Geburt mit stark atrophierten Herzen (72). Tierreihen in denen MCIP1 überexprimiert wurde überlebten zwar die postnatale Entwicklung, die adulte Herzgröße war jedoch 5-10% kleiner als in der Kontrollreihe, was eine Abschwächung der entwicklungsbedingten Hypertrophie des Herzens vermuten lässt (70). In CnA β -Knockout-Mäusen ließ sich eine verringerte Calcineurinaktivität sowie eine abgeschwächte Hypertrophiereaktion auf Ang II-Infusion, Isoproterenol-Infusion und Aortenbanding nachweisen (77). Diese Versuchsreihe zeigte jedoch auch eine Reduktion der basalen Herzgröße um 12%.

Um das Blut effektiv in eine Richtung pumpen zu können, benötigt das Herz feine Herzklappen. Malformationen dieser Herzklappen sind eine der häufigsten kongenitalen Abnormalitäten des Menschen. Studien mit Calcineurin- und NFATc1-defizienten Mäusen lassen annehmen, dass diese Proteine an der embryonalen Genese der Herzklappen beteiligt sind. NFATc1 kann während der Herzentwicklung nur in Zellen nachgewiesen werden, welche an der Bildung der Klappen und der septalen Strukturen beteiligt sind. So versagte die Bildung der Herzklappen des Ausflusstraktes und die septale Separierung der Vorhöfe bei NFATc1-defizienten Mäusen (78).

Bei mit CsA behandelten Embryos kam es auch zu Defekten in der Klappenausbildung, ebenso bei Mäusen mit Mutationen im Calcineurin (79).

Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass der Calcineurin/NFAT-Signalweg neben seiner Bedeutung für die pathologische Myokardhypertrophie auch zu einem Teil an der physiologischen Herzentwicklung und Herzvergrößerung beteiligt ist.

1.3 Zielsetzung der Arbeit

Der Calcineurin/NFAT-Signalweg hat eine wichtige Rolle bei der hypertrophen Entwicklung des Herzens. Die Aktivierung der Ca^{2+} -Calmodulin-abhängigen Phosphatase Calcineurin A führt zur Dephosphorylierung der NFAT-Transkriptionsfaktoren, so dass diese in den Zellkern übergehen können, um Gene zu induzieren, die zur Hypertrophie des Herzens beitragen. Dies konnte durch zahlreiche Studien belegt werden (61).

Nach dem heutigen Verständnis ist zur Aktivierung des CnA/NFAT-Signalweges eine dauerhaft erhöhte Ca^{2+} -Konzentrationen sowie die Bindung von Calmodulin an CnA notwendig (36, 80).

Unsere Arbeitsgruppe fand jedoch Hinweise, dass es durch gezielte proteolytische Abspaltung der Autoinhibitorischen Domäne des Calcineurin A zu einer erhöhten Calcineurinaktivität im hypertrophierten humanen Myokard kommen kann (81).

In dieser Arbeit untersuchten wir den proteolytischen Mechanismus, welcher zu einer Aktivierung von CnA führt. Außerdem gingen wir der Fragen nach, ob die gezielte Proteolyse von Calcineurin A im Myokard vorkommt und ob dieser Mechanismus der posttranslationalen Veränderung von Calcineurin die Calcineurinaktivität unter pathophysiologischen Bedingungen reguliert.

2.0 Methodik

Die im Methodenteil verwendeten Chemikalien, Geräte und Materialien, sowie die Zusammensetzung der Lösungen und Puffer befinden sich im Appendix.

2.1 Isolierung und Kultivierung neonataler Kardiomyozyten

2.1.1 Präparation

Zur Kardiomyozytenherstellung verwendeten wir mit kleineren Modifikationen das Protokoll von Simpson und Savion (82). Unter sterilen Bedingungen wurden ein bis zwei Tage alte neonatale Ratten (Stamm Wistar) dekapitiert, deren Thorax auf der Vorderseite eröffnet und die Herzen entnommen. Diese wurden anschließend mit Heparin versetzten CBFHH gewaschen, mechanisch zerkleinert, zum Verdau in 15 ml CBFHH mit Trypsin und DNase gelöst und 20 min langsam (30 rpm) gerührt. Durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren konnte zusätzlich die Zell- und Faserverbände gelöst werden. Nach Sedimentation der Gewebstücke wurde der Überstand vorsichtig abpipettiert und verworfen, solange mikroskopisch noch keine Kardiomyozyten zu sehen waren. Erneut wurden 15 ml Verdauungslösung zugegeben und der Verdauvorgang wiederholt. Die folgenden Verdauintervalle betragen nur noch 5 min, wobei der Überstand, welcher nun viele mikroskopisch nachweisbare Kardiomyozyten enthielt, abgenommen und in FCS überführt (vier Überstände pro 7,5 ml FCS) wurde, um den Verdauvorgang zu inaktivieren. Diese Prozedur wurde solange wiederholt, bis mikroskopisch keine Kardiomyozyten mehr zu sehen waren. Bei RT und 1600 rpm wurden die Zellen 10 min abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das resultierende Pellet in MEM mit 5% FCS resuspendiert.

2.1.2 Pre-Plating

Das Pre-Plating dient der Reduktion des Anteils unerwünschter Zellpopulationen (Nicht-Kardiomyozyten), wie beispielsweise Fibroblasten. Dabei macht man sich zu Nutze, dass die Nicht-Kardiomyozyten bei der Inkubation (90 min, 37°C) früher an den Boden der Kulturschale (10 cm) anheften als die Herzmuskelzellen.

Zusätzlich erfolgte die Aussaat auf die Kulturschalen durch ein Zellsieb, um größere Verunreinigungen herauszufiltern. Bei der Abnahme des Überstandes der Kulturschale nach 90 min ergab sich somit eine Zellsuspension mit einem Kardiomyozytenanteil von ca. 90% (Abb. 5).

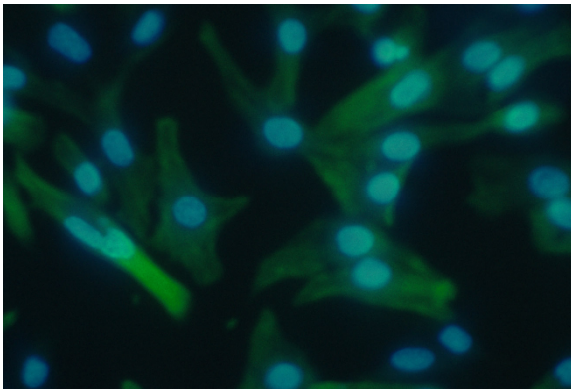


Abb. 5

Die Kardiomyozyten enthalten als kontraktile Zellen, im Gegensatz zu Kardiofibroblasten ein deutlich ausgebildetes Sarkomer-System, welches durch eine Immunfluoreszenz gegen Troponin sichtbar gemacht werden kann. Durch Überlagerung mit der DAPI-Kernfärbung konnte die Kontamination der Kardiomyozyten-Kulturen durch Nicht-Kardiomyozyten überprüft werden.

2.1.3 Plating

Mittels Fuchs-Rosenthal-Kammer wurden die Kardiomyozyten ausgezählt und anschließend auf 6-Well-Platten oder Chamber-Slides in MEM mit 5% FCS in einer Dichte von 250000-300000 Zellen pro cm² ausplattiert.

Am nächsten Tag wurden die Zellkulturen zweimal mit PBS gewaschen und anschließend in MEM mit 0.5% FCS kultiviert. Der Anteil der Nicht-Kardiomyozyten (Fibroblasten) lag zwischen 4% und 7%, was wir durch Immunzytologische Untersuchungen belegen konnten. Um das Fibroblastenwachstum zu hemmen, wurde dem MEM-Medium Bromodeoxyuridine zugesetzt. Die Kardiomyozyten selbst erreichten am nächsten Tag eine Konfluenz von 70% bis 90%..

2.2 HEK 293-Zellen

Diese Zelllinie stammt von einer immortalisierten Krebslinie humaner embryonaler Nierenzellen ab und wurde in der vorliegenden Arbeit für Co-Transfektionsversuche verwendet, da die HEK 293-Zellen einfach zu kultivieren und zu transfizieren sind. Am Tag vor der Transfektion wurden die Zellen gesplittet und anschließend analog zu den unten für Kardiomyozyten beschriebenen Verfahren transfiziert.

2.3 Transfektion

Um bestimmte Phänomene, die auf Proteinexpression beruhen, leichter untersuchen zu können, wird ein Expressionsvektor für das entsprechende Protein in eine Zelle eingebracht, die das Protein nicht oder nur gering exprimiert. Dieses als Transfektion bezeichnete Verfahren wurde bei den Kardiomyozyten mittels Lipofektion durchgeführt. Hierbei wird die DNA in Lipidkomplexe eingebettet und kann so in die Zelle eingeschleust werden.

Die dabei verwendeten kationischen Lipide überführen die negativ geladenen DNA-Moleküle durch elektrostatische Anziehung in eine kompakte Struktur. Die auf diese Weise kondensierten Komplexe interagieren aufgrund ihrer äußeren kationischen Ladung und lipophilen Struktur mit der negativ geladenen hydrophoben Doppelschicht der Zellmembran und schleusen die DNA in die Zielzelle ein, so dass das Protein exprimiert werden kann.

Beim hier beschriebenen Versuch wurde die Transfektion mit Lipofectamine PlusTM Reagenz an Kardiomyozyten durchgeführt, 24 h nach dem Verdau und Ausplattieren dieser. Zur DNA-Verdichtung wurden 1-2 µg Plasmid-DNA mit 3 µl gelöster PlusTM Reagenz in 100 µl OptiMEM/MEM vermischt, gleichzeitig wurden 4 µl LipofectamineTM mit 100 µl OptiMEM/MEM verrührt und beides 15 min bei RT ruhen gelassen. Anschließend wurden beide Ansätze vermischt und für weitere 15 min bei RT inkubiert. Währenddessen wurde das Medium der Kulturschalen/Chamber-Slides abgesaugt und durch 800 µl serumfreies

Medium (OptiMEM/MEM) ersetzt, das angesetzte Gemisch den Zellen zugegeben und für 3 h bei 37°C inkubiert, um die Anlagerung und Fusion der Vesikel mit der Zellmembran zu gewährleisten. (Die Mengeangaben beziehen sich auf ein Well (6-Well) bzw. eine Kammer (Chamber-Slides))

Das Transfektionsmedium wurde anschließend durch normales Kulturmedium (MEM mit 0,5% FCS) ersetzt. Nach 24 h wurden die Zellen mikroskopisch kontrolliert, ein Mediumwechsel vorgenommen und die Stimulationsversuche gestartet.

2.4 Stimulation der Zellkulturen

48 Stunden nach der Präparation und Kultivierung der neonatalen Kardiomyozyten bzw. 24 Stunden nach der Transfektion wurde die Stimulation mit 10 nmol/L Ang II begonnen. Die Zeitpunkte unserer Untersuchungen waren jeweils nach 0, 12 und 24 Stunden. Die Stimulationsversuche wurden nach folgendem Protokoll durchgeführt: 1.) die Zellen blieben unstimuliert für 12 und 24 Stunden; 2.) die Zellen wurden stimuliert mit Ang II für 12 und 24 Stunden; 3.) die Zellen wurden für 12 Stunden mit Ang II stimuliert und nach Entfernung des Ang II blieben die Zellen für weitere 12 Stunden unstimuliert; 4.) die Zellen wurden für 12 Stunden mit Ang II stimuliert und nach Entfernung des Ang II blieben die Zellen für weitere 12 Stunden unstimuliert, wobei während der kompletten 24 Stunden Calpain-Inhibitor III dem Medium beigelegt war; 5.) die Zellen wurden für 12 Stunden mit Ang II stimuliert und blieben für weitere 12 Stunden unstimuliert. Der Calpain-Inhibitor III wurde dabei nach Entfernung von Ang II ergänzt, d.h. von Stunde 12 bis zur Stunde 24 nach Beginn des Stimulationsversuches. Die Menge des dem Medium zugesetzten Calpain-Inhibitors war 10 µmol/l.

2.5 Immunfluoreszenz

Bei immunhistochemischen Untersuchungen wird die zelluläre Lokalisation eines Proteins mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers oder eines Proteinbindungspartners nachgewiesen.

2.5.1 Patientenpopulation

Für die immunhistochemischen Calcineurinfärbungen wurde Gewebe menschlicher Herzen verwendet. Dabei wurde Myokard aus dem linksventrikulären Ausflusstrakt von Patienten mit Aortenstenose (n=7), KHK (n=3) und hypertropher Kardiomyopathie (n=9) verwendet, welches intraoperativ gewonnen wurde. Gesundes Myokardgewebe des Interventrikularseptums wurde von Herzen entnommen, welche aus technischen Gründen nicht transplantierbar waren. Die Patientenpopulation wurde in einer Vorarbeit unserer Arbeitsgruppe bereits genauer beschrieben (81).

2.5.2 Calcineurinfärbung

Die zelluläre Lokalisation von Calcineurin ließ sich durch die indirekte Immunfluoreszenz nachweisen, bei welcher Primär- und Sekundärantikörper Verwendung finden. Der Primärantikörper bindet dabei an das zu detektierende Gen (Calcineurin). Der Sekundärantikörper, welcher einen Fluoreszenzfarbstoff trägt, ist gegen den primären Antikörper gerichtet.

Gefrierschnitte (5 µm) des humanen Myokards wurden auf beschichtete Objektträger gelegt und für 2 min luftgetrocknet. Diese wurden anschließend mit 2% Paraformaldehyd in PBS fixiert, 15 min bei 4°C mit 0,1% Triton X-100 permeabilisiert und für 3 h bei RT mit 10% Goat-Serum in PBS blockiert. Nach Auswaschen der Blockierlösung wurde der Primärantikörper Anti-CnA

Polyclonal Goat-Anti-Mouse in PBS in der Verdünnung 1:100 aufgetragen und über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer inkubiert.

Am nächsten Tag wurde der Primärantikörper entfernt und die Zellen erneut mit PBS gewaschen. Verwendeter Zweitantikörper war Cy2-konjugiertes Anti-Goat-IgG, der in einer Verdünnung von 1:1000 eingesetzt wurde. Die Inkubation erfolgte für eine Stunde bei 4°C. Alle Inkubationsschritte fanden in Dunkelheit statt, um ein Ausbleichen der Farbstoffe zu verhindern.

2.5.3 Troponin- und Kernfärbung

Kulturen von Kardiomyozyten wurden auf Chamber-Slides ausgesät und für 48 h im Kulturmedium mit 0,5% FCS kultiviert. Nach Absaugen des Mediums und Waschen mit PBS erfolgte die Fixierung der Zellen in 2% Paraformaldehyd bei RT für 30 min. Eine PBS-Lösung mit 0,1% TWEEN 20, 0,5% Triton X-100 und 1% BSA permeabilisierte und blockierte die Zellen (30 min bei RT). Im Anschluss an das Auswaschen der Blockierlösung wurde der Primärantikörper Anti-Troponin-I-Polyklonal in einer Verdünnung von 1:50 in 2,5% Maus-Serum/PBS zu den Zellen gegeben und bei 4°C über Nacht in einer feuchten Kammer inkubiert.

Am nächsten Tag wurde der Primärantikörper entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen und bei RT für 1 h mit dem in 2,5% Maus-Serum/PBS in einer Verdünnung von 1:1000 gelösten Cy2-konjugierten Sekundärantikörper Mouse-Anti-Goat-IgG inkubiert.

Nach erneutem Waschen erfolgte die Kernfärbung mit 4,6-Diamidino-2-Phenylindol-Lösung (DAPI) in einer Verdünnung von 1:25000, gelöst in 5% FCS/PBS für 10 min bei RT.

Nach Entfernung der Inkubationslösungen und fünfmaligem Waschen der Zellen mit PBS wurden diese auf den Glasobjektträgern mit Moviol eingedeckt und Deckgläschen luftblasenfrei aufgesetzt.

2.5.3 Mikroskopie

Anschließend konnten die Präparate unter einem Zeiss-Fluoreszenz-Mikroskop ausgewertet werden. Dabei wurden folgende Anregungswellenlängen für die einzelnen Fluoreszenzfarbstoffe verwendet: DAPI – 350 nm; Cy2: 490 nm. Die Ergebnisse wurden durch beispielhafte Fotoaufnahmen dokumentiert.

2.6 Methoden für das Arbeiten mit DNA

2.6.1 Transformation chemisch kompetenter Bakterien mit Plasmiden

Bakterielle Transformation ist ein Vorgang durch den DNA-Plasmide in bakterielle Zellen aufgenommen werden. Wenn die fremde DNA einen Replikationsursprung aufweist, der von den bakteriellen Polymerasen erkannt wird, repliziert das Bakterium die fremde DNA wie seine Eigene. Ist auf dem aufgenommenen Plasmid noch ein Resistenzgen für Antibiotika enthalten, so können die Bakterien, die die neue DNA produzieren, gezielt selektiert werden. Bakterien, welche die Eigenschaft besitzen, fremde DNA aufzunehmen, werden „kompetent“ genannt. Die Herstellung dieser speziellen Zellen erfolgt durch Behandlung der Bakterien mit Calcium-Chlorid in der frühen log-Phase der Wachstumskurve.

50 µl dieser chemisch kompetenten *E. coli* (DH5α)-Bakterien wurden mit 5 bis 20 µl eines 50 µl Ligationsansatzes oder mit 10 bis 100 ng Plasmid-DNA gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien 45 sec bei 42°C erhitzt („heat shock“) und umgehend wieder auf Eis abgekühlt. Durch dieses kurzzeitige Erhitzen wird die DNA in die Zellen aufgenommen. Die transformierten Bakterien wurden in 250 µl LB-Medium suspendiert und 1 h unter Schütteln (180 rpm) bei 37°C inkubiert.

Danach wurde die Bakteriensuspension auf LB-Selektions-Agarplatten, welche das entsprechende Antibiotikum enthielten, ausplattiert und für 12 bis 18 h bei

37°C inkubiert. Transformierte Bakterienklone wurden durch ihre spezifischen Antibiotikaresistenzen selektioniert und bildeten gut abgrenzbare Kolonien. Als Kontrolle dienten kompetente Zellen ohne Plasmid, die auf den Selektions-Agar nicht wachsen durften, da ihnen das Resistenzgen fehlte.

Selektionierte Bakterienklone wurden mit Pipettenspitzen von der Agarplatte gepickt (in der Regel 10 bis 12), in 2,5 ml LB-Selektionsmedium transferiert und 12 bis 16 h bei 37°C im Inkubationsschüttler (180 rpm) inkubiert.

Aus der Bakteriensuspension wurde die Plasmid-DNA durch Mini-Präparation (siehe unten) aufgearbeitet.

2.6.2 Mini- und Maxi-Präparation von Plasmid-DNA

Zur Isolierung größerer Mengen von Plasmid-DNA wurden die Maxi- (NucleoBond® PC500) und Mini-Präp-Kits (NucleoSpin® Plasmid) verwendet. Grundsätzlich erfolgte jeweils nach alkalischer Lyse der Bakterien die Plasmid-Isolation über Ionenaustauscher-Säulen.

Bei der Mini-Präparation wurde 1,5 ml des mit Bakterien gesättigten Mediums verwendet. Die Bakterien wurden durch Zentrifugation pelletiert, der Überstand abgenommen und die Plasmid-DNA aus dem Bakterienpellet nach Angaben des Herstellerprotokolls gewonnen (Endvolumen: 50 µl).

Bei der Maxi-Präparation, welche zur Amplifikation vorhandener Plasmid-DNA genutzt wurde, erfolgte die Plasmid-Aufreinigung aus 250 ml gesättigten LB-Selektionsmedium nach Angaben des Herstellerprotokolls. Die vorhergehende Transformation der Plasmide in die chemisch kompetenten Bakterien erfolgte, wie oben beschrieben. Nur wurde beim Maxi-Präp die Bakteriensuspension in 250 ml LB-Selektionsmedium gelöst und anschließend für 12 bis 18 h bei 37°C auf dem Bakterien-schüttler inkubiert. Die gewonnene Plasmid-DNA wurde schließlich mit Isopropanol versetzt (0,7faches Volumen des Eluats), zentrifugiert bei 11500xg und das resultierende Pellet mit 70%igem Ethanol gewaschen. Anschließend wurde das Pellet bei RT getrocknet und in eine entsprechende Menge *Aqua dest.* aufgenommen.

2.6.3 Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA

Durch die Adsorptionspektrometrie kann die Nukleinsäurekonzentration über die Messung der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt werden. Die Konzentration errechnet sich aus der OD bei 260 nm, dem Verdünnungsfaktor und einem für DNA, RNA oder Oligonucleotide spezifischen Multiplikationsfaktor. Aus dem Verhältnis der OD 260 nm und der OD 280 nm erhält man außerdem eine Aussage über Proteinkontaminationen in der Lösung. Der Quotient aus OD 260 nm und OD 280 nm sollte zwischen 1,7 und 2,0 liegen.

Jeweils 2 µl der DNA-Lösungen wurden verdünnt mit einem Volumen von 100 µl *bidest.* H₂O und in eine Quarzküvette pipettiert. Anschließend wurde mit Hilfe eines Spektralphotometers die OD 260 nm der DNA-Lösung bestimmt und ihre Konzentration berechnet.

2.6.4 Restriktionsverdau

Bakterielle Endonukleasen erkennen kurze DNA-Sequenzen und spalten die Doppelstrang-DNA an spezifischen Stellen innerhalb oder in der Nähe dieser Erkennungssequenzen. Diesen DNA-Verdau nutzt man für analytische und präparative Zwecke.

Bei der DNA-Spaltung mit Restriktionsendonukleasen wurden 2 U des entsprechenden Restriktionsenzym pro 1 µg Plasmid-DNA eingesetzt. Der Spaltungsansatz wurde mit einem Restriktionsenzym-puffer (10x) supplementiert, der nach Herstellerangaben eine optimale Aktivität (≥ 75%) des entsprechenden Restriktionsenzym garantiert, und mit *Aqua dest.* auf ein Gesamtvolumen von mindestens 20 µl gebracht. Anschließend wurde der Spaltungsansatz für 1 bis 2 h bei 37°C inkubiert. Die DNA-Spaltungsprodukte wurden nach ihrer Fragmentgröße elektrophoretisch aufgetrennt (siehe unten).

2.6.5 Agarose-Gelelektrophorese

Die Trennung und der Nachweis von DNA-Fragmenten zu analytischen und präparativen Zwecken erfolgte mit Hilfe der Elektrophorese in Agarose-Gelen, wobei sich die negativ geladenen DNA-Moleküle im elektrischen Feld nach deren Größe auftrennten.

Die Auftrennung erfolgte in 1% TAE-Agarose-Gelen. Zur Herstellung der Gele wurde jeweils die entsprechende Menge Agarose abgewogen und mit TAE-Puffer gemischt, diese Mischung etwa 5 min in der Mikrowelle erhitzt (bis die Agarose vollständig gelöst war) und anschließend auf einem Magnetrührer bis auf 50°C abkühlen lassen. Nach dem Abkühlen wurde das Gel mit 1 µl Ethidiumbromid-Lösung pro 100 ml TAE-Puffer versetzt und der Ansatz in eine Gelkammer gegossen. Um Taschen für die später einzubringende DNA zu erzeugen, wurden vor dem Auskühlen Käbme in das Gel eingetaucht.

Die Proben wurden mit 1/5 Volumen 10x DNA-Ladepuffer (MassRuler™) versetzt und nach Aushärten des Gels in die Geltaschen pipettiert. Als Längenstandard diente ein 1 kb Marker (GeneRuler™). Die Elektrophorese erfolgte je nach Gelgröße mit einer Spannung von 70 V bis 110 V in 1x TAE als Laufpuffer für etwa 1 bis 2 h. Da dem Ladepuffer ein Farbstoff beigemischt war, konnte der Fortschritt der Elektrophorese am Gel beobachtet werden. Nach ausreichender Trennung der Fragmente wurden die DNA-Fragmente unter UV-Licht betrachtet und die Ergebnisse mit der Polaroidkamera photodokumentiert.

2.6.6 Eluierung spezifischer Fragmente aus Agarose-Gelen

Sofern beim Verdau von Plasmid-DNA mehrere Fragmente entstanden, von denen nur ein spezifisches für die Ligation genutzt werden sollte, wurde der gesamte verdaute Restriktionsansatz auf ein Agarose-Gel aufgetragen und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurde die gesuchte Bande unter UV-Licht aus dem Gel ausgeschnitten und aus diesem mittels PCR-

Purification-Kit (Qiagen) eluiert. Die Aufreinigung der DNA wurde nach Herstellerangaben durchgeführt.

2.6.7 Auswahl der Plasmide

2.6.7.1 pcDNA-DEST53

Dieser 7.8 kb große Vektor codiert für ein GFP (green fluorescent protein)-Gen, ein Fluoreszenzmarker, mit dessen Hilfe die zelluläre Lokalisation des Proteins von Interesse verfolgt werden kann. Die GFP-codierende Sequenz (N-terminal) steht unter der Kontrolle des humanen Zytomegalieviruspromotors (CMV). Der Vektor verfügt über die Rekombinationsabschnitte *attR1* und *attR2*, mit deren Hilfe das Einfügen des Gens von Interesse durch das Verfahren der Klonierung durch Rekombination möglich ist. Eine Neomycin-Resistenz, bestehend aus dem SV40-Promotor, dem Neomycin-Resistenzgen und einem Polyadenylatsignal, ermöglicht die Selektion einer transfizierten Zelllinie. Zur Isolierung und Reinigung der Plasmid-DNA wurde *E. coli* DH5 α mit pcDNA-DEST53 transformiert.

2.6.7.2 pCMV-SPORT6 mit Calcineurin A β

Dieser Vektor enthält als Insert humanes CnA β , unser Gen von Interesse. Flankiert wird das Gen von einer MCS und den Rekombinationsabschnitten *attB1* und *attB2*, welche eine Klonierung durch Rekombination möglich machen. Der Vektor ist 4,4 kb groß, dazu kommt das Insert mit einer Größe von 3,2 kb. Die für CnA β codierende Sequenz steht unter der Kontrolle des humanen Zytomegalieviruspromotors (CMV). Durch die Ampicillin-Resistenz ist eine Selektion der transfizierten Zelllinie möglich. Zur Isolierung und Reinigung der Plasmid-DNA wurde *E. coli* DH5 α mit pCMV-SPORT6 transformiert.

2.6.8 Herstellung eines GFP-Calcineurin-Konstruktes

Zur Herstellung des GFP-Calcineurin-Konstruktes bedienen wir uns dem Verfahren der Klonierung durch Rekombination.

Im Vergleich zur herkömmlichen Klonierung mit Restriktionsenzymen und Ligasen beruht diese Methode auf sequenzspezifischer DNA-Rekombinationen, die durch spezifische Rekombinasen katalysiert werden. Wir benutzten das Gateway-System der Firma Invitrogen, das auf der Verwendung der Phagen Lambda Rekombinase und Rekombinationsstellen beruht.

Die Klonierung durch Rekombination setzt sich aus zwei Teilreaktionen zusammen. Die BP-Reaktion ist eine Rekombination zwischen dem Expressions-Klon, der bei uns der CnA β -tragende pCMV-SPORT6 Vektor ist, und einem Donor (pDONRTM) zur Erzeugung eines Entry Klons. Dabei rekombinierten die *attB*-Stellen des pCMV-SPORT6 Vektors mit den *attP*-Stellen des pDonor-Plasmides. Damit das Gen (CnA β) in der richtigen Orientierung in das pDonor-Plasmid rekombiniert wird, gibt es zwischen den *attB1*- und *attB2*-Stellen sowie zwischen den *attP1*- und *attP2*-Stellen kleine DNA-Sequenzunterschiede, die dazu führen, dass *attB1* immer mit *attP1* und *attB2* immer mit *attP2* rekombiniert.

Die Herstellung des Expressionsplasmides aus dem Entry-Klon und dem Destinations-Plasmid entspricht der zweiten Teilreaktion, der LR-Reaktion. Hierbei rekombinieren die zwei *attL*-Stellen des in der BP-Reaktion erzeugten Entry-Klones mit den *attR*-Stellen des Destinations-Plasmides pcDNA-DEST53. Auch hier bleibt durch geringfügige DNA-Sequenzunterschiede zwischen L1 und L2 sowie R1 und R2 die gewollte Orientierung der Inserts erhalten. Diese Art der Rekombination garantiert außerdem, dass das DNA-Insert im richtigen Leseraster liegt.

Die Durchführung der Methode erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

Das Ergebnis ist ein 9.3 kb großes Expressionsplasmid mit dem GFP-tragenden (N-terminal) pcDNA-DEST53 Vektor als Rückrat und Calcineurin A β als Insert. Durch Fluoreszenzmikroskopie konnte nun nach der Transfektion des

Plasmides die Lokalisation von Calcineurin in lebende und fixierten Zellen sichtbar gemacht werden.

2.6.9 Herstellung einer dauerhaft aktiven Form von Calcineurin A β

Zur Erzeugung einer dauerhaft aktiven Form von CnA β wurde der CnA β -tragende pCMV-SPORT6 Vektor mit den Restriktionsenzymen PstI und XbaI durch das oben beschriebene Verfahren verdaut, die Fragmente anschließend durch die Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und aus dem Gel eluiert.

Die Modulation kohäsiver DNA-Enden in stumpfe Enden erfolgte durch Inkubation der eluierten DNA-Fragmente mit T4 DNA-Polymerase und dNTP-Mix in dem mitgelieferten Puffer nach den Mengenangaben des Herstellers (Endvolumen 20 μ l). Die Inkubation des Ansatzes wurde bei RT für 5 min durchgeführt und anschließend durch Erhitzung gestoppt (70 °C für 10 min).

Um den Ringschluss des Plasmides zu erreichen, wurde der DNA 10 U T4 DNA-Ligase und 2 μ l Ligationspuffer (incl. ATP) beigefügt. Der Ligationsansatz wurde für 2-3 h bei RT inkubiert und direkt zur Transformation von Bakterien eingesetzt.

Dem dabei entstehenden cDNA-CnA β -Rest im pCMV-SPORT6-Vektor fehlt der für die Autoinhibitorische Domäne kodierende Abschnitt, was zu einer dauerhaften Aktivierung des Genproduktes führt.

Dieses Insert des dauerhaft aktiven Calcineurins wurde anschließend durch Rekombination ebenfalls in den GFP-tragenden pcDNA-DEST53 Vektor kloniert, analog zu dem bereits beschriebenen Vorgehen.

2.7 Herstellung von Proteinextrakten für Luciferase-Assays und Luciferasemessung

Genetische Reportersysteme werden häufig eingesetzt, um eine Gen-Expression zu studieren. Der Luciferase-Assay ist eine sensitive Methode um die Luciferase-Expression in Zellen nachzuweisen, welche mit einem Luciferase-Reporter-Vektor transfiziert wurden. Die Reaktion, die durch Luciferase katalysiert wird, ist die Oxydation von Luciferin, bei der ein Photon freigesetzt wird. Das dabei entstehende Licht lässt sich mit Hilfe eines Luminometers quantifizieren.

Um indirekt die Calcineurin-Aktivität nachzuweisen, bedienen wir uns einem NFAT-Reporter-Plasmid, bestehend aus einem Interleukin 2-Promoter, gefolgt vom Luciferase-Gen (zur Verfügung gestellt von Dr. Kai Schuh).

Die Transfektion der neonatalen Kardiomyozyten erfolgte nach dem oben beschriebenen Protokoll. Aufgrund der höheren Transfektionseffizienz wurden zusätzlich zu den Kardiomyozyten HEK 293-Zellen zur Co-Transfektion eingesetzt. Neben dem pCMV-SPORT6-Plasmid mit CnA β -Insert wurde auch der SPORT6-Vektor mit der dauerhaft aktiven Form des CnA β transfiziert. In einem Versuchsteil wurde zur Inhibition der CnA/NFAT-Interaktion dem Medium das synthetische Peptid VIVIT in einer Konzentration von 50 μ g/ml zugesetzt.

Nach Transfektion und Stimulation wurden die Zellen geerntet. Dazu wurden die Wells zunächst abgesaugt, in jedes Well 200 μ l 1x Lysis-Puffer gegeben, die Wells für ca. 5 min geschüttelt, danach die Zellen mit einem Zellscraper vom Untergrund gelöst und in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Die Suspension wurde nach kurzem Vortexen für 5 min bei 10000 rpm zentrifugiert. Unlösliche Bestandteile wurden dadurch abgetrennt. 20 μ l des Überstandes wurde in Luminometer-Röhrchen gegeben und mit jeweils 100 μ l vorgewärmten (25°C) Luciferase-Assay-Reagenz vermischt.

Die Luciferase-Aktivität wurde in einem Luminometer nach Angaben des Herstellers bestimmt. Nach Doppelbestimmung der Luciferase-Aktivität wurden die erhaltenen Werte relativ zu den Proteinkonzentrationen errechnet.

2.8 Calcineurin Protein-Expression

2.8.1 Nukleäre Proteinextraktion

Für die nukleäre Proteinextraktion wurden die Kardiomyozyten nach Abschluss der Stimulationsversuche (siehe oben) in kaltem PBS gewaschen, mit einem Zellscraper geerntet und in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Nach 30 sec Zentrifugation bei 5000 rpm wurde das Pellet in 800 µl Puffer A (hypoton) resuspendiert. Mittels einer 1 ml Spritze wurde die Zellsuspension mehrfach durch eine dünne Kanüle gepresst, was zur Zerstörung der Zytoplasmamembran und somit zum Freisetzen der Zellkerne führte. Bevor die Kerne durch Zentrifugation (8000 rpm, 5 min, 4°C) abgetrennt wurden, erfolgte die Inkubation der Suspension auf Eis für 30 min. Die zytoplasmatischen Zellbestandteile wurden nach der Zentrifugation als Überstand abpipettiert und das Kernpellet in 100 µl Puffer B (hyperton) gelöst. Nach einer weiteren 30minütigen Inkubation auf Eis wurden die unlöslichen Bestandteile (Membranfragmente) durch Zentrifugation (5 min, max. Geschwindigkeit) abgetrennt. Der die Kernproteine enthaltende Überstand wurde aliquotiert und bei -70°C gelagert. Ein kleiner Anteil wurde zur Proteinkonzentrationsmessung eingesetzt.

2.8.2 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Proteinmengenbestimmung wurde nach der Methode von Bradford (83) mit dem Proteinassay-Farbreagenz von BioRad durchgeführt. Dazu wurden 2-10 µl Probe mit 1 ml verdünnter Farbreagenz (1:5 in H₂O) gemischt und 5-10 min bei RT inkubiert. Die Extinktion der Proben wurde bei 595 nm im Photometer gemessen und die Proteinkonzentration der Proben durch Vergleich mit der zuvor durchgeführten Standardreihe bestimmt.

2.8.3 Western-Blot-Analyse

Der Western-Blot dient dem Nachweis von Proteinen. Dazu werden die Proteine oder Polypeptide in einer Gelelektrophorese der Größe nach aufgetrennt, anschließend auf eine Membran übertragen und dort mit Hilfe spezifischer Antikörper nachgewiesen.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Western-Blot zum Nachweis von Calcineurin und Calpain in Kardiomyozyten (nukleäres/zytosolisches Kompartiment) genutzt.

Die Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht erfolgte mit der diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli (84) in einer BioRad-Elektrophoresekammer. Das Polyacrylamidgel bestand aus einem 5%igen Sammelgel und einem 10%igen Trenngel. Zunächst wurde das Trenngel gegossen und sofort mit H₂O überschichtet, um einen geradlinigen Abschluss der Polymerisation zu gewährleisten. Nach dem Abgießen des H₂O wurde das Trenngel mit dem Sammelgel überschichtet und in dieses ein Gelkamm hineingesteckt, so dass nach der Polymerisation des Gels entsprechende Probetaschen vorhanden waren.

Die jeweiligen Proteinextrakte wurden mit Laemmli-Probepuffer gemischt, 5 min bei 95°C aufgekocht und mit gleichen Proteinmengen auf das Gel geladen. Der Gellauf erfolgte im Laufpuffer für 3-4 h bei 90 V. Als Protein-Molekulargewichtsstandard diente der RainbowTM-Marker.

Anschließend wurde ein Elektrotransfer der aufgetrennten Proteine auf Nitrozellulosemembran in einer Tank-Blotting-Apparatur (BioRad) durchgeführt. Dazu wurde die Nitrozellulosemembran luftblasenfrei auf das Gel gelegt, die Gel-Membran-Schicht auf der Ober- und Unterseite mit Whatmann-Papier und einem Kunststoffschwamm bedeckt und in eine Klammer eingespannt. Diese wurde in eine mit Transferpuffer gefüllte Blotting-Kammer gesetzt und die Proteine bei 100 mA über Nacht auf die Membran übertragen.

Danach wurde die mit Proteinen beladene Membran 1 h in Blockierlösung unter leichtem Schütteln inkubiert, um unspezifische Bindungen zu verhindern.

Zur Detektion von Calcineurin fanden zwei verschiedene Primärantikörper Verwendung:

- Anti-CnA α Polyclonal Rabbit-Anti-Mouse, gerichtet gegen die C-terminale Domäne (korrespondierende AS 500-521)
- Anti-CnA α Polyclonal Goat-Anti-Mouse, gerichtet gegen die N-terminale Domäne (korrespondierende AS 264-283)

Zum Nachweis von Calpain wurde Anti-Calpain 1 Goat Polyclonal IgG eingesetzt.

Als Ladekontrolle fanden Histon H1 (Anti-Histon H1 Mouse Monoclonal IgG) und GAPDH (Mouse-Anti-GAPDH Monoklonal Ak) Verwendung.

Die geblockte Membran wurde für 1 h bei RT mit dem in 5% Milch/PBS/0,5% Tween 20 verdünnten Erstantikörper inkubiert und anschließend fünfmal zu jeweils 5 min mit PBS/0,5% Tween 20 gewaschen. Der zweite Peroxidasegekoppelte Antikörper wurde ebenfalls in 5% Milch/PBS/0,5% Tween 20 verdünnt und die Membran für 1 h bei RT inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen der Membran erfolgte die Detektion mit dem ECL-System (Amersham) nach Angaben des Herstellers. Durch unterschiedlich lange Expositionszeiten (30 sec bis 5 min) der Membranen auf den Röntgenfilmen wurden die durch Antikörper markierten Proteinbanden sichtbar gemacht.

2.9 Proteolytische Fragmentierung, Immunopräzipitation und Sequenzierung von Calcineurin

2.9.1 Verdau von Calcineurin durch μ -Calpain

Zur Spaltung von Calcineurin durch Calpain wurde 1 μ M rekombinantes CnA mit 0,1 U μ -Calpain bei RT inkubiert. Dies erfolgte in einem Reaktionspuffer, welcher 50 mmol/l Tris (pH 7,4), 0,5 mmol/l EDTA, 1 mmol/l CaCl_2 und 10 mmol/l DTT enthielt. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von Laemmli-Probepuffer gestoppt.

2.9.2 Immunopräzipitation von Calcineurin

Die Immunopräzipitation erlaubt die Konzentrierung und Isolierung eines Proteins durch Benutzung Protein-spezifischer Ak. Dabei wird zuerst das Zellextrakt mit einen spezifischen Ak inkubiert, der das Proteins von Interesse bindet. Im zweiten Schritt wird gereinigtes Protein A (oder Protein G), welches an Sepharose-Beads gekoppelt ist, ergänzt. Das Protein A ist ein bakterielles Protein mit hoher Affinität zu den Fc-Abschnitten der Immunglobuline. Es bindet an die Ak-Antigen-Komplexe und liefert so die Masse, welche für die Präzipitation aus dem Gemisch nötig ist. Der Antigen-Ak-Protein-Komplex setzt sich ab und durch mehrere Waschschriffe kann das nicht präzipitierte Material entfernt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Immunopräzipitation zur Isolierung von Calcineurin aus humanen hypertrophierten Herzen genutzt. Dazu wurde zunächst das Herzgewebe (1,5 mg) in Präzipitations-Assay-Puffer lysiert (sechsfache Menge). Nach 1 h Inkubationszeit wurden die unlöslichen Gewebsbestandteile pelletiert (10000 g, 10 min) und der Überstand, welcher das gesuchte Protein enthielt, mit dem Anti-CnA N-terminal Polyclonal Goat-Anti-Mouse Ak (5 μ g) inkubiert. Der Ak-Protein-Komplex wurde anschließend mit einem Mix aus 50 μ l Protein A- und 50 μ l Protein G-Sepharose-Beads für

1 h bei 4°C präzipitiert. Nach viermaligem Waschen mit dem Präzipitations-Assay-Puffer und einem finalen Waschen mit 50 mmol/l Tris, pH 8,0 wurden jeweils 100 µl Proben-Puffer zu dem gewaschenen Antigen-Ak-Protein-Komplex gegeben. Danach erfolgte das Beladen eines 8%igen SDS-Gels mit jeweils 30 µl der Probenlösung. Die Auftrennung und die Detektion der Proteine erfolgte analog zum oben beschriebenen Western-Blot-Verfahren.

Nach dem Isolieren der 48 kDa Bande wurde diese mit Trypsin verdaut, die Fragmente mittels MALDI-TOF-Verfahren massenspektrometrisch analysiert und sequenziert (durchgeführt von TOPLAB, Martinsried).

2.10 Auswertung, Statistik und graphische Bildbearbeitung

Versuche wurden, wenn nicht anders angegeben, in drei- bis achtfacher Bestimmung durchgeführt. Die Bestimmung von Mittelwerten, Standardabweichungen (SD), Standardfehlern des Mittelwertes (S.E.M.; für *Standard Error of the Mean*) und die Erstellung der Graphen und Diagramme erfolgte mit Hilfe der Microsoft-Excel-2003-Software. Zur Signifikanzprüfung wurde der ungepaarte Student-t-Test verwendet. Hierbei wurde der Signifikanz ein Wert von $P < 0,05$ zugeordnet.

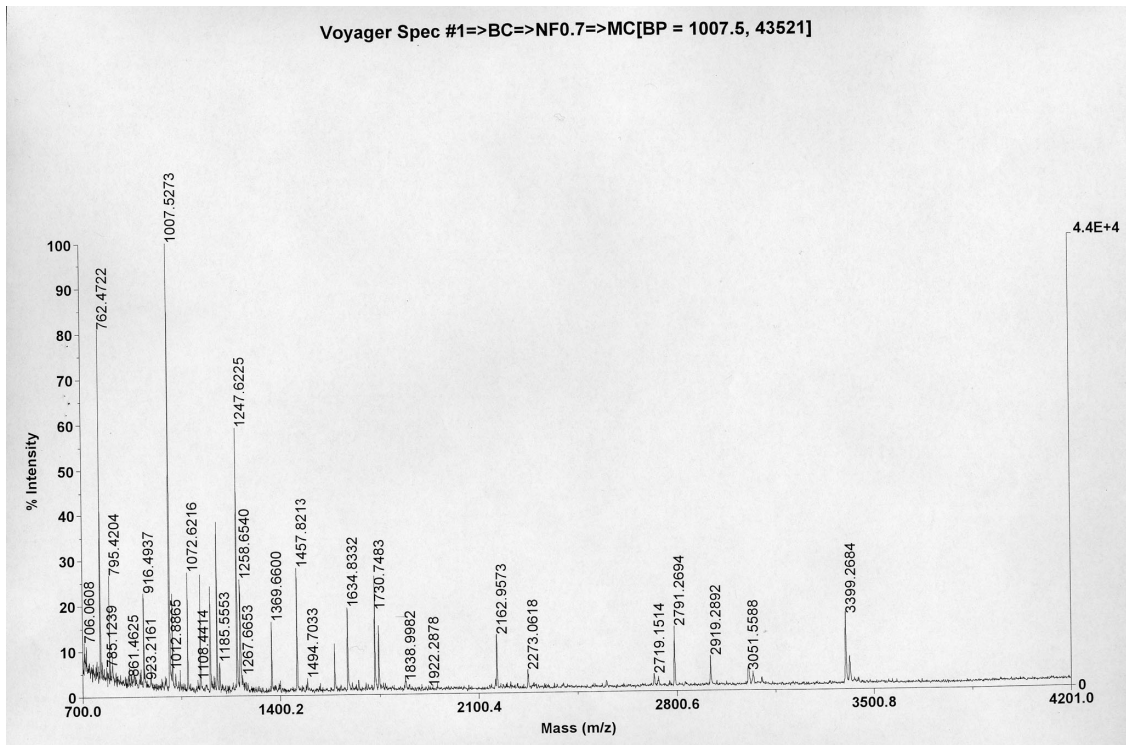
3.0 Resultate

3.1 Proteolyse von Calcineurin im Humanen Myokard

Um die exakte Calpain-Schnittstelle im Calcineurin-Protein zu identifizieren und um herauszufinden, ob die gespaltene Form des Calcineurins auch *in vivo* existiert, führten wir eine Immunopräzipitation von Lysaten menschlichen hypertrophierten Myokards durch. Dies erfolgte mit Antikörpern, welche gegen den N-terminalen Abschnitt des CnA α gerichtet sind. Nach der Immunopräzipitation wurde CnA über ein SDS-Gel aufgetrennt, die 48 kDa Bande aus dem Gel isoliert und anschließend mit Trypsin verdaut. Die dabei entstandenen Fragmente des 48 kDa CnA wurden massenspektrometrisch (MALDI-TOF-Verfahren) analysiert (Abb. 6). Das C-terminale Ende (AS 425-521) des CnA α konnte nicht in den verdauten Fragmenten gefunden werden. Dieses Resultat lässt vermuten, dass Calpain in hypertrophierten menschlichen Myokard eine Abspaltung der C-terminalen Region des CnA bewirkt. Damit entsteht ein 48 kDa Rest-Calcineurin (AS 1-424), welchem die autoinhibitorische Domäne fehlt (Abb. 6).

In der vergleichenden Sequenzanalyse der α - und β -Isoform des Calcineurins ergab sich eine 100% Übereinstimmung der AS-Sequenz in der Region der vermeintlichen Calpain-Schnittstelle (Abb. 7). Dies lässt vermuten, dass Calpain beide Isoformen von Calcineurin spalten kann.

A



B

Masse	AS-Rest	Sequenz
761.464	402 408	AIGKMAR
940.452	48 55	AHLMKEGR
1006.519	20 28	AVPFPPSHR
1017.553	11 19	LSTTDRVVK
1071.614	64 73	IITEGASILR
1184.547	155 163	HLTEYFTFK
1246.615	101 112	LFEVGGSPANTR
1257.646	53 63	EGRLEESVALR
1259.613	113 122	YLFLGDYVDR
1368.652	244 254	TQEHFTHNTVR
1456.813	64 76	IITEGASILRQEK
1588.801	29 42	LTAKEVFDNDGKPR
1633.825	319 332	AAVLKYENVMNIR
1729.740	155 167	HLTEYFTFKQECK
1743.849	33 47	EVFDNDGKPRVDILK
1834.983	409 424	VFSVLREESESVLTLK
2789.181	294 318	SQTTGFPSLITIFSAPNYLDVYNNK
3050.551	255 279	GCSYFYSPAVCEFLQHNNLLSILR

Abb. 6

A, MALDI-TOF Massenspektrometrie der Fragmente des Trypsin-verdauten 48 kDa CnA α , welches von Lysaten hypertrophierten humanen Myokards isoliert wurde.

B, Masse, Aminosäure-Rest und Sequenz der tryptischen Fragmente des 48 kDa CnA α

C

MAAPEPARAAPP
PPGADRVVKA**VPFPP**THR**LTSEE**VF**DL**DGIP**RVD**
VLKNHLV**KEGRVDEE**I**ALRI**INE**GAA**IL**REK**TMIEVEAPITVCGDIHGQFFD
 LMK**YLF****LG**D**YVDR**GYFSIECVLYLWVLKILY**PSTL**FLLRG**NHECR**HLTEY**FTF**
 KQ**ECKI**KYSERVY**EACME**AFDSLPLA**ALLN**Q**QF**LC**VHG**GLS**PEI**HTLDDIRRL
 DRFKE**PPAF**GPMCDLL**WSDP**SEDFGNEK**SQE**H**F**SH**NTV**R**GCSY**F**YNYP**AV**CEF**
LQNNLL**SI**IRAHEAQDAGYRMYRK**SQ**T**TG**F**P**SL**ITIF**SAPNYLDVYNN**KAAV**

CnB

LKYENN**VMNIR**QFNCSPH**PYWLP**N**FMD**V**FTW**SL**PFV**GE**KVTE**ML**VNV**LS**ICSD**

CaM



DELMTEGEDQFDGSAA**ARKEI**IRNKIR**AIG**K**MARV**F**SVL**RE**ESES**VL**TLK** GL

AID

TPTGML**PS**GVLAGGR**QTL**Q**SAT**VEAIEAEK**AIR**GFSP**PHR**IC**SFEE**A**KGL**D**RIN**

NERM**PPR**K**DAV**Q**QD**GFNSLNTAHATENHG**TGN**HTAQ

D



CnA β : 387	MTEGEDQFDG-SAAARKEIIRNKIR AIG K MARV F SVL RE ESES VL TLK	GLTPTGMLP 442
	+ E ED FDG +AAARKE+IRNKIR AIG K MARV F SVL RE ESES VL TLK	GLTPTGMLP
CnA α : 378	GSE-EDGFDGATAAARKEVIRNKIR AIG K MARV F SVL RE ESES VL TLK	GLTPTGMLP 433
CnA β : 443	SGV L AGGR Q TLS AT VEA IEAEK AIR GFSP PHR IC SFEE A KGL D RIN ER MPPR K DAV Q QD 502	
	SGV L+GG+Q TLS AT VEA IEA++ AI+ GFSP H+I SFEEA KGL D RIN ER MPPR + DA+ D	
CnA α : 434	SGV LSGGK QTL Q SAT VEAIEADEAIKGFSPQH KITS F EEA K GL D RIN ER MPPR R DAMP SD 493	

Abb. 7

C, Aminosäuresequenz von CnA α . Die beim Trypsin-Verdau entstandenen Fragmente sind Fett gekennzeichnet, die Regulatorische Einheit ist unterstrichen, die grauen Boxen heben die funktionalen Domänen hervor. Der Pfeil zeigt die ermittelte Calpain-Schnittstelle.

D, vergleichende Sequenzanalyse der CnA α - und CnA β -Isoformen. Die flankierenden Regionen der Calpain-Schnittstelle (schwarzer Pfeil) zeigen eine 100%ige Sequenz-Homologie (grau unterlegt).

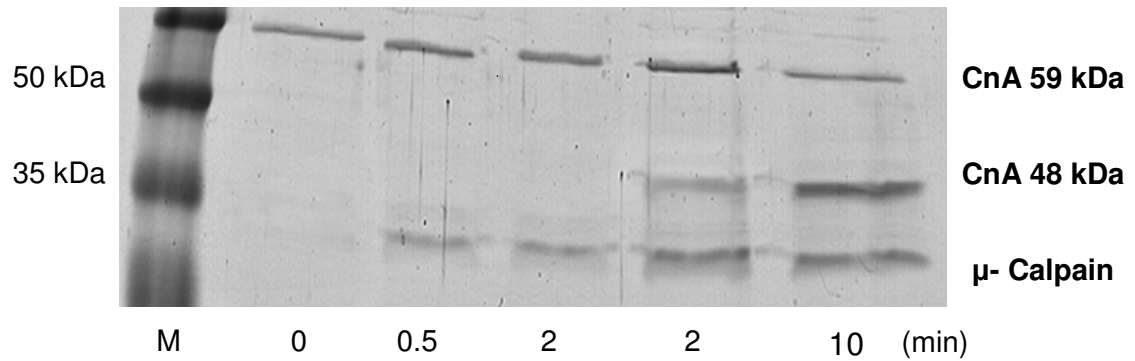
3.2 Calpain-Aktivität

Um zu untersuchen, ob Calpain die Protease ist, welche für den Verdau bzw. die Spaltung von Calcineurin verantwortlich ist, haben wir rekombinantes Calcineurin A mit rekombinanten μ -Calpain (0,1 U) bei RT inkubiert. Die Calpain-vermittelte Proteolyse ergab ein 48 kDa Fragment, d.h. das 59 kDa große Calcineurin wurde in ein großes 48 kDa Fragment und in ein kleines 11 kDa Fragment gespalten. Der Verdau stellte sich als zeitabhängig heraus. Durch die zusätzliche Gabe von Calpain-Inhibitor III konnte der Calcineurin A Verdau blockiert werden (Abb. 8). Um herauszufinden, ob die Spaltung von CnA Calmodulin-abhängig ist, untersuchten wir die μ -Calpain-vermittelte Proteolyse in An- und Abwesenheit von Calmodulin. Wir konnten jeweils eine 11 kDa und eine 59 kDa Bande detektieren, wenn wir in den Western-Blots Ak gegen den C-Terminus der Phosphatase Calcineurin einsetzten, d.h. der Verdau ist Calmodulin unabhängig.

Eine Beeinflussbarkeit der Calpain-Expression neonataler Kardiomyozyten und damit auch der Calpain-Aktivität konnten wir nachweisen. Nach einer 24 h Inkubation der Zellen mit Ang II war eine deutlich stärkere Protein-Expression zu sehen als in den unstimulierten Kardiomyozyten, wo nur Spuren von Calpain mittels Western-Blot detektierbar waren (Abb. 8).

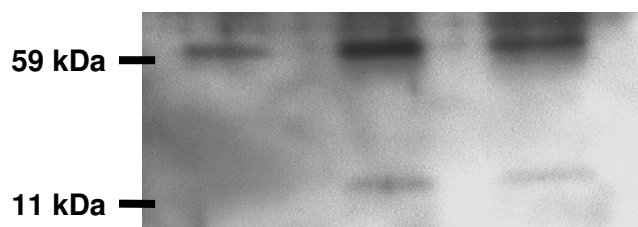
A

CnA	+	+	+	+	+
μ - Calpain	-	+	+	+	+
Calpain-Inhibitor III	-	-	+	-	-



B

CnA	+	+	+
μ - Calpain	-	+	+
Calmodulin	-	+	-



C

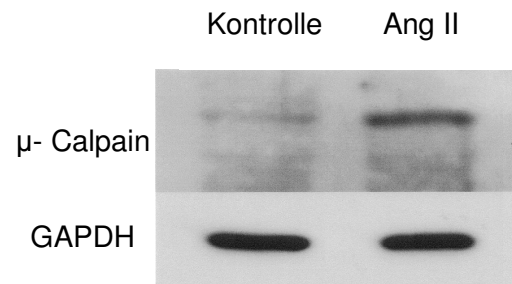


Abb. 8: Proteolyse von Calcineurin A

A, rekombinantes CnA α wurde mit rekombinanten μ -Calpain inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion gestoppt und Western-Blots mit Ak, welche gegen das N-terminale Ende von CnA gerichtet waren, durchgeführt. Nach 0,5 min war keine Proteolyse abgelaufen (nur 59 kDa Bande). Nach 2 min war ein zusätzliches 48 kDa Fragment detektierbar. Durch den Calpain-Inhibitor III wurde die Spaltung von CnA blockiert. (M = Marker)

B, mit Ak gegen den C-terminalen Abschnitt konnte das abgespaltene 11 kDa große Fragment nachgewiesen werden, welches die Autoinhibitorische Domäne des CnA trägt. Es zeigte sich weiterhin, dass die μ -Calpain-vermittelte Proteolyse von CnA Calmodulin-unabhängig ist.

C, in diesem Western-Blot wurde μ -Calpain detektiert. Dabei war eine deutliche Steigerung der Expression nach 24stündiger Stimulation der Kardiomyozyten mit Ang II im Vergleich mit den unstimulierten Zellen zu erkennen. Als Ladekontrolle diente GAPDH.

3.3 Calcineurin A in nukleären Extrakten und Zytosol

Mittels Western-Blot nukleärer Extrakte und zytosolischer Bestandteile von Kardiomyozyten konnten wir die Lokalisation von Calcineurin A untersuchen.

Dabei wurde zunächst ein Antikörper verwendet, welcher gegen den N-terminalen Abschnitt von Calcineurin gerichtet ist (Abb. 9). In den nukleären Extrakten von zuvor für 24 h mit Ang II stimulierten Kardiomyozyten konnten wir eine 48 kDa und eine 59 kDa große Bande nachweisen. Unter Verwendung des selben Antikörpers war nur 1 Bande (59 kDa) zu sehen, wenn neben dem Ang II auch Calpain-Inhibitor III (10µmol/l) für die kompletten 24 h zu dem Medium gegeben wurde. Calpain bewirkte also eine Spaltung von Calcineurin A (59 kDa) in ein 48 kDa und ein 11 kDa großes Fragment. Nach dem Verhindern der Calpain-vermittelten Spaltung von Calcineurin durch Gabe von Calpain-Inhibitor III wurde daher nur das vollständige Calcineurin A (59 kDa) im Zellkern nachgewiesen.

Die Entfernung des Ang II-Stimulus nach bereits 12 Stunden und die Inkubation der Zellen für weitere 12 h ohne Stimulus bewirkte einen Verbleib des gespaltenen CnA (48 kDa) im Kern. Das 59 kDa CnA wurde größtenteils aus dem Nukleus exportiert und war daher nur noch zytosolisch nachweisbar (Abb. 11). Wie bereits erwähnt, konnte durch Blockierung von Calpain die proteolytische Spaltung des CnA verhindert werden, wenn der Calpain-Inhibitor III über den gesamten Stimulationszeitraum zum Medium gegeben wurde. Wurde dem Medium der Calpain-Inhibitor jedoch erst nach bereits erfolgter 12stündiger Stimulation zugesetzt, konnte die Spaltung des CnA nicht mehr verhindert werden. Trotz anschließender Calpain-Blockierung und Entfernung des Ang II-Stimulus war nach weiteren 12 h nahezu ausschließlich das 48 kDa CnA nukleär lokalisiert. Der intakt gebliebene Anteil des Calcineurin-Pools wurde wieder aus dem Kern exportiert.

Nur Spuren von Calcineurin waren nukleär nachweisbar, wenn nach einer 12stündigen Ang II-Stimulation unter Einfluss von Calpain-Inhibitor III die

Kardiomyozyten für weitere 12 h unstimuliert gelassen wurden. Ungespaltenes Calcineurin konnte also bei fehlendem Stimulus den Kern wieder verlassen.

In den nukleären Extrakten unstimulierter Kardiomyozyten war kein Calcineurin im Western-Blot zu finden.

Weitere Western-Blots wurden erstellt mit einem Antikörper, welcher gegen den C-terminalen Abschnitt von Calcineurin A (Bereich der Autoinhibitorischen Domäne) gerichtet ist (Abb. 9). In den Zellkernextrakten, der für 24 h mit Ang II stimulierten Kardiomyozyten, war nur 1 Bande mit einer Größe von 59 kDa zu sehen. Dem durch Calpain gespaltenen Calcineurin A fehlt der C-terminale Abschnitt (11 kDa Rest) und damit der durch den Antikörper erkannte Teil. Damit lässt sich das Fehlen des 48 kDa großen Fragmentes im Western-Blot begründen. Nach der Zugabe von Calpain-Inhibitor III bei der 24 h Stimulation der Zellen war ebenfalls nur eine 59 kDa große Bande zu sehen.

In den mit Ang II stimulierten Kardiomyozyten betrug der prozentuale Anteil des 48 kDa Calcineurins, welchem die Autoinhibitorische Domäne fehlt, am Gesamtvolumen des nukleären Calcineurins $24 \pm 4\%$ ($n=6$; $P<0.01$) (Abb. 10).

Das kleine 11 kDa C-terminale Fragment war nur im Zytosol von Ang II-stimulierten Kardiomyozyten zu finden, nicht aber in den nukleären Extrakten (Abb. 10).

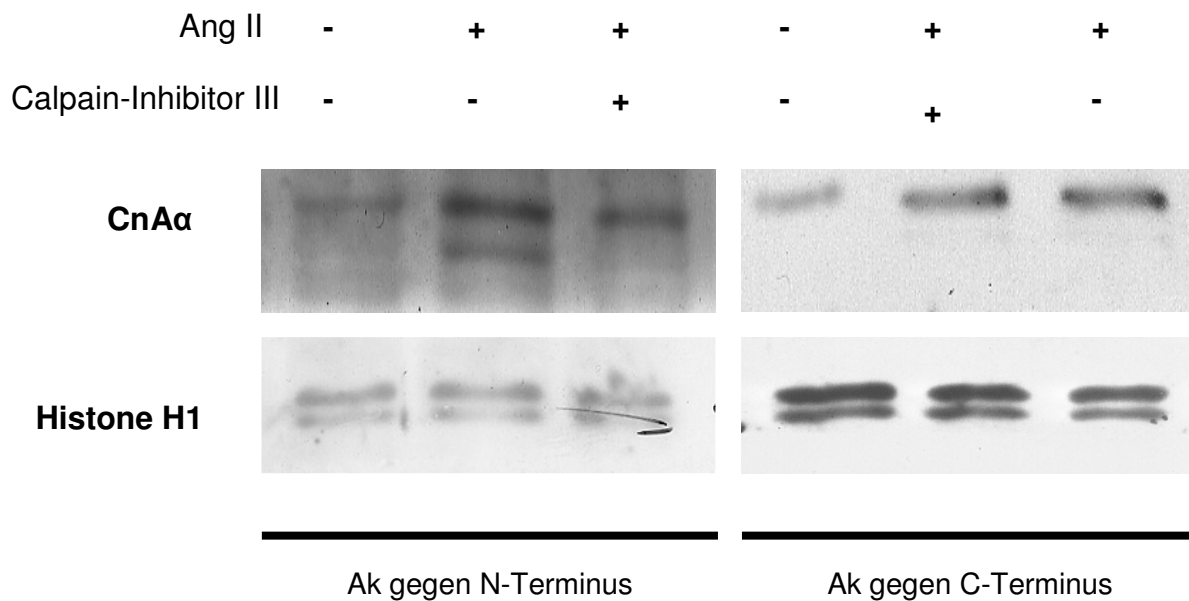


Abb. 9: Western-Blot der nukleären Extrakte mit Ak gegen CnA

Links, Calcineurin wurde detektiert mit Ak gegen den N-Terminus. Dabei war in unstimulierten Zellen der Gehalt an CnA im Zellkern unter der Nachweisgrenze. In Kardiomyozyten, welche mit Ang II stimuliert wurden, waren 2 Banden zu sehen: CnA (59 kDa) = volle Größe und Δ CnA (48 kDa) = proteolytisch gespalten. Der Einfluss des Calpain-Inhibitor III verhinderte die proteolytische Spaltung von CnA. Nach Calpain-Inhibitor III-Gabe war daher nur 1 Bande (59 kDa) zu sehen.

Rechts, Calcineurin wurde detektiert mit Ak gegen den C-Terminus. Dabei war Calcineurin in nukleären Extrakten unstimulierter Zellen wieder nicht nachweisbar. Nach Ang II-Stimulation war nur eine 59 kDa Bande zu sehen. Das proteolytisch gespaltene Δ CnA (48 kDa), welchem die Autoinhibitorischen Domäne fehlt, konnte nicht erfasst werden, da der Ak gegen den C-Terminus (fehlenden Teil) des Proteins gerichtet ist. Bei zusätzlicher Calpain-Inhibitor III-Gabe war wieder nur eine 59 kDa Bande zu sehen. Die Ladekontrolle erfolgte mit Histone H1.

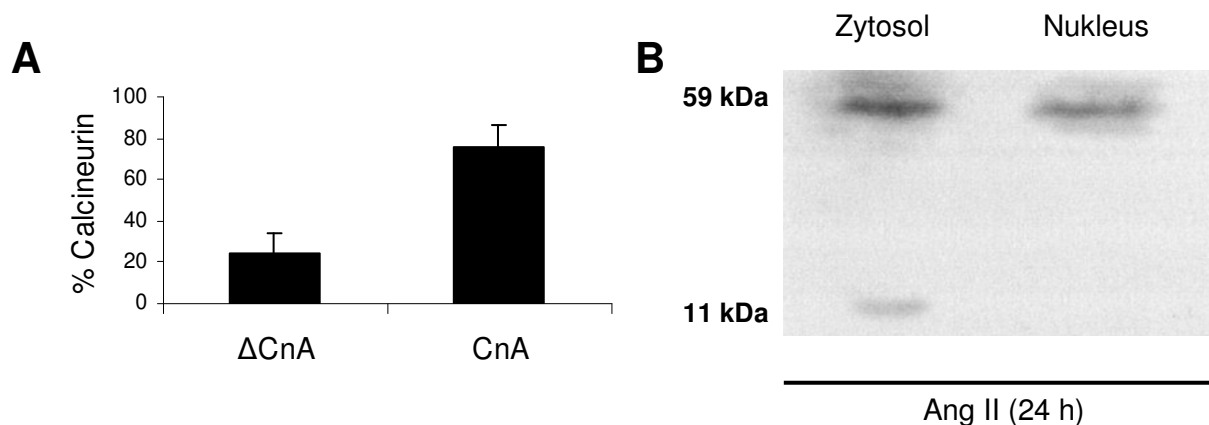


Abb. 10:

A, Relative Menge des gespaltenen Calcineurins. Der Anteil der 48 kDa Isoform des Calcineurins am gesamt nukleären CnA war $24 \pm 4\%$ ($n=6$; $P < 0.01$) in den mit Ang II stimulierten Kardiomyozyten.

B, Lokalisation des abgespaltenen 11 kDa Restes. Western-Blot mit Ak gerichtet gegen das C-terminale Ende (Autoinhibitorische Domäne) des Calcineurin A. Kardiomyozyten wurden für 24 h mit Ang II stimuliert. In zytosolischen Extrakten war das kleine 11 kDa Fragment nachweisbar, in den nukleären Extrakten wurde kein 11 kDa Fragment gefunden. Das vollständige Calcineurin A (59 kDa) war zytosolisch und nukleär detektierbar.

Ang II (0-24 h)	-	+	-	-	-
Ang II (0-12 h)	-	-	+	+	+
Calpain-Inhibitor III (0-24 h)	-	-	-	+	-
Calpain-Inhibitor III (12-24 h)	-	-	-	-	+

gesamte Zelle

Nukleus

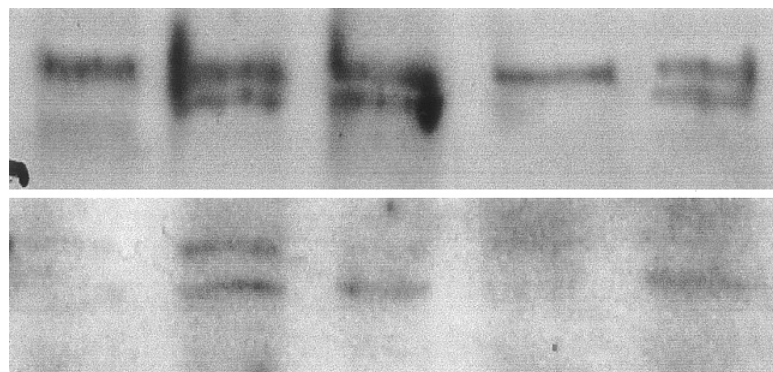


Abb. 11, Repräsentativer Western-Blot von CnA der gesamten Zelle und des Nukleus

Nach Stimulation der Kardiomyozyten für 24 h mit Ang II waren 2 Banden nachweisbar. Wurde das Ang II nach 12 h entfernt, blieb das kleine Fragment (48 kDa) im Kern nachweisbar. Die Proteolyse von CnA konnte durch Calpain-Blockierung während der Stimulationszeit verhindert werden. Die Entfernung von Ang II nach 12 h führte also in diesem Fall zu einem kompletten nukleären Export von CnA. Nach bereits erfolgter 12stündiger Ang II-Stimulation konnte die Zugabe von Calpain-Inhibitor III die proteolytische Spaltung des CnA nicht verhindern.

3.4 Lokalisation von Calcineurin im Humanen Myokard

Mittels Immunfluoreszenz gegen Calcineurin konnten wir die zelluläre Lokalisation der Phosphatase im gesunden und hypertrophierten menschlichen Myokard nachweisen. In den histologischen Schnitten der normalen Herzen war eine homogene zytosolische Verteilung von Calcineurin A erkennbar. Das Myokard aller Patientengruppen zeigte hingegen eine dominant nukleäre Lokalisation von CnA in ca. 70% der Kardiomyozyten. Dabei waren keine Unterschiede zwischen der Aortenstenose-, der hypertrophen Kardiomyopathie- und der KHK-Patientengruppe zu finden (Abb. 12).

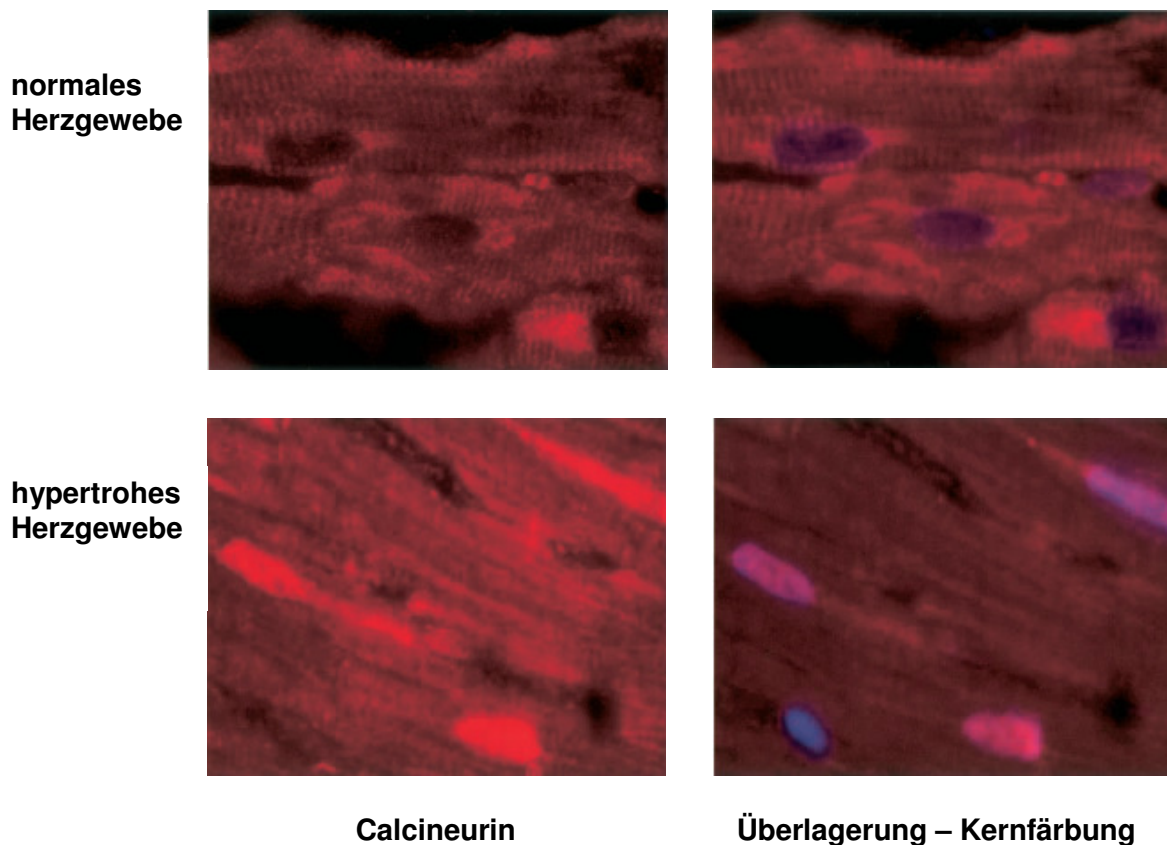


Abb. 12, repräsentative immunhistochemische Färbung von normalen human Herzgewebe und hypertrophen humanen Myokard. Im gesunden Herzen konnte kein CnA nukleär nachgewiesen werden. Im hypertrophen Myokard war eine deutliche nukleäre Anreicherung von CnA zu sehen. Die Antikörper waren gegen die Katalytische Domäne von CnA gerichtet. Die DAPI-Kernfärbung zeigt eine Überlagerung des nukleär lokalisierten Calcineurins.

3.5 Transfektion von GFP-Calcineurin A Plasmiden

3.5.1 Zelluläre Lokalisation GFP-fusioniertem Calcineurin A

Mit Hilfe der Transfektion von Kardiomyozyten mit dem GFP-CnA-Plasmid konnten die zelluläre Lokalisation von Calcineurin A unter verschiedenen Bedingungen untersucht werden (Abb. 13).

Zur Erstellung des GFP-CnA-Plasmides wurde Calcineurin in einen Vektor kloniert, der das Green Fluoreszenz Protein (GFP) in N-terminaler Stellung trägt. Dieses Plasmid wurde in Kulturen neonataler Kardiomyozyten transfiziert, welche anschließend verschiedenen Stimulationsversuchen unterzogen wurden.

In unstimulierten Zellen war zu jedem Untersuchungszeitpunkt eine zytosolische Lokalisation von Calcineurin A zu erkennen. Die Stimulation der Kardiomyozyten mit Ang II führte zu einer nukleären Translokation des GFP-CnA-Fusionsproteins. Eine Wegnahme des Ang II nach 12stündiger Stimulation führte nicht oder nur partiell zu einer Entfernung von Calcineurin A aus dem Zellkern. Nach Zugabe von Calpain-Inhibitor III, welcher eine proteolytische Abspaltung der Autoinhibitorischen Domäne von Calcineurin durch Calpain verhindert, und nach Wegnahme des Stimulus war keine dominant nukleäre Lokalisation von Calcineurin mehr zu erkennen. Die Entfernung von Calcineurin aus dem Kern gelang aber nur, wenn dem Medium der Calpain-Inhibitor bereits während der Stimulationsphase (erste 12 h) zugesetzt war.

Eine Zugabe von Calpain-Inhibitor III im Anschluss an die 12stündige Ang II-Stimulation führte auch nach Entzug des Stimulus nicht zu einer Änderung der dominant nukleären Lokalisation von Calcineurin. Die proteolytische Abspaltung der Autoinhibitorischen Domäne konnte bei einer nachträglichen Zugabe des Calpain-Inhibitors also nicht verhindert werden, was das Verbleiben von Calcineurin im Kern in diesem Versuch erklärt.

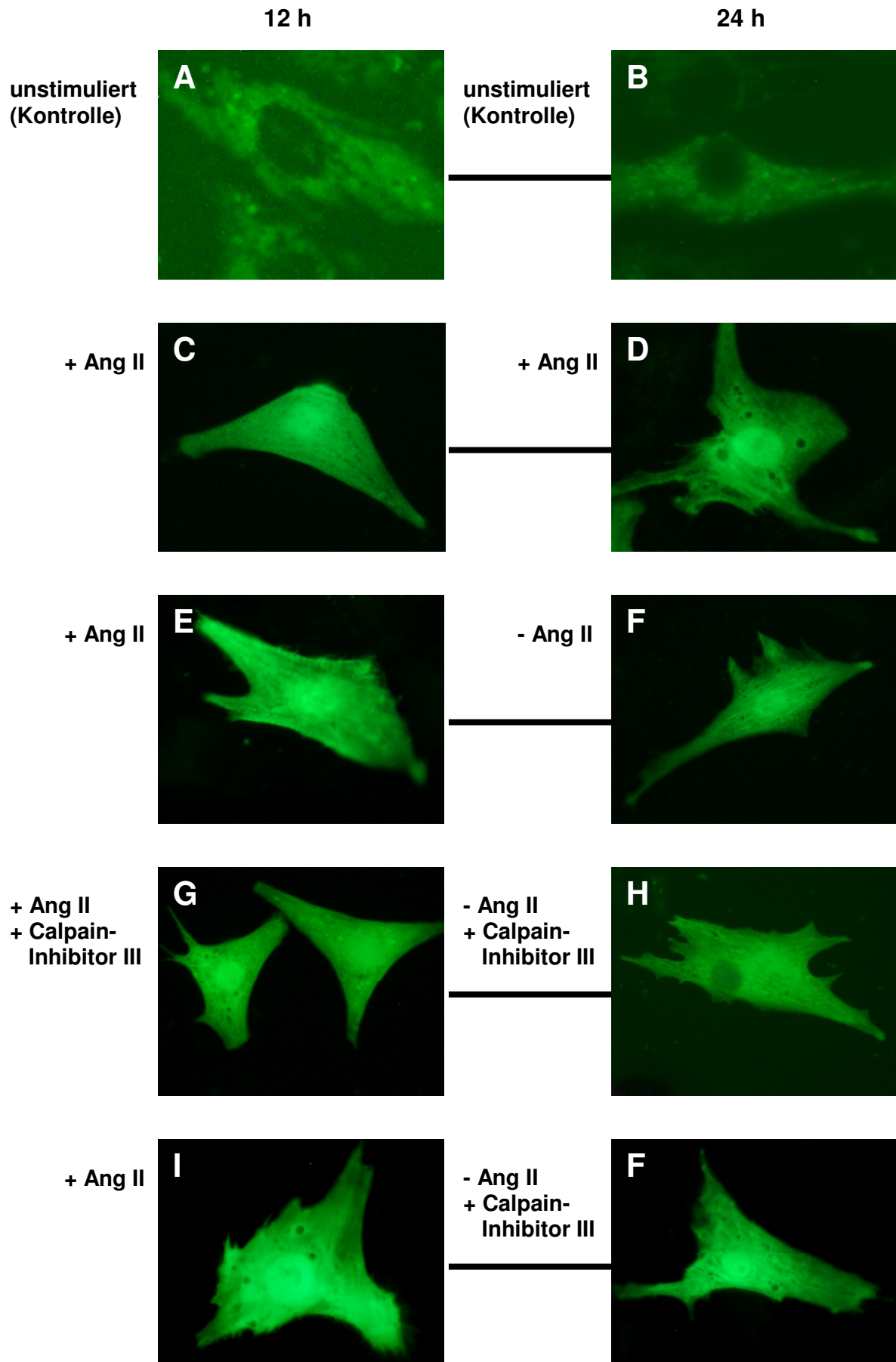


Abb. 13, A-J: GFP-CnA transfiziert in Kardiomyozyten

Neonatale Kardiomyozyten wurden mit dem GFP-Calcineurin-Konstrukt transfiziert. Die Calcineurinlokalisierung wurde anhand der Fluoreszenzverteilung (grün) nach den Stimulationsversuchen ausgewertet.

CnA verblieb zytosolisch (A,B), wenn die Zellen nicht stimuliert wurden. Unter Stimulation mit Ang II ließ sich eine deutliche nukleäre Translokation (C,D) von CnA nachweisen. Nach einer 12 h Ang II-Stimulation (E) und weiteren 12 h ohne Stimulus (F) verblieb CnA im Kern angereichert. CnA war nukleär lokalisiert bei Ang II-Stimulation unter Zugabe von Calpain-Inhibitor III (G). Eine Wegnahme des Stimulus unter Fortführung der Zugabe des Calpain-Inhibitors III führte zu einer Entfernung von CnA aus dem Kern (H). Eine 12 h Ang II-Stimulation (I) und erst nachträgliche Zugabe von Calpain-Inhibitor III unter Wegnahme des Stimulus führte nach weiteren 12 h nicht zu einer Entfernung von CnA aus dem Kern (J).

3.5.2 Zelluläre Lokalisation von GFP-fusionierten Calcineurin A ohne Autoinhibitorische Domäne

Um die Rolle der Autoinhibitorischen Domäne des Calcineurins genauer beschreiben zu können, wurde in diesen Versuch ein GFP-CnA-Konstrukt in Kardiomyozyten transfiziert, welchem die Autoinhibitorische Domäne fehlt.

Auch ohne Stimulation war eine dominant nukleäre Lokalisation des 48kDa großen Calcineurin-Restes zu sehen, was mit einer dauerhaften Aktivierung von Calcineurin erklärbar ist. Die zusätzliche Stimulation der Zellen führte zu keiner Änderung der Lokalisation des 48kDa Calcineurins. Auch die Zugabe vom Calpain-Inhibitor III konnte an der nukleären Translokation und damit an der Aktivierung der Δ CnA/NFAT-Transkription nichts ändern. Zum Vergleich dazu wurde nochmals das GFP-CnA (full-length)-Plasmid transfiziert, was die bereits oben beschriebenen Ergebnisse erbrachten (Abb. 14).

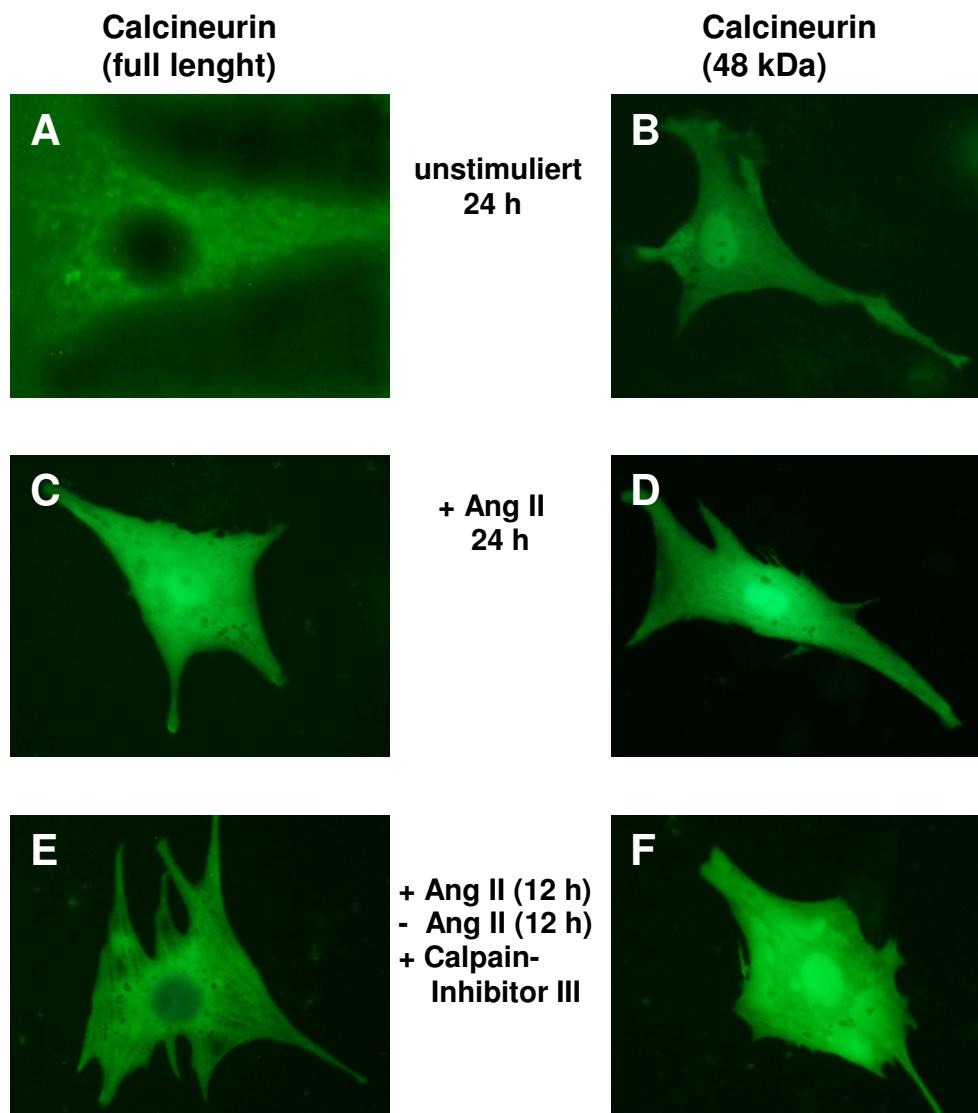


Abb. 14: GFP-CnA (full length) und GFP-CnA (48 kDa) transfiziert in Kardiomyozyten
 GFP-CnA (full length) verbleibt unstimuliert zytosolisch (A), unter Ang II-Stimulation ist eine nukleäre Lokalisation zu erkennen (C). Unter dem Einfluss des Calpain-Inhibitor III ist nach Wegnahme des Ang II-Stimulus eine nahezu vollständige Entfernung von CnA (full-length) aus dem Kern zu erkennen (E).
 GFP-CnA (48 kDa) war nukleär zu finden, auch ohne zusätzlichen Stimulus (B). Die Stimulation mit Ang II brachte also keine zusätzlichen Veränderungen (D). Die Wegnahme des Stimulus nach 12 h hatte auch unter Calpain-Inhibitor III-Zugabe keinen sichtbaren nukleären Export zu Folge (F).

3.6 Calcineurinaktivität im Luciferase-Assay

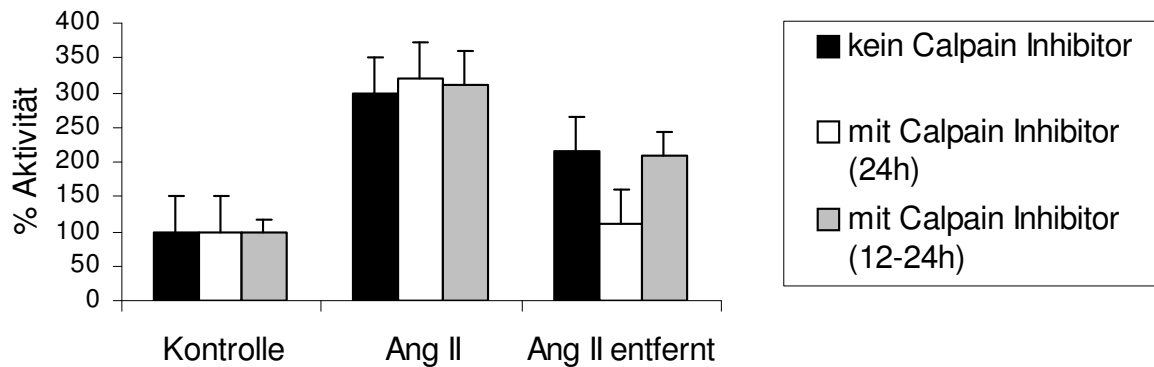
Die Aktivität von Calcineurin A wurde mittels NFAT-Reporter-Assays ermittelt. Nach der Aktivierung von Calcineurin dephosphoryliert und aktiviert dieses das NFAT. Wir haben in diesen Experiment also die Calcineurinaktivität indirekt über die Aktivität des NFAT-Reporters bestimmt. Dazu wurden Kardiomyozytenkulturen mit dem NFAT-Luci-Plasmid transfiziert und anschließend die Luciferaseaktivität bestimmt. Die Luciferaseaktivität von unstimulierten Kardiomyozyten wurde als 100% gesetzt. Eine Stimulation mit Ang II (100nmol/l) für 24 h bewirkte eine dreifache Steigerung ($301 \pm 16\%$; $n=6$; $P < 0.01$) der Calcineurinaktivität, gemessen über die abgegebene Lumineszenz. Die Stimulation der Kardiomyozyten und die gleichzeitige Gabe von Calpain-Inhibitor III (10 μ mol/l) bewirkten nach 24 h eine 3.2fache Steigerung ($321\% \pm 9\%$, $n=6$, $P < 0,01$) der Calcineurinaktivität, also keine deutliche Aktivitätsänderung im Vergleich zur reinen Stimulation (Abb. 15).

Trotz Wegnahme des hypertrophen Stimulus (Ang II) nach 12stündiger Stimulation der Zellen war nach weiteren 12 h eine immer noch signifikante Steigerung der Luciferaseaktivität ($214 \pm 17\%$; $n=6$; $P < 0.01$) im Vergleich zu den Kontrollwerten zu messen. Die Blockierung der Calpain-Aktivität durch die Zugabe von Calpain-Inhibitor III für die gesamten 24 h im selben Experiment führte zu einer annähernden Normalisierung der Calcineurinaktivität (111 ± 9 , $n=6$, $P < 0,01$), 12 h nach Entfernung des Ang II-Reizes. Nachträgliche Blockierung der Calpain-Aktivität, d.h. eine Calpain-Inhibitor-Zugabe nach bereits erfolgter 12stündiger Stimulation der Kardiomyozyten, ergab am Untersuchungszeitpunkt (24h) eine deutlich erhöhte Transkriptionsaktivität ($209 \pm 10\%$; $n=6$; $P < 0,01$) des NFAT-Luci-Reporters.

Die Calcineurinaktivität blieb also nach der Entfernung des Wachstumsstimulus, auch bei nachträglicher Blockierung der Calpain-Aktivität, auf erhöhtem Niveau. Nur die Verhinderung der Calpain-induzierten Proteolyse von Calcineurin über den gesamten Stimulationszeitraum führte nach Entfernung des hypertrophen Stimulus zu einer Reduktion der Calcineurinaktivität auf Höhe der Kontrollwerte.

Um zu ermitteln, ob die Autoinhibitorische Domäne die CnA/NFAT-Interaktion beeinflusst, wurden HEK-293-Zellen mit der dauerhaft aktiven Form des CnA (Δ CnA) transfiziert. Die Co-Transfektion erfolgte mit dem NFAT-Luci-Reporter-Plasmid. Die Stimulation der Zellkulturen mit Ang II resultierte in einer dreifachen Erhöhung der Calcineurin-Aktivität ($301 \pm 16\%$; $n=6$; $P < 0,01$), indirekt gemessen über die Höhe der Luciferaseaktivität. Die Transfektion der Zellen mit Δ CnA erhöhte die CnA/NFAT-Transkriptionsaktivität signifikant ($367 \pm 16\%$; $n=6$; $P < 0,01$). Die Blockade der CnA/NFAT-Interaktion durch das inhibitorische Peptid VIVIT führte zu einer deutlichen Abnahme der Luciferaseaktivität ($121 \pm 9\%$; $n=6$; $P < 0,01$) und damit auch der CnA/NFAT-Transkriptionsaktivität. Es konnte also gezeigt werden, dass die CnA/NFAT-Interaktion durch die proteolytische Abspaltung der Autoinhibitorischen Domäne nicht beeinflusst wird.

A



B

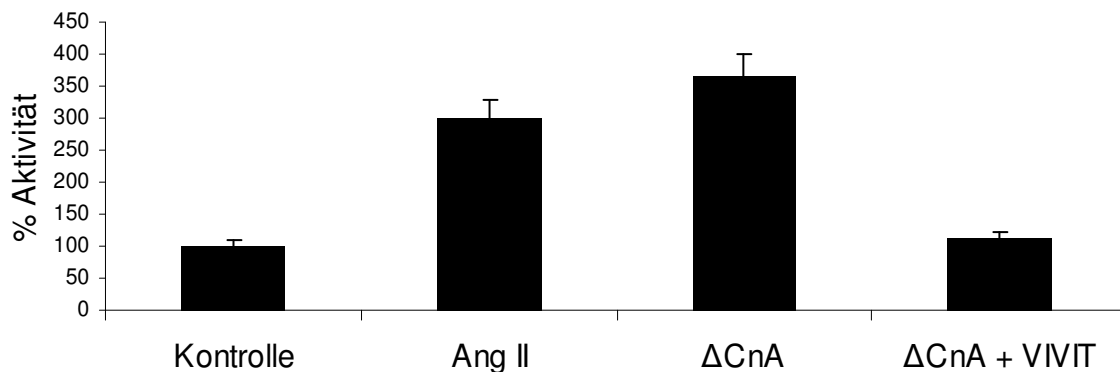


Abb. 15:

A, Calcineurinaktivitätsmessung mittels NFAT-Reporter-Assay. Die Stimulation der Kardiomyozyten mit Ang II führte nach 24 h zu einer dreifachen Erhöhung der Calcineurinaktivität. Eine gleichzeitige Gabe von Calpain-Inhibitor III brachte keine signifikante Aktivitätsänderung. Jedoch blieb die CnA/NFAT-Transkriptionsaktivität nach 12stündiger Stimulation und anschließender Entfernung des Stimulus für weitere 12 h auf hohem Niveau ($214 \pm 17\%$; $n=6$; $P < 0.01$), wenn kein Calpain-Inhibitor ergänzt wurde. Demgegenüber fiel die Aktivität auf (111 ± 9 , $n=6$, $P < 0,01$), wenn die Calpainaktivität für die gesamten 24 h blockiert wurde.

B, CnA/NFAT-Interaktion. Die Stimulation der Zellen mit Ang II oder die Transfektion der dauerhaft aktiven Form des CnA (Δ CnA) führte zu einem signifikanten Anstieg der CnA/NFAT-Transkriptionsaktivität, gemessen über die Luciferaseaktivität des NFAT-Luci-Reporterassays. Die Zugabe des synthetischen Peptides VIVIT, welches die CnA/NFAT-Interaktion blockiert, führte zu einer signifikanten Minderung der Luciferaseaktivität.

4.0 Diskussion

4.1 Calcineurin im humanen Myokard

Ob die wichtige Rolle des Calcineurins bei der Vermittlung der hypertrophen Antwort im Herzen, welche durch zahlreiche Tiermodelle bestätigt werden konnte, auch auf den Menschen übertragbar ist, war Gegenstand einiger Studien der vergangenen Jahre.

Lim und Molkentin (85) beobachteten eine erhöhte Calcineurinaktivität (400%) im Herzgewebe von Patienten mit Herzinsuffizienz (EF durchschnittlich 16%) im Vergleich zum Myokard von Herzgesunden (100%). In einer Studie von Tsao et al. (86) zur Calcineurinaktivität im Myokard von Herzinsuffizienzpatienten wurde unter Verwendung eines Ak gegen den C-Terminus von Calcineurin keine Variationen zwischen Patienten- und Kontrollgewebe festgestellt. Die N-terminale Immunoreaktivität der Patientenproben war jedoch gegenüber den Kontrollproben deutlich erhöht. Dieses Ergebnis deutet an, dass proportional weniger CnA in voller Länge im kranken Gewebe vorhanden ist, aber zusätzlich ein erheblicher Teil von Calcineurin ohne C-Terminus (ohne Autoinhibitorische Domäne) im kranken Herzgewebe angereichert wird.

Ein Vergleich von Herzgewebe im dekompensierten Stadium und Herzgewebe im kompensierten Stadium der Hypertrophie bezüglich der Calcineurinaktivität ergab eine Erhöhung der enzymatischen Aktivität in beiden Gruppen. Die Steigerung im dekompensierten Stadium ist wahrscheinlich größtenteils auf die erhöhte Calcineurin-Protein-Expression zurückzuführen, wohingegen im kompensierten Stadium der Hypertrophie sowohl die Protein-Expression erhöht als auch die spezifische Aktivität gesteigert ist (87).

In einer Studie unserer Arbeitsgruppe (81) war im hypertrophierten nicht-dekompensierten humanen Myokard eine erhöhte Calcineurinaktivität nachzuweisen. Unter Benutzung von Antikörpern gegen den N-terminalen Abschnitt (Katalytische Domäne) von CnA zeigte sich auch eine erhöhte CnA-Protein-Expression.

Bei der Benutzung von Antikörpern, welche spezifisch waren für den C-Terminus (AID), war ein vermindertes Signal im Vergleich zum Normalgewebe

zu detektieren, was in ähnlicher Weise schon von Tsao et al. beschrieben wurde (86). Da die mRNA-Analyse keine neuen Splicingvarianten ergab, kann man davon ausgehen, dass es sich bei der Abspaltung der C-terminalen Region des CnA um eine posttranslationale Veränderung handelt. Die Detektion von zwei Banden unterschiedlichen Molekulargewichtes (59 kDa, 48 kDa) im hypertrophierten Myokard bei Verwendung eines CnA N-Terminus-spezifischen Ak spricht für eine partielle Degradation von CnA im C-terminalen Bereich, was vereinbar mit der Abspaltung der Autoinhibitorischen Domäne ist.

In der vorliegenden Arbeit wurde diese Hypothese wieder aufgegriffen. Bei der Immunopräzipitation von Calcineurin aus hypertrophierten humanen Myokard wurden unter Verwendung von Ak gegen den N-terminalen CnA-Abschnitt eine 59 kDa (CnA in voller Länge) und eine 48 kDa Bande nachgewiesen. Die 48 kDa Bande wurde isoliert, massenspektrometrisch analysiert und sequenziert, um die genaue proteolytische Spaltungsstelle zu ermitteln. Dabei konnte das C-terminale Ende (AS 425-521) inklusive der AID nicht nachgewiesen werden.

In transgenen Tiermodellen (57) führte die Überexpression von dauerhaft aktiven CnA (ohne Autoinhibitorische Domäne) zur Hypertrophie des Herzens. Gleiches ist auch nach posttranslationaler proteolytischer Abspaltung der AID zu erwarten, da diese Form des Calcineurins ebenfalls dauerhaft aktiv ist.

Schon 1988 konnte Tallant et al. (88) eine proteolytische Spaltung von Calcineurin durch die Calcium-abhängige Protease Calpain nachweisen. Tallant beschrieb, dass es neben dem reversiblen Aktivierungsweg über Ca^{2+} /Calmodulin eine irreversible Aktivierung der Phosphatase Calcineurin gibt, die Ca^{2+} /Calmodulin-unabhängig ist. Weitere Arbeiten zeigten, dass die Phosphataseaktivität des gespaltenen Calcineurins deutlich höher ist, als die Aktivität des Ca^{2+} /Calmodulin-stimulierten Enzyms (88, 89). Während die Katalytische Domäne resistent gegenüber Proteolyse ist, zeigt der C-terminale Abschnitt der Regulatorischen Domäne des Calcineurins, welcher die Autoinhibitorische Domäne enthält, eine Sensitivität gegenüber proteolytischen Verdau (36).

Eine erst kürzlich veröffentlichte Arbeit (90) zeigte, dass es im Ischämie-reperfundierten Myokard auf Grund der intrazellulären Ca^{2+} -Erhöhung zu einer Steigerung der μ -Calpain- und m-Calpain-Expression sowie zu einer deutlichen Erhöhung der Calcineurinaktivität kommt.

Ein erhöhtes intrazelluläres Calcium während der Myokardhypertrophie könnte also auch über die Aktivierung von Calpainen zu einer dauerhaften und verstärkten Calcineurinaktivierung führen.

Wir gehen davon aus, dass es bei dem von uns verwendeten humanen Herzgewebe zu einer Calpain-vermittelten Spaltung von Calcineurin *in vivo* kam. Die vergleichende Sequenzanalyse der α - und β -Isoform des Calcineurins, welche beide im Herzen exprimiert werden (77), zeigt eine 100%ige Homologie der AS-Sequenz um die von uns ermittelte Calpain-Schnittstelle (AS 424). Calpain spaltet wahrscheinlich beide Calcineurin-Isoformen und erzeugt damit dauerhaft aktive Enzyme.

4.2 Calpain ist verantwortlich für Calcineurinspaltung/aktivierung

Unsere Experimente ergaben, dass Calpain nur eine Schnittstelle im Calcineurin hat (AS 424). Der isolierte proteolytische CnA-Verdau mit μ -Calpain führte zu einer Spaltung des 59 kDa großen CnA in ein 48 kDa großen Rest und ein 11 kDa Fragment. Die Schnittstelle liegt im C-terminalen Bereich von CnA. Das kleine 11 kDa Fragment war daher nur mit Ak gegen den C-Terminus detektierbar. Weiterhin stellte sich in unseren Versuchen der CnA-Verdau als Calmodulin-unabhängig heraus.

Lakshmikuttyamma et al. (90) konnte beim m-Calpain-Verdau von Calcineurin (aus humanen Herzen gereinigt) in Abwesenheit von Calmodulin ebenfalls nur eine Spaltungsstelle (46 kDa Bande) nachweisen. Dahingegen waren nach Zugabe von Calmodulin zwei Fragmente (48 kDa, 54 kDa) nachweisbar. In beiden Fällen war die Calcineurinaktivität nach der Spaltung stark erhöht.

In einer Studie zur Calpain-vermittelten Calcineurinspaltung im neuronalen Gewebe (91) wurden drei Calpain-Schnittstellen entdeckt. Zwei dieser

gespaltenen Calcineurin-Fragmente waren dauerhaft aktiv, genau wie das 48 kDa Fragment aus unserer Arbeit.

Auch wenn die Ergebnisse der Studien hinsichtlich der Anzahl der Calpain-Schnittstellen und der Größe der Calcineurin-Fragmente uneinheitlich sind, zeigten alle gespaltenen Calcineurin-Formen uniform eine erhöhte und dauerhafte Phosphataseaktivität.

Calpaine sind Ca^{2+} -abhängige Cysteinproteasen und eine der wichtigsten Mediatoren von Ca^{2+} -Signalen in biologischen Systemen (92). Es existieren zwei Isoenzyme mit unterschiedlicher Ca^{2+} -Sensitivität: μ -Calpain (Calpain 1) ist aktiv bei micromolaren Ca^{2+} -Konzentrationen, m-Calpain (Calpain 2) ist aktiv bei millimolaren Ca^{2+} -Konzentrationen. Es ist bisher nicht klar, welche genaue Funktion die Calpain-Isoformen im Herzen ausüben.

Da die Calpain-vermittelte Proteolyse jedoch ein starker Aktivator des CnA/NFAT-Signalweges ist, konnte durch einige Arbeiten belegt werden. So wurde gezeigt, dass die Proteolyse der endogenen CnA-Inhibitoren Cain/Cabin durch μ -Calpain zur Erhöhung der Calcineurinaktivität beiträgt (93). Die Inhibition von Calpain verhindert neben der Cain/Cabin-Spaltung auch die Calcineurinaktivierung. Das zeigt, dass die Aktivierung von Calcineurin und die Cain/Cabin-Spaltung Calpain-abhängig sind.

Eine andere Arbeit (94) konnte zeigen, dass in Ischämie-reperfundierten Herzen natürliche Calpain-Inhibitoren vermindert und Calpaine selbst vermehrt exprimiert werden. Die Störungen des intrazellulären Ca^{2+} -Haushaltes während Ischämie und Reperfusion führen dazu, dass die Calpain-Inhibitoren, welche im normalen Myokard eine wichtige Rolle bei der Regulation der Calpaine einnehmen, selbst proteolysiert werden und somit das Calpain ungehindert agieren kann. Diesen Mechanismus der Calpain-Aktivierung und die anschließende Calcineurinspaltung kann man sich auch gut für hypertrophiertes Myokard vorstellen.

In unserer Arbeit fanden wir eine verstärkte Calpain-Expression in Kardiomyozyten, nach Stimulation dieser mit Ang II, was sehr gut zu der

Hypothese der verstärkten Calpain-vermittelten Proteolyse von Calcineurin im hypertrophierten Myokard passt.

4.3 Calcineurin ist im aktivierten Zustand nukleär lokalisiert

In der vorliegenden Arbeit konnten wir mit immunhistochemischen Färbungen die überwiegend nukleäre Lokalisation von Calcineurin A im hypertrophierten humanen Myokard nachweisen. Um diese Beobachtungen zu bestätigen, führten wir Transfektionsexperimente mit Kulturen neonataler Kardiomyozyten durch. Durch Klonierung erstellten wir ein Plasmid, in welchem das Calcineurin an ein GFP-Fluoreszenzprotein geheftet ist. Durch Transfektion dieses Plasmides hatten wir die Möglichkeit die zelluläre Lokalisation von Calcineurin unter verschiedenen Bedingungen nachzuvollziehen.

Während in den unstimulierten Zellen eine zytoplasmatische Lokalisation von Calcineurin zu erkennen war, führte die Ang II-Stimulation zu einer nukleären Translokation, was die Resultate früherer Arbeiten bestätigt (95, 96). Calcineurin verbleibt also nach der NFAT-Aktivierung nicht im Zytosol, sondern geht im Komplex mit NFAT in der Zellkern über. So beschrieben es auch mehrere Studien (97, 98), wobei diese propagieren, dass Calcineurin im Zellkern die Aufgabe hat, NFAT kontinuierlich zu dephosphorylieren und somit zu aktivieren. Zhu et al. (53) beschrieben hingegen, dass die Bindung von Calcineurin an NFAT den nukleären Export der Transkriptionsfaktoren verhindert und erst so eine effektive Transkription gewährleistet wird. Die Arbeitsgruppe um Zhu fand heraus, dass NFAT über zwei nukleäre Exportsequenzen verfügt (NES1, NES2), welche vom Crm1-Exportprotein (99) erkannt werden und daher zum Verlassen des Zellkerns notwendig sind. Calcineurin bindet bzw. maskiert diese NES und verhindert dadurch kompetitiv die Interaktion mit dem Crm1-Exportprotein und somit den nukleären Export der NFAT-Transkriptionsfaktoren. Interessanterweise konnte sogar katalytisch inaktives Calcineurin den Crm1-vermittelten Export von NFAT verhindern (53).

Bezug nehmend auf unsere Hypothese der Calpain-vermittelten Proteolyse und dauerhaften Aktivierung von Calcineurin, ließen wir die Kardiomyozytenkulturen nach vorheriger Ang II-Stimulation für weitere 12 h unstimuliert. Tatsächlich war Calcineurin noch immer prominent im Nukleus lokalisiert. Setzten wir jedoch einen Calpain-Inhibitor während der Stimulationsphase ein, kam es nach Wegnahme des Stimulus zu einem vollständigen nukleären Export von Calcineurin. Wir gehen also davon aus, dass es bei Stimulation der Kardiomyozyten zu einer Aktivierung von Calpain kommt, welches die Abspaltung der Autoinhibitorischen Domäne des Calcineurins vermittelt. Dieses dauerhaft aktive Calcineurin bleibt auch nach Wegnahme des Stimulus im Komplex mit NFAT nukleär lokalisiert.

In der Western-Blot-Analyse nukleärer Extrakte von stimulierten Kardiomyozyten konnten wir eine 59 kDa und eine 48 kDa Bande detektieren, vereinbar mit der nukleären Lokalisation von Calcineurin in voller Länge und Calcineurin mit fehlendem C-Terminus. Die gespaltene, dauerhaft aktive Form hatte dabei einen Anteil von bis zu 30% am gesamt nukleären Calcineurin. Mit Antikörpern spezifisch für das C-terminale Ende von CnA konnten wir das 11 kDa Fragment, welches die Autoinhibitorische Domäne enthält, ausschließlich zytosolisch nachweisen, was für die zytosolische Spaltung von CnA spricht. Auch in diesen Versuchen konnten wir durch Calpain-Blockierung die Proteolyse von Calcineurin verhindern. Im Western-Blot war daher nur die 59 kDa Bande (CnA in voller Länge) nach Ang II-Stimulation zu sehen. Die Wegnahme des Stimulus bewirkte wiederum einen vollständigen nukleären Export.

Durch Transfektion von GFP-markierten CnA, dem die AID fehlt und das damit dauerhaft aktiv ist, konnten wir die Calpainwirkung modellhaft nachvollziehen. Auch ohne Stimulation war eine nukleäre Anreicherung von Calcineurin zu sehen. Die Verwendung des Calpain-Inhibitors hatte in diesen Fall, genau wie bei bereits erfolgter Abspaltung der AID, keinen Effekt.

Unsere Experimente verdeutlichen neben der Existenz der Calpain-vermittelten Aktivierung von Calcineurin im Myokard auch die Potenz dieses Aktivierungsweges. Da proteolytisch gespaltenes Calcineurin auch nach

Wegnahme eines Stimulus nukleär lokalisiert bleibt, wird die Transkriptionsleistung der NFAT dauerhaft erhöht.

4.4 Calcineurinaktivität

Da die direkte Calcineurinaktivitätsmessung über die Messung der Phosphataseaktivität durch die Hintergrundaktivität anderer Phosphatasen des Herzens oft ungenau ist (100), bedienten wir uns eines NFAT-Luciferase-Reporter-Assays. Die Stimulation der Kardiomyozyten mit Ang II für 24 h erhöhte die Calcineurinaktivität im Vergleich zu unstimulierten Zellen auf das dreifache, indirekt gemessen über die abgegebene Lumineszenz. Dieses Ergebnis passt zu den Resultaten einer Reihe von *in vivo*- und *in vitro*-Studien, welche die Calcineurinaktivität in unterschiedlichen Hypertrophie-Modellen untersuchten.

So ließen sich bei einer induzierten druckbedingten Hypertrophie durch abdominelles Aortenbanding und bei einer trainingsinduzierten Herzhypertrophie starke Erhöhungen der Calcineurinaktivität nachweisen (101, 102). Eine Endothelin-1 (ET-1)-Stimulation führte zur hypertrophen Reaktion von Kardiomyozytenkulturen und induzierte eine ebenfalls dreifache Steigerung der CnA-Aktivität (103).

Mit der Annahme, dass ein gewisser Anteil dauerhaft aktiven Calcineurins nach hypertropher Stimulation der Kardiomyozyten vorhanden ist, dürfte sich nach Wegnahme des Ang II-Stimulus keine Normalisierung der Transkriptionsaktivität einstellen. Tatsächlich war in unseren Experimenten eine immer noch zweifache Aktivitätserhöhung im Intervall zur Stimulationsphase zu messen. Nur durch Blockierung der Calpain-vermittelten proteolytischen Abspaltung der Autoinhibitorischen Domäne des Calcineurins durch die Zugabe eines Calpain-Inhibitors, war die Normalisierung der Calcineurinaktivität im selben Versuch zu erreichen.

Um zu überprüfen, ob die Autoinhibitorische Domäne die CnA/NFAT-Interaktion beeinflusst, blockierten wir die CnA/NFAT-Verbindung durch das synthetische

Peptid VIVIT. Dieses bindet an den Calcineurin-Bindemotiven des NFAT und inhibiert damit die Interaktion der beiden Bindungspartner, ohne die Phosphataseaktivität von Calcineurin zu blockieren (104).

Wir transfizierten neben unseren NFAT-Luciferase-Reporter-Plasmides auch die aktive Form des Calcineurins (Δ CnA), was auch ohne zusätzliche Stimulation zu deutlich erhöhten Werten in der Aktivitätsmessung führte. Durch Zugabe von VIVIT konnte die Zunahme der Transkriptionsaktivität verhindert werden. Daher gehen wir davon aus, dass der Verlust der Autoinhibitorischen Domäne die Interaktion zwischen Calcineurin A und den NFAT-Transkriptionsfaktoren nicht affiziert.

4.5 Model der dualen Aktivierung von Calcineurin

Basierend auf unseren Ergebnissen gehen wir davon aus, dass es zwei Wege der Calcineurinaktivierung gibt. Im konventionellen Mechanismus wird Calcineurin durch dauerhaft erhöhte Calcium-Spiegel aktiviert (36). Nach der Ca^{2+} -induzierten Calmodulinbindung an Calcineurin kommt es zu einer Konformationsänderung mit der resultierenden Freigabe des Katalytischen Zentrums durch die Verlagerung der Autoinhibitorischen Domäne, wie oben beschrieben. Aktiviert über diesen Mechanismus geht Calcineurin in den Zellkern über, verbleibt dort aber nur solange, wie die Zelle stimuliert wird bzw. intrazellulär erhöhte Ca^{2+} -Level vorliegen (Abb. 16, linke Hälfte).

Ein zusätzlicher und für Herzgewebe neu beschriebener Mechanismus der Calcineurinaktivierung läuft über die Calpain-vermittelte proteolytische Abspaltung der Autoinhibitorischen Domäne. Diese führt zu einer dauerhaft aktiven Form und wahrscheinlich dauerhaft nukleären Lokalisation von Calcineurin. Die Calcineurinaktivierung über diesen Weg ist nicht mehr reversibel, so dass Calcineurin zusammen mit den NFAT-Transkriptionsfaktoren eine persistierende Induktion hypertropher Gene verursachen kann (Abb. 16, rechte Hälfte).

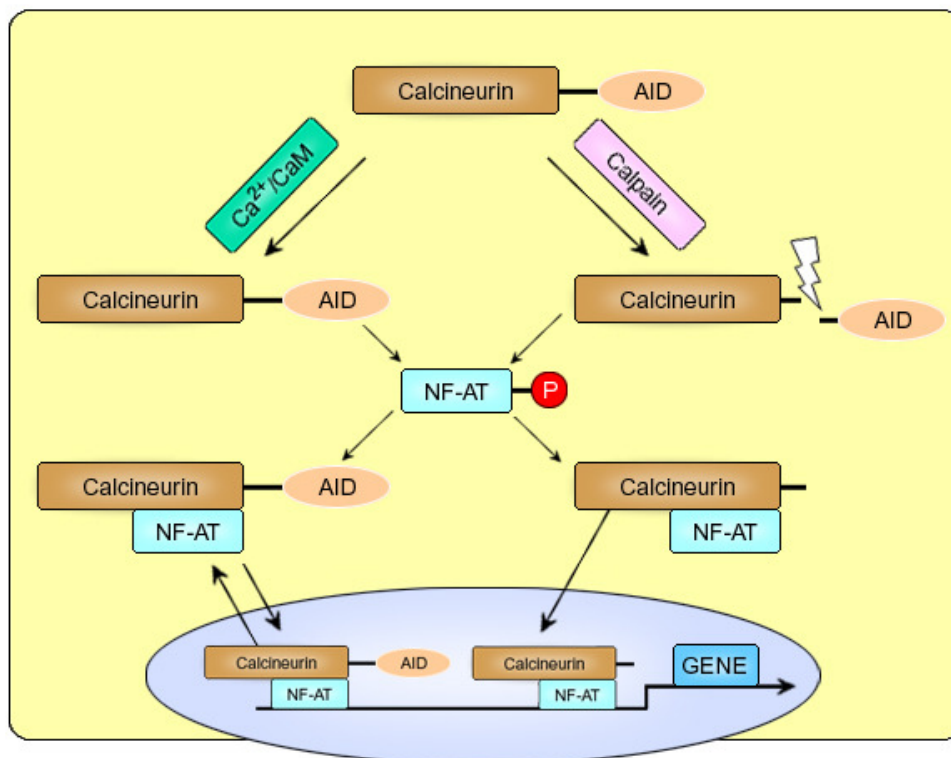


Abb. 16, Model der dualen Calcineurin Aktivierung

Links, reversible Calcineurinaktivierung über $Ca^{2+}/Calmodulin$ -Bindung

Rechts, irreversible Calcineurinaktivierung über Calpain-vermittelte proteolytische Abspaltung der Autoinhibitorischen Domäne

Die Phosphatase Calcineurin nimmt eine zentrale Stellung bei der pathologischen Hypertrophie des Herzens ein. Die Calpain-vermittelte Calcineurinaktivierung, welche nach unserer Ansicht ausschließlich im kranken Herzen vorkommt, könnte ein selektives therapeutisches Ziel zur Verhütung und Therapie von Herzhypertrophie und Herzinsuffizienz sein, ohne eine eventuelle physiologische Rolle des Calcineurins einzuschränken.

5.0 Literaturverzeichnis

1. Ritter O, Neyses L. 2003. The molecular basis of myocardial hypertrophy and heart failure. *Trends Mol. Med.* 9:313-21
2. Molkenin JD. 2001. Calcineurin, mitochondrial membrane potential, and cardiomyocyte apoptosis. *Circ. Res.* 88:1220-2
3. Bultynck G, Vermassen E, Szlufcik K, De Smet P, Fissore RA, Callewaert G, Missiaen L, De Smedt H, Parys JB. 2003. Calcineurin and intracellular Ca²⁺-release channels: regulation or association? *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 311:1181-93
4. Lorell BH, Carabello BA. 2000. Left ventricular hypertrophy: pathogenesis, detection, and prognosis. *Circulation* 102:470-9
5. MacLellan WR, Schneider MD. 2000. Genetic dissection of cardiac growth control pathways. *Annu. Rev. Physiol* 62:289-319
6. Kannel WB, Gordon T, Offutt D. 1969. Left ventricular hypertrophy by electrocardiogram. Prevalence, incidence, and mortality in the Framingham study. *Ann. Intern. Med.* 71:89-105
7. Kaab S, Dixon J, Duc J, Ashen D, Nabauer M, Beuckelmann DJ, Steinbeck G, McKinnon D, Tomaselli GF. 1998. Molecular basis of transient outward potassium current downregulation in human heart failure: a decrease in Kv4.3 mRNA correlates with a reduction in current density. *Circulation* 98:1383-93
8. Levy D, Garrison RJ, Savage DD, Kannel WB, Castelli WP. 1990. Prognostic implications of echocardiographically determined left

- ventricular mass in the Framingham Heart Study. *N. Engl. J. Med.* 322:1561-6
9. Sadoshima J, Izumo S. 1993. Molecular characterization of angiotensin II--induced hypertrophy of cardiac myocytes and hyperplasia of cardiac fibroblasts. Critical role of the AT1 receptor subtype. *Circ. Res.* 73:413-23
 10. Zierhut W, Zimmer HG. 1989. Significance of myocardial alpha- and beta-adrenoceptors in catecholamine-induced cardiac hypertrophy. *Circ. Res.* 65:1417-25
 11. Iwaki K, Sukhatme VP, Shubeita HE, Chien KR. 1990. Alpha- and beta-adrenergic stimulation induces distinct patterns of immediate early gene expression in neonatal rat myocardial cells. fos/jun expression is associated with sarcomere assembly; Egr-1 induction is primarily an alpha 1-mediated response. *J. Biol. Chem.* 265:13809-17
 12. Dorr M, Wolff B, Robinson DM, John U, Ludemann J, Meng W, Felix SB, Volzke H. 2005. The association of thyroid function with cardiac mass and left ventricular hypertrophy. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 90:673-7
 13. Ito H, Hiroe M, Hirata Y, Tsujino M, Adachi S, Shichiri M, Koike A, Nogami A, Marumo F. 1993. Insulin-like growth factor-I induces hypertrophy with enhanced expression of muscle specific genes in cultured rat cardiomyocytes. *Circulation* 87:1715-21
 14. Force T, Michael A, Kilter H, Haq S. 2002. Stretch-activated pathways and left ventricular remodeling. *J. Card Fail.* 8:S351-S358

15. Sadoshima J, Izumo S. 1997. The cellular and molecular response of cardiac myocytes to mechanical stress. *Annu. Rev. Physiol* 59:551-71
16. Plowman GD, Sudarsanam S, Bingham J, Whyte D, Hunter T. 1999. The protein kinases of *Caenorhabditis elegans*: a model for signal transduction in multicellular organisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96:13603-10
17. Simon MI, Strathmann MP, Gautam N. 1991. Diversity of G proteins in signal transduction. *Science* 252:802-8
18. Crespo P, Xu N, Simonds WF, Gutkind JS. 1994. Ras-dependent activation of MAP kinase pathway mediated by G-protein beta gamma subunits. *Nature* 369:418-20
19. Pumiglia KM, LeVine H, Haske T, Habib T, Jove R, Decker SJ. 1995. A direct interaction between G-protein beta gamma subunits and the Raf-1 protein kinase. *J. Biol. Chem.* 270:14251-4
20. Naga Prasad SV, Esposito G, Mao L, Koch WJ, Rockman HA. 2000. Gbetagamma-dependent phosphoinositide 3-kinase activation in hearts with in vivo pressure overload hypertrophy. *J. Biol. Chem.* 275:4693-8
21. Koch WJ, Lefkowitz RJ, Rockman HA. 2000. Functional consequences of altering myocardial adrenergic receptor signaling. *Annu. Rev. Physiol* 62:237-60
22. Molkenin JD, Dorn II GW. 2001. Cytoplasmic signaling pathways that regulate cardiac hypertrophy. *Annu. Rev. Physiol* 63:391-426

23. Frey N, Olson EN. 2003. Cardiac hypertrophy: the good, the bad, and the ugly. *Annu. Rev. Physiol* 65:45-79
24. Sugden PH. 1999. Signaling in myocardial hypertrophy: life after calcineurin? *Circ. Res.* 84:633-46
25. Yamazaki T, Komuro I, Kudoh S, Zou Y, Shiojima I, Mizuno T, Takano H, Hiroi Y, Ueki K, Tobe K, . 1995. Mechanical stress activates protein kinase cascade of phosphorylation in neonatal rat cardiac myocytes. *J. Clin. Invest* 96:438-46
26. Garrington TP, Johnson GL. 1999. Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Curr. Opin. Cell Biol.* 11:211-8
27. Hefti MA, Harder BA, Eppenberger HM, Schaub MC. 1997. Signaling pathways in cardiac myocyte hypertrophy. *J. Mol. Cell Cardiol.* 29:2873-92
28. Gu X, Bishop SP. 1994. Increased protein kinase C and isozyme redistribution in pressure-overload cardiac hypertrophy in the rat. *Circ. Res.* 75:926-31
29. Disatnik MH, Jones SN, Mochly-Rosen D. 1995. Stimulus-dependent subcellular localization of activated protein kinase C; a study with acidic fibroblast growth factor and transforming growth factor-beta 1 in cardiac myocytes. *J. Mol. Cell Cardiol.* 27:2473-81
30. Fuller SJ, Gillespie-Brown J, Sugden PH. 1998. Oncogenic src, raf, and ras stimulate a hypertrophic pattern of gene expression and increase cell size in neonatal rat ventricular myocytes. *J. Biol. Chem.* 273:18146-52

31. Shioi T, Kang PM, Douglas PS, Hampe J, Yballe CM, Lawitts J, Cantley LC, Izumo S. 2000. The conserved phosphoinositide 3-kinase pathway determines heart size in mice. *EMBO J.* 19:2537-48
32. Frey N, McKinsey TA, Olson EN. 2000. Decoding calcium signals involved in cardiac growth and function. *Nat. Med.* 6:1221-7
33. McKinsey TA, Olson EN. 1999. Cardiac hypertrophy: sorting out the circuitry. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 9:267-74
34. Passier R, Zeng H, Frey N, Naya FJ, Nicol RL, McKinsey TA, Overbeek P, Richardson JA, Grant SR, Olson EN. 2000. CaM kinase signaling induces cardiac hypertrophy and activates the MEF2 transcription factor in vivo. *J. Clin. Invest* 105:1395-406
35. Klee CB, Crouch TH, Krinks MH. 1979. Calcineurin: a calcium- and calmodulin-binding protein of the nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 76:6270-3
36. Klee CB, Ren H, Wang X. 1998. Regulation of the calmodulin-stimulated protein phosphatase, calcineurin. *J. Biol. Chem.* 273:13367-70
37. Rusnak F, Mertz P. 2000. Calcineurin: form and function. *Physiol Rev.* 80:1483-521
38. Kissinger CR, Parge HE, Knighton DR, Lewis CT, Pelletier LA, Tempczyk A, Kalish VJ, Tucker KD, Showalter RE, Moomaw EW, . 1995. Crystal structures of human calcineurin and the human FKBP12-FK506-calcineurin complex. *Nature* 378:641-4

39. Wang X, Culotta VC, Klee CB. 1996. Superoxide dismutase protects calcineurin from inactivation. *Nature* 383:434-7
40. Aitken A, Klee CB, Cohen P. 1984. The structure of the B subunit of calcineurin. *Eur. J. Biochem.* 139:663-71
41. Kennedy MT, Brockman H, Rusnak F. 1996. Contributions of myristoylation to calcineurin structure/function. *J. Biol. Chem.* 271:26517-21
42. Crivici A, Ikura M. 1995. Molecular and structural basis of target recognition by calmodulin. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 24:85-116
43. Kincaid R. 1993. Calmodulin-dependent protein phosphatases from microorganisms to man. A study in structural conservatism and biological diversity. *Adv. Second Messenger Phosphoprotein Res.* 27:1-23
44. Crabtree GR, Olson EN. 2002. NFAT signaling: choreographing the social lives of cells. *Cell* 109 Suppl:S67-S79
45. Hogan PG, Chen L, Nardone J, Rao A. 2003. Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT. *Genes Dev.* 17:2205-32
46. Okamura H, Aramburu J, Garcia-Rodriguez C, Viola JP, Raghavan A, Tahiliani M, Zhang X, Qin J, Hogan PG, Rao A. 2000. Concerted dephosphorylation of the transcription factor NFAT1 induces a conformational switch that regulates transcriptional activity. *Mol. Cell* 6:539-50

47. Crabtree GR. 2001. Calcium, calcineurin, and the control of transcription. *J. Biol. Chem.* 276:2313-6
48. Beals CR, Sheridan CM, Turck CW, Gardner P, Crabtree GR. 1997. Nuclear export of NF-ATc enhanced by glycogen synthase kinase-3. *Science* 275:1930-4
49. Chow CW, Rincon M, Cavanagh J, Dickens M, Davis RJ. 1997. Nuclear accumulation of NFAT4 opposed by the JNK signal transduction pathway. *Science* 278:1638-41
50. Gomez dA, Martinez-Martinez S, Maldonado JL, Ortega-Perez I, Redondo JM. 2000. A role for the p38 MAP kinase pathway in the nuclear shuttling of NFATp. *J. Biol. Chem.* 275:13872-8
51. Zhu J, Shibasaki F, Price R, Guillemot JC, Yano T, Dotsch V, Wagner G, Ferrara P, McKeon F. 1998. Intramolecular masking of nuclear import signal on NF-AT4 by casein kinase I and MEKK1. *Cell* 93:851-61
52. Sheridan CM, Heist EK, Beals CR, Crabtree GR, Gardner P. 2002. Protein kinase A negatively modulates the nuclear accumulation of NF-ATc1 by priming for subsequent phosphorylation by glycogen synthase kinase-3. *J. Biol. Chem.* 277:48664-76
53. Zhu J, McKeon F. 1999. NF-AT activation requires suppression of Crm1-dependent export by calcineurin. *Nature* 398:256-60
54. Wu H, Rothermel B, Kanatous S, Rosenberg P, Naya FJ, Shelton JM, Hutcheson KA, DiMaio JM, Olson EN, Bassel-Duby R, Williams RS. 2001. Activation of MEF2 by muscle activity is mediated through a calcineurin-dependent pathway. *EMBO J.* 20:6414-23

55. Zhang CL, McKinsey TA, Chang S, Antos CL, Hill JA, Olson EN. 2002. Class II histone deacetylases act as signal-responsive repressors of cardiac hypertrophy. *Cell* 110:479-88
56. Zhang T, Johnson EN, Gu Y, Morissette MR, Sah VP, Gigena MS, Belke DD, Dillmann WH, Rogers TB, Schulman H, Ross J, Jr., Brown JH. 2002. The cardiac-specific nuclear delta(B) isoform of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II induces hypertrophy and dilated cardiomyopathy associated with increased protein phosphatase 2A activity. *J. Biol. Chem.* 277:1261-7
57. Molkentin JD, Lu JR, Antos CL, Markham B, Richardson J, Robbins J, Grant SR, Olson EN. 1998. A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy. *Cell* 93:215-28
58. Hasegawa K, Lee SJ, Jobe SM, Markham BE, Kitsis RN. 1997. cis-Acting sequences that mediate induction of beta-myosin heavy chain gene expression during left ventricular hypertrophy due to aortic constriction. *Circulation* 96:3943-53
59. Lim HW, De Windt LJ, Mante J, Kimball TR, Witt SA, Sussman MA, Molkentin JD. 2000. Reversal of cardiac hypertrophy in transgenic disease models by calcineurin inhibition. *J. Mol. Cell Cardiol.* 32:697-709
60. Liu J, Farmer JD, Jr., Lane WS, Friedman J, Weissman I, Schreiber SL. 1991. Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell* 66:807-15
61. Wilkins BJ, Molkentin JD. 2004. Calcium-calcineurin signaling in the regulation of cardiac hypertrophy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 322:1178-91

62. Matthes J, Jager A, Handrock R, Groner F, Mehlhorn U, Schwinger RH, Varadi G, Schwartz A, Herzig S. 2004. Ca²⁺-dependent modulation of single human cardiac L-type calcium channels by the calcineurin inhibitor cyclosporine. *J. Mol. Cell Cardiol.* 36:241-55
63. Park KS, Kim TK, Kim DH. 1999. Cyclosporin A treatment alters characteristics of Ca²⁺-release channel in cardiac sarcoplasmic reticulum. *Am. J. Physiol* 276:H865-H872
64. Radermacher J, Meiners M, Bramlage C, Kliem V, Behrend M, Schlitt HJ, Pichlmayr R, Koch KM, Brunkhorst R. 1998. Pronounced renal vasoconstriction and systemic hypertension in renal transplant patients treated with cyclosporin A versus FK 506. *Transpl. Int.* 11:3-10
65. Kashishian A, Howard M, Loh C, Gallatin WM, Hoekstra MF, Lai Y. 1998. AKAP79 inhibits calcineurin through a site distinct from the immunophilin-binding region. *J. Biol. Chem.* 273:27412-9
66. Lai MM, Burnett PE, Wolosker H, Blackshaw S, Snyder SH. 1998. Cain, a novel physiologic protein inhibitor of calcineurin. *J. Biol. Chem.* 273:18325-31
67. Lin X, Sikkink RA, Rusnak F, Barber DL. 1999. Inhibition of calcineurin phosphatase activity by a calcineurin B homologous protein. *J. Biol. Chem.* 274:36125-31
68. Rothermel B, Vega RB, Yang J, Wu H, Bassel-Duby R, Williams RS. 2000. A protein encoded within the Down syndrome critical region is enriched in striated muscles and inhibits calcineurin signaling. *J. Biol. Chem.* 275:8719-25

69. Vega RB, Yang J, Rothermel BA, Bassel-Duby R, Williams RS. 2002. Multiple domains of MCIP1 contribute to inhibition of calcineurin activity. *J. Biol. Chem.* 277:30401-7
70. Rothermel BA, McKinsey TA, Vega RB, Nicol RL, Mammen P, Yang J, Antos CL, Shelton JM, Bassel-Duby R, Olson EN, Williams RS. 2001. Myocyte-enriched calcineurin-interacting protein, MCIP1, inhibits cardiac hypertrophy in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98:3328-33
71. Aramburu J, Heitman J, Crabtree GR. 2004. Calcineurin: a central controller of signalling in eukaryotes. *EMBO Rep.* 5:343-8
72. De Windt LJ, Lim HW, Bueno OF, Liang Q, Delling U, Braz JC, Glascock BJ, Kimball TF, del Monte F, Hajjar RJ, Molkentin JD. 2001. Targeted inhibition of calcineurin attenuates cardiac hypertrophy in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98:3322-7
73. Taigen T, De Windt LJ, Lim HW, Molkentin JD. 2000. Targeted inhibition of calcineurin prevents agonist-induced cardiomyocyte hypertrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97:1196-201
74. Antos CL, McKinsey TA, Frey N, Kutschke W, McAnally J, Shelton JM, Richardson JA, Hill JA, Olson EN. 2002. Activated glycogen synthase-3 beta suppresses cardiac hypertrophy in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 99:907-12
75. Haq S, Choukroun G, Kang ZB, Ranu H, Matsui T, Rosenzweig A, Molkentin JD, Alessandrini A, Woodgett J, Hajjar R, Michael A, Force T. 2000. Glycogen synthase kinase-3beta is a negative regulator of cardiomyocyte hypertrophy. *J. Cell Biol.* 151:117-30

76. Oakley D. 2001. General cardiology: The athlete's heart. *Heart* 86:722-6
77. Bueno OF, Wilkins BJ, Tymitz KM, Glascock BJ, Kimball TF, Lorenz JN, Molckentin JD. 2002. Impaired cardiac hypertrophic response in Calcineurin Abeta -deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 99:4586-91
78. Ranger AM, Grusby MJ, Hodge MR, Gravalles EM, de la Brousse FC, Hoey T, Mickanin C, Baldwin HS, Glimcher LH. 1998. The transcription factor NF-ATc is essential for cardiac valve formation. *Nature* 392:186-90
79. Graef IA, Chen F, Chen L, Kuo A, Crabtree GR. 2001. Signals transduced by Ca(2+)/calcineurin and NFATc3/c4 pattern the developing vasculature. *Cell* 105:863-75
80. Timmerman LA, Clipstone NA, Ho SN, Northrop JP, Crabtree GR. 1996. Rapid shuttling of NF-AT in discrimination of Ca²⁺ signals and immunosuppression. *Nature* 383:837-40
81. Ritter O, Hack S, Schuh K, Rothlein N, Perrot A, Osterziel KJ, Schulte HD, Neyses L. 2002. Calcineurin in human heart hypertrophy. *Circulation* 105:2265-9
82. Simpson P, Savion S. 1982. Differentiation of rat myocytes in single cell cultures with and without proliferating nonmyocardial cells. Cross-striations, ultrastructure, and chronotropic response to isoproterenol. *Circ. Res.* 50:101-16
83. Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-54

84. Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-5
85. Lim HW, Molkentin JD. 1999. Calcineurin and human heart failure. *Nat. Med.* 5:246-7
86. Tsao L, Neville C, Musaro A, McCullagh KJ, Rosenthal N. 2000. Revisiting calcineurin and human heart failure. *Nat. Med.* 6:2-3
87. Haq S, Choukroun G, Lim H, Tymitz KM, del Monte F, Gwathmey J, Grazette L, Michael A, Hajjar R, Force T, Molkentin JD. 2001. Differential activation of signal transduction pathways in human hearts with hypertrophy versus advanced heart failure. *Circulation* 103:670-7
88. Tallant EA, Brumley LM, Wallace RW. 1988. Activation of a calmodulin-dependent phosphatase by a Ca²⁺-dependent protease. *Biochemistry* 27:2205-11
89. Wang KK, Roufogalis BD, Villalobo A. 1989. Characterization of the fragmented forms of calcineurin produced by calpain I. *Biochem. Cell Biol.* 67:703-11
90. Lakshmikuttyamma A, Selvakumar P, Kakkar R, Kanthan R, Wang R, Sharma RK. 2003. Activation of calcineurin expression in ischemia-reperfused rat heart and in human ischemic myocardium. *J. Cell Biochem.* 90:987-97
91. Wu HY, Tomizawa K, Oda Y, Wei FY, Lu YF, Matsushita M, Li ST, Moriwaki A, Matsui H. 2004. Critical role of calpain-mediated cleavage of calcineurin in excitotoxic neurodegeneration. *J. Biol. Chem.* 279:4929-40

92. Saido TC, Sorimachi H, Suzuki K. 1994. Calpain: new perspectives in molecular diversity and physiological-pathological involvement. *FASEB J.* 8:814-22
93. Kim MJ, Jo DG, Hong GS, Kim BJ, Lai M, Cho DH, Kim KW, Bandyopadhyay A, Hong YM, Kim dH, Cho C, Liu JO, Snyder SH, Jung YK. 2002. Calpain-dependent cleavage of cain/cabin1 activates calcineurin to mediate calcium-triggered cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 99:9870-5
94. Kakkar R, Wang X, Radhi JM, Rajala RV, Wang R, Sharma RK. 2001. Decreased expression of high-molecular-weight calmodulin-binding protein and its correlation with apoptosis in ischemia-reperfused rat heart. *Cell Calcium* 29:59-71
95. Frey N, Richardson JA, Olson EN. 2000. Calsarcins, a novel family of sarcomeric calcineurin-binding proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97:14632-7
96. Zou Y, Yao A, Zhu W, Kudoh S, Hiroi Y, Shimoyama M, Uozumi H, Kohmoto O, Takahashi T, Shibasaki F, Nagai R, Yazaki Y, Komuro I. 2001. Isoproterenol activates extracellular signal-regulated protein kinases in cardiomyocytes through calcineurin. *Circulation* 104:102-8
97. Loh C, Shaw KT, Carew J, Viola JP, Luo C, Perrino BA, Rao A. 1996. Calcineurin binds the transcription factor NFAT1 and reversibly regulates its activity. *J. Biol. Chem.* 271:10884-91
98. Shibasaki F, Price ER, Milan D, McKeon F. 1996. Role of kinases and the phosphatase calcineurin in the nuclear shuttling of transcription factor NF-AT4. *Nature* 382:370-3

99. Ohno M, Fornerod M, Mattaj JW. 1998. Nucleocytoplasmic transport: the last 200 nanometers. *Cell* 92:327-36
100. Bueno OF, van Rooij E, Molkenin JD, Doevendans PA, De Windt LJ. 2002. Calcineurin and hypertrophic heart disease: novel insights and remaining questions. *Cardiovasc. Res.* 53:806-21
101. Eto Y, Yonekura K, Sonoda M, Arai N, Sata M, Sugiura S, Takenaka K, Gualberto A, Hixon ML, Wagner MW, Aoyagi T. 2000. Calcineurin is activated in rat hearts with physiological left ventricular hypertrophy induced by voluntary exercise training. *Circulation* 101:2134-7
102. Lim HW, De Windt LJ, Steinberg L, Taigen T, Witt SA, Kimball TR, Molkenin JD. 2000. Calcineurin expression, activation, and function in cardiac pressure-overload hypertrophy. *Circulation* 101:2431-7
103. Zhu W, Zou Y, Shiojima I, Kudoh S, Aikawa R, Hayashi D, Mizukami M, Toko H, Shibasaki F, Yazaki Y, Nagai R, Komuro I. 2000. Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II and calcineurin play critical roles in endothelin-1-induced cardiomyocyte hypertrophy. *J. Biol. Chem.* 275:15239-45
104. Aramburu J, Yaffe MB, Lopez-Rodriguez C, Cantley LC, Hogan PG, Rao A. 1999. Affinity-driven peptide selection of an NFAT inhibitor more selective than cyclosporin A. *Science* 285:2129-33

6.0 Appendix

6.1 Verwendete Chemikalien und Materialien

Der Reinheitsgrad der verwendeten Chemikalien betrug mindestens „pro analysi“. Alle nicht aufgeführten Chemikalien stammen von der Firma Merk.

Agarose	Sigma-Aldrich
Ampicillin	GibcoBRL
Angiotensin II	Sigma-Aldrich
Antikörper	
Anti-CnA α Polyclonal Goat-Anti-Mouse	SressGen
Anti-CnA α Polyclonal Rabbit-Anti-Mouse	Santa Cruz
Anti-Calpain 1 Goat Polyclonal IgG	Santa Cruz
Cy TM -conjugated Goat-Anti-Mouse-IgG	Jackson Immuno Research
Troponin I-C goat, Polyclonal	Santa Cruz
Mouse-Anti-GAPDH Monoklonal Ak	Chemicon
Anti-Histon H1 Mouse Monoclonal IgG	Santa Cruz
Sheep-Anti-Mouse Peroxidase linked Fab ₂	Amersham-Bioscience
BrdU	Sigma-Aldrich
Calcineurin	Sigma-Aldrich
Calpain-Inhibitor III	Sigma-Aldrich M 6690
μ -Calpain	Sigma-Aldrich C 6108
Cell Scraper	Sarstedt
Deckgläschen („slides“)	DK60, 24x60mm
DNA 10x Ladepuffer	Fermentas
DAPI	Sigma-Aldrich
DNase	Sigma-Aldrich
ECL-Kit	Amersham RPN 2106
Essigsäure	Roth
Ethanol	J. T. Baker
Ethidiumbromid	Serva

FCS	Seromed
Gel-Extraktions-Kits	Quiagen, QIAquick®
GenRuler™ DNA Ladder Mix	Fermentas
Goat-Serum	Sigma-Aldrich
Heparin	Roche, Liquemin®
HEPES	Serva
Isopropanol	Merk
Kanamycin	Sigma-Aldrich
Kulturschalen (1) 6-Well	Brand, Nucleon Delta SI
Kulturschalen (2) Chamber-Slides	Brand, Lab Tek II
Kulturschalen (3) 10cm	greiner bio-one, Cellstar®
Laemmli-Probenpuffer	BioRad
Lipofectamine™ Reagenz	Invitrogen
Luciferase-Assay-System	Promega
Luminometer-Röhrchen	Sarstedt
Magermilchpulver	Freema
MassRuler™ 1kb DNA Ladder	Fermentas
Maxi-Präp-Kit, NucleoBond® PC500	Machery-Nagel
Mini-Präp-Kit, NucleoSpin® Plasmid	Machery-Nagel
MEM	Amimed
Mouse Serum	Serva
Mowiol 40-88	Hoechst
OptiMEM	Gibco
Paraformaldehyd	Serva
PEG 4000	Fermentas
Penicillin	Sigma-Aldrich
Pepton	Sigma-Aldrich
Plasmide	
pcDNA-DEST53	Invitrogen
pCMV-SPORT6	Invitrogen
Plus™ Reagenz	Invitrogen
Puffer für Restriktionsverdau/Ligation	Fermentas

Restriktionsenzyme

Xba I	Fermentas
Pst I	Fermentas
SDS	Sigma-Aldrich
Streptomycin	GibcoBRL
Trypsin	Difco
Triton X-100	Sigma-Aldrich
Tween 20	Sigma-Aldrich
T4 Ligase	Fermentas
T4 Polymerase	Fermentas
Vitamin B12	Serva
Whatman 3MM Papier	Whatman
Yeast Extract	Difco

6.2 Geräteverzeichnis

Autoklav	Fedegari (Tecnomara) Nr. E, Typ FV
Elektrophoresekammern	Hoefer Scientific Instruments (versch. Größen)
Gelelektrophoresekammer	BioRad
Membran-Vakuumpumpe	Vacuu-Brand
Inkubator für Bakterien	Heraeus, Function line T20
Inkubator für Zellkultur	Forma Scientific, Steri-Cult 200
Kamera (Spiegelreflex)	Pentax MZ-M
Lichtmikroskop, invers/fluoreszenz	Zeiss axiovert 135
Luminometer	berthold
Pipetten	Eppendorf
Polaroidkamera	BioRad
Röntgenkassette	Amersham
Spannungsgerät	Hoefer, SX250 Power Supply
Spektrophotometer	Shimadzu UV-160
Sterilbank	Steril S. p. A., Antares 72

Sterilisator	Braun Biotech
Thermoschüttler (Bakterienschüttler)	Braun Biotech, Certomat® H
UV-Tisch	BioRad, Mini Transilluminator
Western-Blot Gelkammer	BioRad
Zählkammer	Neubauer, nach Fuchs-Rosenthal
Zentrifuge (1)	Beckman CL-GPKR
Zentrifuge (2)	Kendro, Biofuge pico
Zentrifuge (3)	Sigma, 2K15

6.3 Verwendete Lösungen und Puffer

Soweit nicht anders aufgeführt, wurden die Lösungen und Puffer mit destilliertem Wasser angesetzt. Prozentuale Angaben von Feststoffen sind Gewichtsprozent, prozentuale Angaben von Lösungen sind Volumenprozent.

Kardiomyozytenpräparation

CBFHH (calcium and bicarbonate-free Hanks with HEPES), pH 7,2

HEPES, pH 7,4	20,06mM
NaCl	137mM
KCl	5,36mM
MgSO ₄ x 7H ₂ O	0,81mM
Dextrose (D-Glucose)	5,55mM
KH ₂ PO ₄	0,44mM
Na ₂ HPO ₄ x 7H ₂ O	0,34mM
Penicillin G	50U/ml CBFHH
Streptomycin	50µg/ml CBFHH

PBS (phosphat buffered saline), pH 7,4

NaCl	137mM
KCl	2,7mM
Na ₂ HPO ₄ *7H ₂ O	4,3mM
KH ₂ PO ₄	1,4mM

Verdau-Lösung

CBFHH	s.o.
Trypsin	1,5mg/ml CBFHH
DNase (2ng/ml 0,15M NaCl)	1µl/ml CBFHH

Zellkulturmediumzusätze in MEM/5 (Minimum Essential Medium), pH 7,1

L-Glutamine	291mg
Na-Bicarbonat	350mg
FCS	5%
Penicillin G	50U/ml MEM
Streptomycin	50µg/ml MEM
Vitamin B ₁₂	2µg/ml MEM
BrdU (Bromodeoxyuridine)	3,074mg/ml MEM

Arbeiten mit DNA

TAE-Puffer

Tris-acetat	0,04M
EDTA	0,001M

LB-Medium

Pepton	10g/l
Hefe-Extrakt (Yeast E.)	5g/l
NaCl	10g/l

LB-Selektionsmedium

LB

Ampicillin bzw. Kanamycin 100µg/ml LB

Transfectionsmedium (OptiMEM-MEM)

OptiMEM 80%

MEM 20%

Puffer für Zellkernextraktion

Puffer A

HEPES, pH 7,4 10mM

KCl 10mM

EDTA 0,1mM

EGTA 0,1mM

DTT 1mM

PMSF 1mM

Puffer B

HEPES, pH 7,4 20mM

NaCl 0,4M

EDTA 1mM

EGTA 1mM

DTT 1mM

PMSF 1mM

Western-Blot

Trenngel 10% (10 ml):

1,5 M Tris, pH 8,8	2,5 ml
30% Acrylamid/ Bismethylenacrylamid	3,3 ml
10% SDS	0,1 ml
ddH ₂ O	4,0 ml
10% Ammoniumpersulfat (APS)	80 µl
TEMED	5,0 µl

Sammelgel 5% (10 ml):

1,0 M Tris, pH 6,8	1,25 ml
30% Acrylamid/ Bismethylenacrylamid	1,7 ml
10% SDS	0,1 ml
ddH ₂ O	6,8 ml
10% APS	0,1 ml
TEMED	5,0 µl

Laufpuffer, pH 8,3 (1x)

Tris-Base	3 g/l
Glycin	6 g/l
SDS	1 g/l

Transferpuffer, pH 8,3

Tris-Base	0,48 M
Glycin	0,39 M
Methanol	20%

Blockierlösung

Trockenmilchpulver	5%
Tween 20	0,5%
in PBS Puffer	

Immunopräzipitation

Präzipitations Assay Puffer (in 1% PBS)

IGEPAL CA-630	1%
Natrium Desoxycholat	0,5%
EDTA-freier Protease Inhibitor Mix	

6.4 Abkürzungen

Die Abkürzungen der SI-Einheit werden als bekannt vorausgesetzt. Hier nicht aufgeführte Abkürzungen sind im Text erläutert.

Abb.	Abbildung
AC	Adenylatcyclase
AID	Autoinhibitorische Domäne
Ak	Antikörper
Ang II	Angiotensin II
AS	Aminosäure
BSA	Rinderserumalbumin
bp	Basenpaare
Ca ²⁺	Calcium
CaMK	Calmodulin-Kinase
CBFHH	calcium- and bicarbonate-free Hanks mit Hepes
CnA	Calcineurin A
CnB	Calcineurin B
ΔCnA	dauerhaft aktive Form des Calcineurin A (48 kDa)
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Da	Dalton
DAPI	4,6-Diamidino-2-Phenylindol
DNA	(desoxyribonucleic acid) Desoxyribonucleinsäure
EF	ejection fraction

FCS	fetal calf serum
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase
GFP	green fluorescent protein
HDAC	Histon-Deacetylase
Ig	Immunglobulin
Il 2	Interleukin 2
JAK	Janus-Kinase
ERK	extracellular-signal-regulated kinase
kb	kilo Basen
KHK	Koronare Herzerkrankung
MAPK	mitogen-aktiviert protein kinase
MCS	multiple cloning site
MEM	modified eagle medium
NES	Nukleäre Export-Sequenz
NFAT	nuclear factor and aktivator of T-Cells
O ₂	Sauerstoff
OD	optische Dichte
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PBS	(phosphate-buffered saline), siehe Puffer
rpm	(runs per minute) Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
STAT	signal transducer and activator of transcription
U	(units) Einheiten
V	Volt

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. med. Oliver Ritter für die Überlassung des Themas, die Betreuung der Doktorarbeit und die Unterstützung im Verlauf der gesamten Promotion.

Für seine geduldige Bereitschaft, mir bei kleinen und großen Problemen unter die Arme zu greifen, danke ich besonders Herrn PD Dr. Kai Schuh. Seine Unterstützung mit vielen Anregungen und Hinweisen für die Arbeit im Labor war mir eine große Hilfe.

Weiterhin gilt mein herzlichster Dank meinen Eltern, die mir das Studium ermöglichten und mir immer mit Rat und Tat zur Seite standen.

Lebenslauf

Zur Person:

Name: **Becher, Jan**

Geburtsdatum: 29.03.1980

Geburtsort: Berlin-Mitte

Adresse: Nopitschstr. 10
97074 Würzburg
Deutschland

E-Mail: jan_becher@web.de

Nationalität: deutsch

Familienstand: ledig

Aus- und Weiterbildung:

1990 – 1998	Gymnasium „Professor Carl Fiedler“, Suhl Abschluss: Erwerb der allgemeinen Hochschulreife
08/98 – 08/1999	Zivildienst (Krankenpflegetätigkeit) in der Klinik für Innere Medizin im Zentralklinikum Suhl
09/1999 – 05/2006	Studium der Medizin an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg
09/2001	Ärztlich Vorprüfung,
08/2002	1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
04/2005	2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
April 2005 – März 2006	Praktisches Jahr (Innere Medizin, Chirurgie, Radiologie)
05/2006	3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Seit 07/2006	Assistenzarzt in der Medizinischen Klinik und Poliklinik I der Universität Würzburg

Würzburg, 16.02.07

Jan Becher