



Der Einfluss von FKBP52 auf die Funktion von TRPC3 Kanälen im Herzen

Role of FKBP52 in the regulation of TRPC3 channels in the heart

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

vorgelegt von

Sandra Bandleon

aus Gernsbach

Würzburg, 2020

Eingereicht am:

Bürostempel

Mitglieder des Promotionskomitees:

Vorsitzender: Prof. Dr. Manfred Gessler

1. Betreuer: PD Dr. Petra Eder-Negrin

2. Betreuer: Prof. Dr. Kai Schuh

3. Betreuer: Dr. Daniel Kraus

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunden ausgehändigt am:

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Menschen bedanken, die mich unterstützt und zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ein besonderer Dank gilt PD Dr. Petra Eder-Negrin für die Möglichkeit, diese Arbeit in ihrer Arbeitsgruppe durchzuführen. Des Weiteren danke ich ihr für die stets hilfreichen Ratschläge und konstruktiven Diskussionen.

Für die freundliche und unkomplizierte Übernahme der Betreuung danke ich herzlich Prof. Dr. Kai Schuh und Dr. Daniel Kraus. Des Weiteren danke ich Prof. Dr. Manfred Gessler für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Ein weiter Dank geht an meine Arbeitskollegen, die mich während der vergangenen Jahre begleitet und für eine angenehme Arbeitsatmosphäre gesorgt haben.

Ein großer Dank geht dabei an Alice Schaaf für die praktische Unterstützung während unserer gemeinsamen Zeit in der Arbeitsgruppe und für die mentale Unterstützung als sie nicht mehr Teil der Arbeitsgruppe war. Ein weiterer Dank geht an Antonella Cellini für den wissenschaftlichen Austausch und die Hilfsbereitschaft in allen Situationen. Des Weiteren danke ich Dr. Simone Pickel für die gute Zusammenarbeit, die vor allem die gemeinsamen Samstage im Labor angenehmer gemacht hat. Yiliam Cruz Garcia und Dorina Höfler danke ich, dass sie immer mal wieder eine Abwechslung in den Laboralltag gebracht haben. Anna-Karina Lamprecht und Katharina Marnet möchte ich für die experimentelle Unterstützung im Labor danken.

Michelle Gulentz und Annette Berber aus der Translationalen Forschung danke ich für die Isolation der adulten Kardiomyozyten und die damit verbundene Bereitstellung der Zellen. Ein weiterer Dank geht an PhD Oleksandra Tapiako von der Medizinischen Universität Graz für die Durchführung der Patch Clamp Experimente.

Des Weiteren danke ich allen weiteren Kollegen am DZHI für die schöne Zeit, das angenehme Arbeitsklima und für die Unterstützung und Hilfe bei den unterschiedlichsten Problemen. Außerdem danke ich allen Kollegen im ZIM für die schöne Zeit und nette Atmosphäre bevor wir mit unserem Labor umgezogen sind. Allen voran geht der Dank dabei an Bianca Rudolohi, Dr. Isabel Weigand und Nils Kraus.

Zum Schluss danke ich meiner Familie für die jahrelange Unterstützung und Hilfe in jeder Situation.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	VI
Abkürzungsverzeichnis	VII
Zusammenfassung	X
Abstract	XII
1. EINLEITUNG	1
1.1. Kardiovaskuläre Erkrankungen.....	1
1.1.1. Linksventrikuläre Hypertrophie des Herzens.....	2
1.2. Rolle von Ca ²⁺ im Herzen.....	4
1.3. Transient Receptor Potential (TRP)-Kanäle.....	5
1.3.1. Die TRPC-Familie.....	7
1.3.1.1. Aktivierung und Signaling der TRPC-Kanäle im Herzen.....	7
1.3.1.2. TRPC-Kanäle in der kardialen Hypertrophie.....	9
1.3.1.3. Struktur und Interaktionspartner von TRPC3.....	10
1.3.1.4. Neue Interaktionspartner von TRPC3 im Herzen.....	12
1.4. FKBP52.....	14
1.4.1. TRPCs und FKBP5.....	18
1.5. Ziel der Arbeit.....	18
2. MATERIALIEN	20
2.1. Chemikalien und Reagenzien.....	20
2.2. Geräte.....	22
2.3. Enzyme.....	24
2.4. Größenstandards.....	25
2.5. Kits.....	25
2.6. Medien.....	25
2.7. Puffer und Lösungen.....	26
2.8. Verbrauchsmaterialien.....	29
2.9. Primer.....	30
2.10. Plasmide.....	31
2.11. Adenoviren.....	32
2.12. Zelllinien.....	32
2.13. Versuchstiere.....	32
2.14. Bakterien.....	32

2.15.	siRNA	33
2.16.	Antikörper	33
2.17.	Software und Datenbanken	34
3.	METHODEN	36
3.1.	Molekularbiologische Methoden	36
3.1.1.	Polymerase-Kettenreaktion.....	36
3.1.2.	Agarosegel.....	37
3.1.3.	Restriktionsverdau	37
3.1.4.	Ligation	38
3.1.5.	Transformation.....	38
3.1.6.	Übernachtkultur	38
3.1.7.	Mutagenese	39
3.1.8.	RNA-Isolation.....	39
3.1.9.	cDNA-Synthese	39
3.1.10.	Quantitative Echtzeit PCR.....	39
3.2.	Herstellung der Adenoviren	40
3.2.1.	Herstellung des Gateway® Entry Vektors	40
3.2.2.	LR Rekombination	41
3.2.3.	Pac I-Verdau.....	41
3.2.4.	Transduzieren der HEK 293A Zellen für die Virusproduktion	42
3.2.5.	Vermehrung des adenoviralen Stocks.....	43
3.2.6.	Virentiter	43
3.3.	Isolation primärer Kardiomyozyten	44
3.3.1.	Isolation neonataler Rattenkardiomyozyten.....	44
3.3.2.	Isolation adulter Rattenkardiomyozyten	46
3.4.	Zellkultur	46
3.4.1.	Kultivierung von HEK 293, HEK 293A und T3.9 Zellen	46
3.4.2.	Transfektion und Transduktion von HEK 293 Zellen	47
3.4.3.	Kultivierung von neonatalen Rattenkardiomyozyten.....	47
3.4.4.	Kultivierung von adulten Rattenkardiomyozyten.....	49
3.5.	Proteinbiochemische Methoden	49
3.5.1.	Gesamtproteinlysate	49
3.5.2.	Zellfraktionierung	50
3.5.3.	Proteinbestimmung mit Bradford-Assay	50
3.5.4.	Proteinbestimmung mit BCA-Assay	50
3.5.5.	Immunpräzipitation.....	51

3.5.6.	Eindimensionale SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot	51
3.5.7.	Membran strippen	53
3.5.8.	Immunzytochemie	53
3.6.	Ca ²⁺ -Messungen	53
3.7.	Elektrophysiologie - Whole Cell Voltage Patch-Clamp Analysen	54
3.8.	Statistik	55
4.	ERGEBNISSE	56
4.1.	FKBP52 als Interaktionspartner von TRPC3.....	56
4.2.	Proteinstrukturen von FKBP52, welche die Interaktion mit TRPC3 vermitteln.....	57
4.3.	Hypertrophe Effekte	60
4.3.1.	FKBP52 beeinflusst TRPC3-abhängige hypertrophe Effekte in neonatalen Rattenkardiomyozyten.....	60
4.3.2.	Verkürzte FKBP52 Mutanten fördern Hypertrophie in Kardiomyozyten	65
4.4.	Calcineurin/NFAT-Signaling in Kardiomyozyten	70
4.4.1.	FKBP52-Mutanten beeinflussen den Calcineurin/NFAT-Signalweg in Kardiomyozyten.....	70
4.5.	Funktionelle Interaktion zwischen FKBP52 und TRPC3	76
4.5.1.	FKBP52 beeinflusst TRPC3 induzierte Ca ²⁺ -Signale.....	76
4.5.2.	FKBP52 beeinflusst die TRPC3-Aktivität.....	79
4.6.	Calcineurin als Interaktionspartner von FKBP52 und TRPC3	80
5.	DISKUSSION	83
5.1.	FKBP52 als neuer Interaktionspartner von TRPC3.....	83
5.2.	FKBP52 schützt Kardiomyozyten vor pathologischer Hypertrophie	85
5.3.	Fazit und Ausblick	88
	Literaturverzeichnis.....	92
	Lebenslauf	98
	Eidesstattliche Erklärung	100

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Kardiovaskuläre Erkrankungen sind weltweit die häufigste Todesursache.....	1
Abbildung 2: Häufigste Todesursachen in Deutschland.....	1
Abbildung 3: Schema eines TRPC-Kanals und eines Tetramers aus verschiedenen TRPC-Untereinheiten.....	7
Abbildung 4: Aktivierung und Signaling der TRPC-Kanäle.....	8
Abbildung 5: Struktur eines einzelnen TRPC3-Kanals mit seinen unterschiedlichen Domänen	11
Abbildung 6: FKBP52 wurde mit Hilfe eines Yeast Two-Hybrid Screens als neuer Interaktionspartner von TRPC3 identifiziert.....	14
Abbildung 7: Die Bindung von FK506 (Tacrolimus) an FKBP52 inhibiert Calcineurin	15
Abbildung 8: Struktur von FKBP52 (Volllänge) und von FKBP52 (aa 135-459), der Klon der über den Yeast Two-Hybrid Screen gefunden wurde.....	16
Abbildung 9: Sequenzalignment von Maus FKBP52 (mFKBP52) und von FKBP52 cDNA des Yeast Two-Hybrid Screens	17
Abbildung 10: Schema zur Behandlung der ARCs	49
Abbildung 11: Bestätigung der Interaktion zwischen FKBP52 und TRPC3 <i>in vitro</i>	56
Abbildung 12: Bestätigung der Interaktion zwischen FKBP52 und TRPC3 <i>in vivo</i>	57
Abbildung 13: Klonierte FKBP52-Bruchstücke, die für weitere Versuche herangezogen wurden.....	58
Abbildung 14: Interaktion der FKBP52-Bruchstücke mit TRPC3.....	59
Abbildung 15: Interaktion von FKBP52 (aa 352-459) mit TRPC3.....	59
Abbildung 16: Downregulation von FKBP52 und Hemmung von TRPC3 mit Pyrazol 3	60
Abbildung 17: TRPC3-Inhibition vermindert die durch Downregulation von FKBP52-induzierte Hypertrophie	61
Abbildung 18: Downregulation von FKBP52 führt zu einer erhöhten hypertrophen Antwort in NRCs, die durch TRPC6 induziert wird	63
Abbildung 19: Die Stabilisation von Microtubuli ist durch die Downregulation von FKBP52 während hypertropher Stimulation unbeeinflusst.....	64
Abbildung 20: Verwendete FKBP52 Adenoviren im Vergleich	65
Abbildung 21: Überexpression von FKBP52 (aa 135-459) fördert die Hypertrophie in NRCs66	
Abbildung 22: Überexpression von FKBP52 (aa 135-459) fördert die Hypertrophie in ARCs68	
Abbildung 23: FKBP52 (aa 135-459) beeinflusst, im Gegensatz zu FK506, die durch Angiotensin II induzierte hypertrophe Antwort.....	69
Abbildung 24: Die Überexpression von verkürzten FKBP52 Mutanten beeinflusst die Calcineurin/NFAT-Aktivität.....	71

Abbildung 25: RCAN mRNA Levels nach Überexpression von FKBP52 (aa 135-459)	73
Abbildung 26: Überexpression von verkürzten FKBP52 Mutanten beeinflussen NFATc3 Proteinlevels im Nucleus.....	74
Abbildung 27: Die verkürzte FKBP52 Mutante beeinflusst die HDAC4 Expressionslevels nicht	75
Abbildung 28: Verkürzte FKBP52-Mutanten beeinflussen Ca ²⁺ -Signale in HEK 293 Zellen ...	76
Abbildung 29: Verkürzte FKBP52-Mutanten beeinflussen Ca ²⁺ -Signale in NRCs	77
Abbildung 30: TRPC3-abhängige Ca ²⁺ -Signale in HEK 293 Zellen sind von FKBP52 abhängig.....	78
Abbildung 31: Expression von FKBP52 (aa 280-352) verändert die Öffnungswahrscheinlichkeit von TRPC3-Ionenkanälen.....	79
Abbildung 32: HA-FKBP52 und TRPC3 interagiert mit Calcineurin.....	80
Abbildung 33: Bindung von TRPC3 an Calcineurin wird nicht durch FKBP52 (aa 135-459) beeinflusst	81
Abbildung 34: Bindung von TRPC3 an Homer1 und FKBP12 wird nicht durch verkürzte FKBP52 Mutanten beeinflusst.....	82
Abbildung 35: Schema der Bindung zwischen TRPC3 und FKBP52	89
Abbildung 36: Die Interaktion zwischen TRPC3 und FKBP52 beeinflusst das hypertrophe Wachstum, Ca ²⁺ -Signale und Ca ²⁺ -abhängige Signalwege	90

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: TRP-Kanäle und ihre Unterfamilien.....	5
Tabelle 2: Ergebnis des Yeast Two-Hybrid Screens.....	13
Tabelle 3: Primer für Polymerase-Kettenreaktion (engl. polymerase chain reaction, PCR) ...	30
Tabelle 4: Plasmide für die Transfektion der HEK 293 Zellen	31
Tabelle 5: Generierte Plasmide für die Herstellung von Adenoviren	32
Tabelle 6: Primärantikörper	33
Tabelle 7: Sekundärantikörper.....	34
Tabelle 8: Pipettierschema einer PCR-Reaktion.....	36
Tabelle 9: Temperaturprogramm einer PCR-Reaktion.....	36
Tabelle 10: Pipettierschema für den Restriktionsverdau	37
Tabelle 11: Pipettierschema für die Ligation	38
Tabelle 12: Zusammensetzung des qPCR Mastermix für ein Well.....	40
Tabelle 13: qPCR Inkubationsprogramm.....	40
Tabelle 14: Pipettierschema des Pac I-Verdau	42
Tabelle 15: Zellzahlen neonataler Rattenkardiomyozyten in verschiedenen Experimenten ..	45
Tabelle 16: Kultivierung der neonatalen Rattenkardiomyozyten	47
Tabelle 17: Zusammensetzung für 10 ml Trenngel bei verschiedenen Acrylamidkonzentrationen.....	52
Tabelle 18: Zusammensetzung für 3 ml Sammelgel mit 5 % Acrylamid.....	52

Abkürzungsverzeichnis

aa	amino acids (Aminosäuren)
Ang II	Angiotensin II
ANP	atriale natriuretische Peptid
APS	Ammoniumpersulfat
ARC	adult rat cardiomyocytes (adulte Rattenkardiomyozyten)
BCA	bicinchoninic acid (Bicinchoninsäure)
BDM	2,3-Butandionmonoxim
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BNP	brain natriuretic peptide (natriuretisches Peptid Typ B)
BrdU	5-Brom-2-desoxyuridin
BSA	Bovine Serum Albumin (Rinderserumalbumin)
βgal	β-Galactosidase
CaMKII	Ca ²⁺ -Calmodulin-abhängige Proteinkinase II
CBFHH	Ca ²⁺ - und Bicarbonat freies Hanks mit HEPES
Cch	Carbachol
cDNA	complementary DNA (komplementäre DNS)
CIAP	Calf Intestinal Alkaline Phosphatase
CIRB	Calmodulin-IP ₃ R
Co-IP	Co-Immunpräzipitation
DAG	Diacylglycerol
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindole
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
dn	dominant-negativ
DNA	deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure, DNS)
DNase	Desoxyribonuklease
DTT	1,4-Dithiothreitol
ECL	enhanced chemiluminescence (verstärkte Chemiluminiszenz)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
ET1	Endothelin 1
FBS	Fetal Bovine Serum (fötales Rinderserum)
FKBP	FK506-bindendes Protein
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
G _q PCR	G _q -Protein-gekoppelter Rezeptor

Abkürzungsverzeichnis

HA	Hämagglutinin
HBSS	Hanks' balanced salt solution
HDAC4	Histondeacetylase 4
HEK 293-Zellen	human embryonic kidney cells (menschliche embryonale Nierenzellen)
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HRP	horseradish peroxidase (Meerrettichperoxidase)
Hsp90	heat shock protein 90 (Hitzeschockprotein 90)
IgG	Immunglobulin G
IP	Isoleucin-Prolin
IP ₃	Inositol-1,4,5,-triphosphat
IP ₃ R	IP ₃ -Rezeptoren
Ktrl	Kontrolle
LP	Leucin-Prolin
MEM	Minimum Essential Medium Eagle
MEF2	myocyte enhancer factor 2
MOI	multiplicity of infection (Multiplizität der Infektion)
NCX	Na ⁺ /Ca ²⁺ -Austauscher
NFAT	nuclear factor of activated T-cells
NMDG	N-Methyl-D-glucamin
NRC	neonatal rat cardiomyocytes (neonatale Rattenkardiomyozyten)
OAG	1-Oleoyl-2-acetyl- <i>sn</i> -glycerol
PBS	phosphate-buffered saline (Phosphatgepufferte Kochsalzlösung)
PCR	polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PE	Phenylephrin
PFA	Paraformaldehyd
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PLC	Phospholipase C
PPIase	Peptidyl-Prolyl-cis-trans-Isomerase
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Pyr3	Pyrazol 3
P/S	Penicillin-Streptomycin
qPCR	quantitative Echtzeit-PCR
RCAN1	Regulator of Calcineurin 1 (RCAN1)
RNA	ribonucleic acid (Ribonukleinsäure, RNS)
RNase	Ribonuklease
ROCE	receptor-operated-calcium-entry

Abkürzungsverzeichnis

RyR	Ryandodin-Rezeptor
Scr siRNA	Scramble siRNA
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SERCA	SR Ca ²⁺ -ATPase
siRNA	Small interfering RNA (kleine eingreifende RNA)
SOCE	store-operated-calcium-entry
SR	sarkoplasmatisches Retikulum
STIM1	stromal interaction molecule 1
TAC	transverse aortic constriction (Ligatur des Aortenbogens)
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine
TPR	Tetratricopeptid
TM Domäne	Transmembrandomäne
TRP	Transient Receptor Potential
TRPC	Transient Receptor Potential (TRP; c-classical, TRPC)
Veh	Vehikel
VP	Valin-Prolin
YFP	yellow fluorescent protein (gelb fluoreszierendes Protein)

Zusammenfassung

Transient Receptor Potential (TRP; C-classical; TRPC) Kanäle sind Ionenkanäle in der Plasmamembran und erlauben einen nicht selektiven Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle. Durch die Stimulation von G_q -Protein-gekoppelten Rezeptoren (G_q PCRs) wird dieser Ca^{2+} -Einstrom erhöht, wodurch über Calmodulin, die Phosphatase Calcineurin aktiviert wird. Der Transkriptionsfaktor *nuclear factor of activated T-cells* (NFAT) wird durch Calcineurin dephosphoryliert und wandert in den Nucleus, wo er mit anderen Transkriptionsfaktoren interagiert und Hypertrophie-induzierende Gene aktiviert. TRPC3 ist hierbei eine der relevantesten Isoformen für die Entwicklung einer Myokardhypertrophie, wie sie im Rahmen zahlreicher kardiovaskulärer Erkrankungen zu finden ist. Eine kardiale Hypertrophie ist an der Pathogenese der Herzinsuffizienz beteiligt und stellt somit einen wichtigen Risikofaktor für den plötzlichen Herztod dar. Aus diesem Grund ist es von besonderer Bedeutung die Regulation von TRPC3 Kanälen und deren Einfluss auf hypertrophe Prozesse genauer zu untersuchen.

In Vorversuchen wurde FK506 bindendes Protein 52 (FKBP52) als neuer Interaktionspartner von TRPC3 im Herzen gefunden. Die dabei gefundene FKBP52-Bindestelle von TRPC3 lag erstaunlicherweise außerhalb der zu erwartenden Bindestelle mit den vermeintlichen FKBP-Bindemotiven.

FKBP52 ist ein Immunophilin, das als cis/trans Isomerase fungiert und dadurch an der Regulation von verschiedenen Ionenkanälen beteiligt ist, darunter auch TRPC-Kanäle. Es zeigte sich, dass alle Domänen von FKBP52, bis auf die TPR3-Domäne und der C-Terminus, in der Lage waren, mit TRPC3 zu interagieren. Aufgrund der Funktion der FKBP5s und der Tatsache, dass TRPC3 eine Rolle in der Entwicklung einer kardialen Hypertrophie spielt, sollte in dieser Arbeit untersucht werden, ob FKBP52 die Aktivität und die nachgeschalteten hypertrophen Signalwege von TRPC3 beeinflusst.

Die Downregulation von FKBP52 führte zu einer verstärkten TRPC3-abhängigen hypertrophen Antwort in neonatalen Rattenkardiomyozyten (engl. neonatal rat cardiomyocytes, NRCs). Der gleiche Effekt war sowohl in NRCs und in adulten Rattenkardiomyozyten (engl. adult rat cardiomyocytes, ARCs) zu sehen, wenn Peptidyl-Prolyl-cis-trans-Isomerase (PPIase) defiziente Mutanten von FKBP52 überexprimiert wurde. Verkürzte FKBP52 Mutanten erhöhten ebenfalls die TRPC3-abhängige Aktivität von Calcineurin, was durch eine verstärkte Translokation von NFAT in den Nucleus von NRCs zu sehen war. Außerdem konnte in NRCs und in menschlichen embryonalen Nierenzellen (engl. human embryonic kidney cells, HEK 293 Zellen), die die PPIase defizienten Mutanten exprimierten, ein erhöhter Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle beobachtet werden. Das gleiche war nach Downregulation von FKBP52 in HEK 293 Zellen, die TRPC3 überexprimieren (T3.9

Zellen), zu sehen. Eine funktionelle Interaktion von FKBP52 und TRPC3 konnte auch in elektrophysiologischen Messungen bestätigt werden. Nach der Interaktion von TRPC3 mit den FKBP52 Mutanten zeigte sich eine erhöhte TRPC3-Aktivität.

Die Daten zeigen somit, dass TRPC3-Kanäle durch FKBP52 reguliert werden und diese Regulation abhängig von der PPIase Funktion ist. Eine Interaktion von TRPC3 mit vollfunktionsfähigem FKBP52 könnte vor einer Ca^{2+} -Überlastung und einer damit einhergehenden pathologischen Hypertrophie des Herzens schützen.

Abstract

Transient Receptor Potential (TRP; C-classical; TRPC) channels are ion channels in the plasma membrane which allow a non-selective Ca^{2+} influx into the cell. Stimulation of G_q -protein-coupled receptors (G_qPCRs) increases the Ca^{2+} influx and activates the phosphatase calcineurin via calmodulin. Afterwards the transcription factor nuclear factor of activated T-cells (NFAT) is dephosphorylated by calcineurin and translocates to the nucleus, where it interacts with other transcription factors and activates hypertrophy-associated genes. TRPC3 is one of the most relevant isoforms of TRPC channels in the maladaptive hypertrophic program during chronic cardiac diseases. Hypertrophy can lead to the development of heart failure and is therefore an important risk factor for cardiac death. For this reason it is important to understand the regulation of TRPC3 channels in the heart and the influence of TRPC3 in hypertrophy.

Preliminary experiments revealed FK506 binding protein 52 (FKBP52) as a novel interaction partner of TRPC3 in the heart. Surprisingly, the FKBP52 binding domain of TRPC3 was beyond the expected binding domain with the putative FKBP binding motifs. FKBP52 is an immunophilin which functions as cis/trans isomerase and is involved in the regulation of various ion channels, including TRPC channels. We demonstrated that all domains of FKBP52, except the TPR3 domain and the C-terminal region, interact with TRPC3. Due to the function of FKBP52 and the fact that TRPC3 is important in development of cardiac hypertrophy, the aim of this work was to examine whether FKBP52 influences the activity and downstream hypertrophic signalling pathways of TRPC3.

Downregulation of FKBP52 promoted an enhanced TRPC3-dependent hypertrophic response in neonatal rat cardiomyocytes (NRCs). The same effect could be seen by overexpression of peptidyl-prolyl-cis-trans-isomerase (PPIase) mutants of FKBP52 in NRCs and adult rat cardiomyocytes (ARCs). Additionally, the PPIase-deficient FKBP52 mutants increased the TRPC3-dependent activity of calcineurin, which was observed by enhanced translocation of NFAT into the nucleus of NRCs. We detected that the expression of the PPIase-deficient FKBP52 mutants in NRCs and human embryonic kidney cells (HEK 293 cells) increased the Ca^{2+} influx to the cells. A similar effect could be seen after downregulation of FKBP52 in HEK 293 cells overexpressing TRPC3 (T3.9 cells). A functional interaction of FKBP52 and TRPC3 was also confirmed in electrophysiological measurements. The interaction of TRPC3 with the FKBP52 mutants promoted an increased TRPC3 activity.

The data demonstrate that TRPC3 channels are regulated by FKBP52 and that this regulation depends on the PPIase function. An interaction of TRPC3 with functional FKBP52

could protect against Ca^{2+} overload and Ca^{2+} -associated pathological hypertrophy of the heart.

1. EINLEITUNG

1.1. Kardiovaskuläre Erkrankungen

Herz-Kreislauf-Erkrankungen sind weltweit Todesursache Nummer 1, gefolgt von Krebserkrankungen (Abbildung 1). Eine kürzlich veröffentlichte Studie von Dagenais *et al.* ergab, dass zwischen 2005 und 2016 40 % der Todesfälle einen kardiovaskulären Hintergrund hatten (Dagenais *et al.*, 2019).



Abbildung 1: Kardiovaskuläre Erkrankungen sind weltweit die häufigste Todesursache

Weltweit sind 40 % von 17,7 Millionen Todesfällen zwischen 2005 und 2016 auf Herz-Kreislauf-Erkrankungen zurückzuführen, gefolgt von Krebserkrankungen (Dagenais *et al.*, 2019).

Laut statistischem Bundesamt sind auch in Deutschland kardiovaskuläre Erkrankungen die häufigste Todesursache, gefolgt von Neoplasien, wie zum Beispiel Krebserkrankungen, und Krankheiten des Atmungssystems (Abbildung 2). So hatten im Jahr 2017 37 % der Todesfälle einen kardiovaskulären Hintergrund. Im Vergleich hierzu waren lediglich 24,4 % der Todesursachen auf Krebserkrankungen zurückzuführen (Statistisches Bundesamt, 2019).

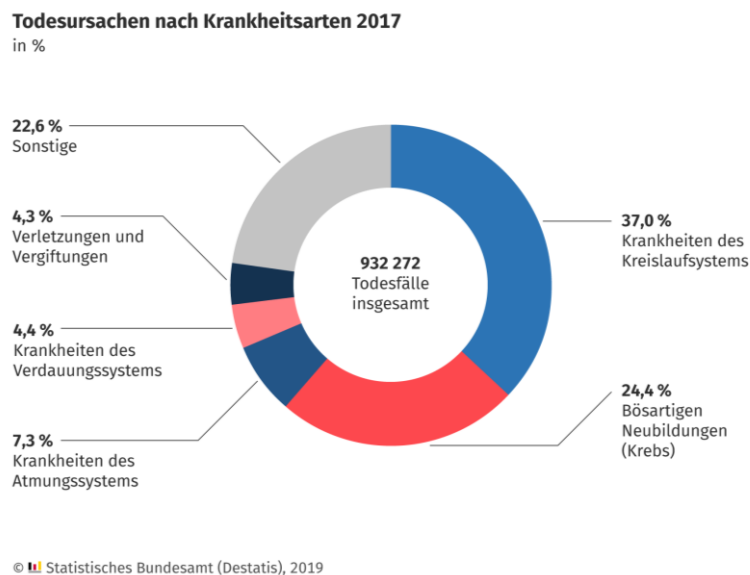


Abbildung 2: Häufigste Todesursachen in Deutschland

In Deutschland waren im Jahr 2017 37 % der Todesfälle auf Krankheiten des Kreislaufsystems zurückzuführen, gefolgt von Krebs mit 24,4 % (Statistisches Bundesamt, 2019).

Herz-Kreislauf-Erkrankungen machen damit auch den größten Teil der direkt mit einer Krankheit verbundenen Kosten im deutschen Gesundheitswesen aus (Dornquast et al., 2016). Somit besteht sowohl ein gesellschaftliches als auch ein ökonomisches Interesse die Forschung auf diesem Feld zu intensivieren.

Es ist bekannt, dass eine vorhandene linksventrikuläre Hypertrophie ein starker Prädiktor für den zukünftigen kardiovaskulären Tod ist. Die Hypertrophie stellt hierbei einen wichtigen Risikofaktor dar und kann zum Beispiel zur Entwicklung einer Herzinsuffizienz führen (Brown, Giles, & Croft, 2000; Frey & Olson, 2003). Bei der Herzinsuffizienz ist die Funktion des Ventrikels beeinträchtigt. Es kann zwischen systolischer und diastolischer Herzinsuffizienz unterschieden werden. Dadurch kann das Herz nicht mehr ausreichend Blut pumpen, um alle Organe zu versorgen. Dies führt unter Belastung zu schneller Ermüdung, Dyspnoe und Ödemen. Im späteren Verlauf der Krankheit können die Symptome auch in Ruhe auftreten, was letztendlich zum Tod führt (Heineke & Molkentin, 2006; Mudd & Kass, 2008; Wagner & Cohn, 1977). Die chronische Herzinsuffizienz ist eine Krankheit mit einer schlechten Prognose und geringen Überlebensraten. So stirbt jeder zweite Patient innerhalb von fünf Jahren nach der Diagnose (Bytyçi & Bajraktari, 2015).

Aufgrund der schlechten Prognose bei Herzinsuffizienz und der oben beschriebenen engen Verbundenheit mit kardialer Hypertrophie ist es von großem Interesse die molekularen Mechanismen der Hypertrophie besser zu verstehen (Bernardo, Weeks, Pretorius, & McMullen, 2010).

1.1.1. Linksventrikuläre Hypertrophie des Herzens

Die kardiale Hypertrophie wird als Zunahme der Herzmasse beschrieben, die als Kompensationsreaktion des Herzens auf einen erhöhten Leistungsbedarf des Herz-Kreislaufsystems auftritt. Es ist eine adaptive Reaktion auf hämodynamischen Stress, um die Herzleistung zu verbessern und damit die Wandspannung und den Sauerstoffverbrauch zu verringern. Das Herz besteht aus verschiedenen Zellarten, wie Kardiomyozyten, Fibroblasten, Endothelzellen, Immunzellen und Vorläuferzellen (Maillet, van Berlo, & Molkentin, 2013). Jedoch ist hauptsächlich die Größenzunahme der einzelnen Kardiomyozyten für die Zunahme der Herzmasse verantwortlich. Da Kardiomyozyten kaum in der Lage sind sich zu teilen, reagieren sie mit Vergrößerung auf die veränderten Bedingungen. Es wird zwischen physiologischer und pathologischer Hypertrophie unterschieden (Shimizu & Minamino, 2016). Zu der physiologischen Hypertrophie zählt einerseits die postnatale Hypertrophie, welche das normale Wachstum des Herzens von der Geburt bis zum frühen Erwachsenenalter beschreibt. Andererseits wird das Wachstum des mütterlichen Herzens während der Schwangerschaft und das Wachstum des Herzens durch Sport ebenfalls dieser Kategorie zugeordnet (Maillet et al., 2013). Bei der physiologischen Hypertrophie bleibt die Herzfunktion vollständig erhalten oder ist sogar erhöht. Darüber

hinaus ist die durch Schwangerschaft und Sport hervorgerufene physiologische Hypertrophie vollständig reversibel. Diese Form der Hypertrophie ist gekennzeichnet durch eine normale Herzmorphologie ohne Fibrose oder Apoptose. Die Verdickung des Myokards ist moderat, auch entwickelt sich aus der physiologischen Hypertrophie keine Herzinsuffizienz (Bernardo et al., 2010; Chung & Leinwand, 2014; Maillet et al., 2013).

Neben der physiologischen gibt es die pathologische Hypertrophie. Diese entsteht aufgrund eines pathologischen Stimulus, der in der Folge zu einer Druck- oder Volumenbelastung der Ventrikel führt. Die auslösenden Stimuli lassen sich in biochemische, dehnungsempfindliche oder neurohumorale Mechanismen, die mit der Freisetzung von Hormonen, Zytokinen, Chemokinen oder Wachstumsfaktoren verbunden sind, unterteilen. Bei dieser Art von Hypertrophie kommt es zu Veränderungen in der extrazellulären Matrix, zu einer erhöhten Steifigkeit des Herzens, verstärkter Apoptose und Nekrose. Auf zellulärer Ebene ist die Hypertrophie zusätzlich noch durch eine veränderte Proteinsynthese, Fibrose und gestörte Calciumhomöostase gekennzeichnet. Zusätzlich zu diesen Veränderungen werden bei der pathologischen Hypertrophie in adulten Kardiomyozyten Gene des fötalen Genprogramms wieder exprimiert: die schwere Kette des β -Myosins, α -Skelett-Actinin und das atriale natriuretische Peptid (ANP). Eine weitere Veränderung während der pathologischen Hypertrophie ist der Wechsel zu kohlenhydratabhängigen energetischen Mechanismen anstatt der Oxidation von Fettsäuren. Dies macht eine Veränderung des Expressionsniveaus von metabolischen Genen erforderlich (Samak et al., 2016). Diese Anpassungen des Herzens beeinflussen die Herzfunktion und den Energiehaushalt (Heineke & Molkentin, 2006), wodurch die pathologische Hypertrophie mit einem erhöhten Risiko für Herzinsuffizienz assoziiert ist (Frey, Katus, Olson, & Hill, 2004).

Es kann zwischen exzentrischer und konzentrischer Hypertrophie unterschieden werden. Die exzentrische Hypertrophie kann aufgrund von insuffizienten Aorten- oder Mitralklappen sowie nach Myokardinfarkt entstehen, was zu einer erhöhten Volumenbelastung führt. Dies führt zu einer Dilatation der Ventrikel, was durch eine Volumenzunahme und einer erhöhten Wanddicke gekennzeichnet ist. Weiterhin kommt es bei der exzentrischen Hypertrophie zu einer Längenzunahme der Kardiomyozyten und einer Anordnung der Sarkomere in einer Reihe.

Die konzentrische Hypertrophie entwickelt sich aufgrund einer Aortenstenose oder arteriellen Hypertonie, die mit einer erhöhten Druckbelastung verbunden ist. Dabei verdicken sich die Ventrikelwand und das Septum nach innen, wodurch es zu einer Abnahme des Innenvolumens kommt. Die Kardiomyozyten werden in diesem Fall breiter und die Sarkomere ordnen sich parallel an (Grossman, Jones, & McLaurin, 1975; Heineke & Molkentin, 2006).

Zu Beginn helfen diese Kompensationsmechanismen der erhöhten Herzbelastung entgegen zu wirken und die Funktion des Herzens aufrechtzuhalten. Wird allerdings eine kritische Herzmasse erreicht, kann das Herzgewebe nicht mehr ausreichend mit Sauerstoff versorgt werden und es kommt zu einem Leistungsabfall (Gradman & Alfayoumi, 2006; Schiattarella & Hill, 2015).

Um in Kardiomyozyten *in vitro* Hypertrophie auszulösen, können zum Beispiel Angiotensin II (Ang II) oder Phenylephrin (PE) verwendet werden. Diese Substanzen bewirken durch die Stimulation von G_q-Protein-gekoppelten Rezeptoren (G_qPCR) die Aktivierung verschiedener Signalwege, die letztendlich für die Hypertrophie verantwortlich sind (Taigen, De Windt, Lim, & Molkentin, 2000). Außerdem ist bereits bekannt, dass Ca²⁺ bei der Entwicklung der Hypertrophie beteiligt ist. Durch verändertes Ca²⁺-Signaling kann es zu entsprechenden Veränderungen im Herzen kommen, die die Entwicklung einer Hypertrophie begünstigen (Berridge, Bootman, & Roderick, 2003).

1.2. Rolle von Ca²⁺ im Herzen

Ca²⁺ ist ein *second-messenger*, der im Herzen für die elektromechanische Kopplung verantwortlich ist, wodurch ankommende Aktionspotentiale in die Muskelkontraktion umgesetzt werden. Des Weiteren beeinflusst Ca²⁺ Zellsignalwege, die an der Entwicklung einer kardialen Hypertrophie beteiligt sind und damit zu Herzinsuffizienz führen können (Dragun, Gazova, Kyselovic, Hulman, & Matus, 2019).

Für die Kontraktion und die Relaxation ist ein exaktes Zusammenspiel verschiedener Ionenkanäle nötig. Durch die Depolarisation werden L-Typ Ca²⁺-Kanäle aktiviert, welche einen Ca²⁺-Einstrom ins Zellinnere erlauben. Das einströmende Ca²⁺ bewirkt die Freisetzung von Ca²⁺ aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR) durch den Ryanodin-Rezeptor (RyR). Dadurch erhöht sich die zytosolische Ca²⁺-Konzentration, was mit Hilfe von Troponin C zur Kontraktion der Kardiomyozyten führt. Für die anschließende Relaxation muss das Ca²⁺ wieder aus dem Cytosol hinaus transportiert werden. Dies geschieht mit Hilfe der SR Ca²⁺-ATPase (SERCA), welche Ca²⁺ zurück ins SR transportiert und zusätzlich durch den Na⁺/Ca²⁺-Austauscher (NCX), der Ca²⁺ im Austausch mit Na⁺ aus den Zellen hinausbefördert (Bers, 2002).

Neben der Kontraktion aktiviert Ca²⁺ auch verschiedene Signalkaskaden, wodurch verschiedene nachgeschaltete Faktoren beeinflusst werden. Aufgrund dessen spielt Ca²⁺ eine Rolle bei der Regulation der Genexpression und kann Ca²⁺-abhängige Transkriptionsfaktoren steuern (Dewenter, von der Lieth, Katus, & Backs, 2017). Es konnte auch bereits festgestellt werden, dass bei der Entwicklung einer kardialen Hypertrophie der Anstieg der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration und die darauffolgende Aktivierung zweier

Ca²⁺-abhängiger Enzyme eine wichtige Rolle spielen. Bei den Enzymen handelt es sich um die Ca²⁺-Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (CaMKII) und die Phosphatase Calcineurin, welche beide durch Calmodulin aktiviert werden (Dominguez-Rodriguez, Ruiz-Hurtado, Benitah, & Gomez, 2012; Wu, Eder, Chang, & Molkentin, 2010). Transient Receptor Potential Classical (TRP; C-classical; TRPC)-Kanäle sind dabei von großer Bedeutung, da eine Überexpression dieser Kanäle zu einem erhöhten Ca²⁺-Einstrom in die Zelle führt und dadurch Calcineurin aktiviert wird (Kapitel 1.3.1.1) (Wu et al., 2010).

1.3. Transient Receptor Potential (TRP)-Kanäle

Transient Receptor Potential (TRP)-Kanäle sind Ionenkanäle, deren Sequenzen von Fliegen bis zum Menschen konserviert sind (Venkatachalam & Montell, 2007). Sie kommen mit Ausnahme der Kernhülle und den Mitochondrien in allen Zellmembranen vor (Nilius & Owsianik, 2011).

Zum ersten Mal wurden Proteine dieser Familie in Photorezeptorzellen der Essigfliegen, *Drosophila melanogaster*, gefunden. Eine Mutation in dem entsprechenden Gen hatte zur Folge, dass sich Fliegen bei hellem Licht wie blind verhielten. Die Mutante konnte auf einen anhaltenden Lichtreiz nur mit einem transienten (d.h. schnell inaktivierenden bzw. flüchtigen) Rezeptorpotential reagieren. Cosens und Manning dachten zu diesem Zeitpunkt noch, dass es sich um einen Defekt in den Photorezeptoren der Fliege handelt (Cosens & Manning, 1969). Das entsprechende Gen wurde erst 20 Jahre später identifiziert. Mit der Identifizierung des Gens wurde festgestellt, dass dieses für ein Membranprotein codiert (Montell & Rubin, 1989). Später konnte außerdem gezeigt werden, dass es sich um Kationenkanäle handelt (Hardie & Minke, 1992, 1993; Phillips, Bull, & Kelly, 1992). Der Phänotyp der Mutante war auch entscheidend für die Namensgebung – „transient receptor potential“ (Minke, 1977; Montell & Rubin, 1989).

Es sind bisher 29 Gene der TRP-Kanäle bekannt, welche sich in sieben Unterfamilien einteilen lassen: canonical- (TRPC), ankyrin- (TRPA), melastin- (TRPM), mucolipin- (TRPML), polycystin- (TRPP), vanilloid- (TRPV) und no mechanoreceptor- (TRPN) Unterfamilie (Tabelle 1). In Säugetieren kommen Kanäle aller Unterfamilien vor, mit Ausnahme der Gruppe TRPN (Ramsey, Delling, & Clapham, 2006).

Tabelle 1: TRP-Kanäle und ihre Unterfamilien

Unterfamilie	Kanal
TRPA (ankyrin)	TRPA1
TRPC (canonical)	TRPC1
	TRPC2 (<i>Pseudogen</i>)
	TRPC3
	TRPC4

	TRPC5
	TRPC6
	TRPC7
TRPM (melastin)	TRPM1
	TRPM2
	TRPM3
	TRPM4
	TRPM5
	TRPM6
	TRPM7
	TRPM8
TRPML (mucolipin)	TRPML1
	TRPML2
	TRPML3
TRPN (no mechanoreceptor)	TRPN1
TRPP (polycystin)	TRPP2
	TRPP3
	TRPP5
TRPV (vanilloid)	TRPV1
	TRPV2
	TRPV3
	TRPV4
	TRPV5
	TRPV6

Die TRP-Ionenkanäle sind, bis auf wenige Ausnahmen, nicht selektiv. Sie sind für eine Vielzahl von unterschiedlichen Ionen durchlässig und haben eine Vielfalt an Aktivierungsmodi sowie physiologischen Funktionen. Trotzdem besitzen sie als Gemeinsamkeit sechs Transmembrandomänen (TM Domänen), zytosolische N- und C-terminale Enden mit Proteinbindungsstellen und eine Pore zwischen den TM Domänen 5 und 6 (Montell, 2005). Die TM Domänen der unterschiedlichen Unterfamilien weisen einen hohen Grad an Ähnlichkeit in der Aminosäuresequenz auf. C- und N-Terminus zeigen dagegen größere Unterschiede: sie sind unterschiedlich lang und bestehen aus unterschiedlichen Domänen (Yue et al., 2015). TRP-Kanäle kommen in verschiedenen Zelltypen vor, einschließlich erregbarer und nicht erregbarer Zellen des Herz-Kreislauf-Systems. Sie zählen zu den nicht-spannungsabhängigen Ionenkanälen und können so auf thermische, mechanische, chemische oder lokal zelluläre Stimuli reagieren. Das durch diese Stimulation eintretende Ca^{2+} und die Membrandepolarisation sind bei der Aktivierung von nachgeschalteten Signalprozessen beteiligt. Diese spielen bei der Regulation von Zellfunktionen wie Kontraktion, Relaxation, Proliferation, Differenzierung und Zelltod eine Rolle (Yue et al., 2015).

Die Ionenkanäle der Unterfamilie TRPC sind die Kanäle, die am engsten mit den Kanälen der ursprünglichen *Drosophila melanogaster* TRP-Familie verwandt sind (Vazquez, Wedel, Aziz, Trebak, & Putney, 2004).

1.3.1. Die TRPC-Familie

TRPC-Kanäle sind nicht selektive Ionenkanäle, die als Tetramere in der Plasmamembran vorkommen und für Ca^{2+} permeabel sind. Die TRPC-Familie besteht aus sieben Isoformen (TRPC1 bis 7). Diese können aufgrund ihrer strukturellen und funktionellen Gemeinsamkeiten in zwei Gruppen eingeteilt werden, TRPC1/4/5 und TRPC3/6/7. TRPC2 ist ein Pseudogen und wird im Menschen nicht exprimiert (Eder & Molkentin, 2011).

Jede TRPC-Untereinheit besteht, wie alle TRP-Kanäle, aus sechs TM Domänen, die von funktionell wichtigen intrazellulären N- und C-Termini begrenzt sind. Die Tetramere werden als Homo- oder Heteromere zwischen vier TRPC-Untereinheiten gebildet (Abbildung 3) (Eder & Molkentin, 2011; Ramsey et al., 2006).

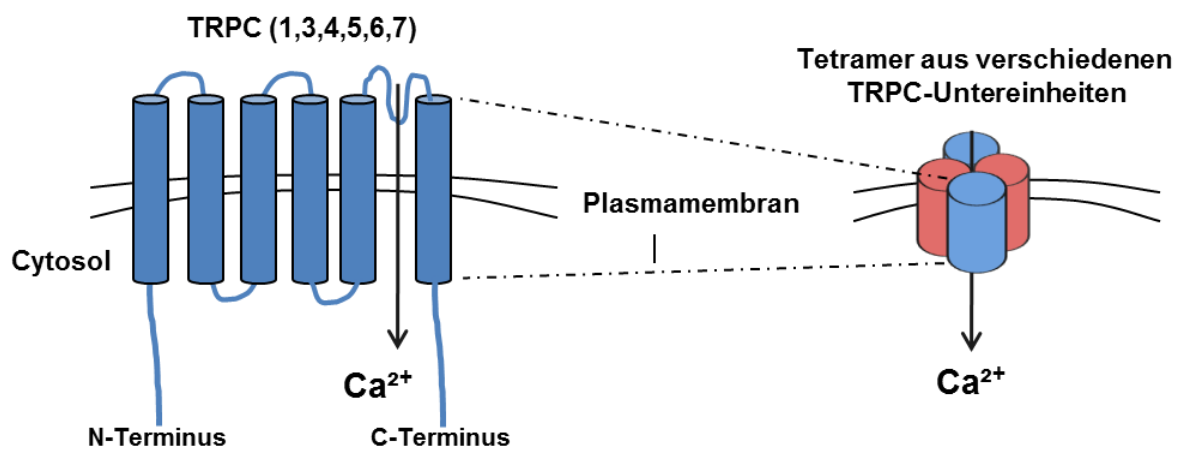


Abbildung 3: Schema eines TRPC-Kanals und eines Tetramers aus verschiedenen TRPC-Untereinheiten

Jeder TRPC-Kanal besteht aus sechs TM Domänen, die von zytosolischen N- und C-Termini begrenzt sind. Zwischen den TM Domänen 5 und 6 befindet sich eine Pore. Vier dieser TRPC-Untereinheiten bilden ein Tetramer.

1.3.1.1. Aktivierung und Signaling der TRPC-Kanäle im Herzen

Die Aktivierung von TRPC-Kanälen und die nachgeschalteten Signalwege spielen eine Rolle in der pathologischen kardialen Hypertrophie. Es gibt verschiedene Wege wie TRPC-Kanäle aktiviert werden können (Abbildung 4). Im ersten Schritt werden G_qPCR durch Agonisten aktiviert. Dies kann zum Beispiel mit Hilfe von Ang II, welches an den Ang II Typ 1 Rezeptor bindet, oder PE, was an einen $\alpha 1$ -adrenergen Rezeptor bindet, erfolgen. Durch die Aktivierung des G_qPCR wird die Phospholipase C (PLC) aktiviert. Diese katalysiert die Umsetzung vom Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) zu Inositol-1,4,5-triphosphat (IP_3) und Diacylglycerol (DAG). Beide können nun TRPC Kanäle aktivieren (Eder & Molkentin, 2011). Die Kanäle TRPC3/6/7 werden direkt durch DAG aktiviert. Dieser Vorgang wird als „receptor-operated-calcium-entry“ (ROCE) bezeichnet. Die Kanäle TRPC1/4/5 werden über den sogenannten „store-operated-calcium-entry“ (SOCE) aktiviert, wobei die

Aktivierung über SOCE immer noch kontrovers diskutiert wird. Dabei bindet IP_3 an IP_3 -Rezeptoren (IP_3R), wodurch Ca^{2+} aus dem SR austritt. Das *stromal interaction molecule* 1 (STIM1), der Ca^{2+} -Sensor des SR, wird aktiviert und aktiviert wiederum den TRPC-Kanal, wodurch Ca^{2+} durch den TRPC-Kanal ins Cytosol eintreten kann (Eder & Molkenin, 2011).

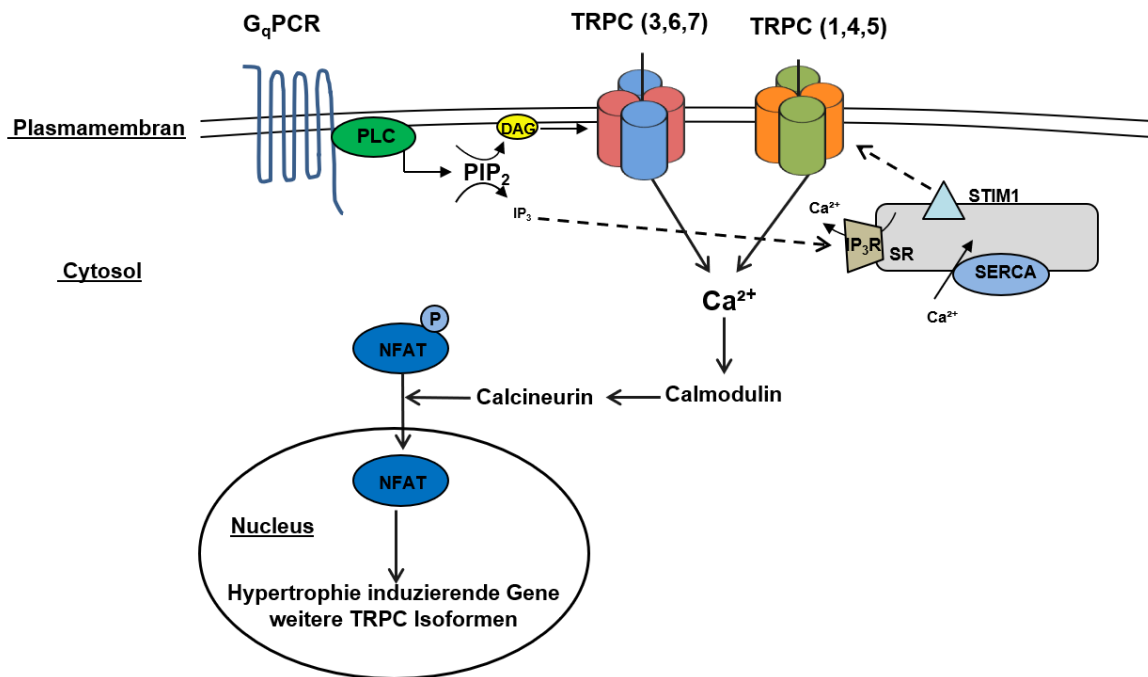


Abbildung 4: Aktivierung und Signaling der TRPC-Kanäle

TRPC-Kanäle werden durch Stimulation des G_q -Protein-gekoppelten Rezeptors (G_qPCR) aktiviert. Im ersten Schritt wird die Phospholipase C (PLC) aktiviert, wodurch Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) zu Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP_3) und Diacylglycerol (DAG) katalysiert wird. Durch DAG werden direkt TRPC3/6/7 aktiviert („receptor-operated-calcium-entry“ (ROCE)). Das entstandene IP_3 bindet an den IP_3 -Rezeptor, wodurch Ca^{2+} aus dem Sarkoplasmatischen Retikulum (SR) austritt. Durch das austretende Ca^{2+} wird das *stromal interaction molecule* 1 (STIM1) aktiviert, wodurch es zu einer Aktivierung der TRPC1/4/5 Kanäle kommt („store-operated-calcium-entry“ (SOCE)). Durch beide Aktivierungsmodi wird der Calcineurin/*nuclear factor of activated T-cells* (NFAT)-Signalweg angeschaltet, wodurch das einströmende Ca^{2+} zuerst Calmodulin aktiviert, welches in Folge Calcineurin in einen aktiven Zustand versetzt. Das aktive Calcineurin dephosphoryliert NFAT, wodurch dieses in den Nucleus wandert und dort Hypertrophie induzierende Gene und weitere TRPC-Isoformen aktiviert.

Das durch den TRPC-Kanal einströmende Ca^{2+} schaltet den Calcineurin/*nuclear factor of activated T-cells* (NFAT)-Signalweg an. Dabei wird über Calmodulin Calcineurin aktiviert, welches NFAT dephosphoryliert. Das dephosphorylierte NFAT wandert vom Cytosol in den Nucleus und agiert dort als Transkriptionsfaktor, indem er mit anderen Transkriptionsfaktoren, z.B. GATA4 an der Regulation und Expression Hypertrophie induzierender Gene und weiterer TRPC-Isoformen beteiligt ist. So wurde gezeigt, dass

speziell im Herzen die Stimulation des G_qPCR einen erhöhten Ca²⁺-Einstrom bewirkt und dadurch Ca²⁺-abhängige Signalwege aktiviert werden, die letztendlich zu einer kardialen Hypertrophie führen. Dies geschieht in pathologischen Stresszuständen, während chronischer Drucküberbelastung oder nach einem Myokardinfarkt (Eder, 2017; Molkentin et al., 1998).

1.3.1.2. TRPC-Kanäle in der kardialen Hypertrophie

Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Expression und die Aktivität von TRPC-Kanälen, während der pathologischen Hypertrophie und der Herzinsuffizienz in verschiedenen Modellen hochreguliert sind. So wird TRPC3 in Ratten nach einer Ligatur des Aortenbogens (engl. transverse aortic constriction, TAC) verstärkt exprimiert. TAC führt zu einer Druckbelastung im Herzen und kann damit eine Hypertrophie auslösen. Des Weiteren wurde gezeigt, dass Mäuse, die Calcineurin überexprimieren, eine erhöhte TRPC3-Aktivität zeigen (Bush et al., 2006). Das gleiche konnte für TRPC1 und TRPC6 gezeigt werden. Auch hier kommt es nach Auslösen der Hypertrophie durch TAC zu einer erhöhten TRPC1- bzw. TRPC6-Expression in Ratten und Mäusen (Kuwahara et al., 2006; Niizeki et al., 2008; Ohba et al., 2007). Beim Menschen mit Herzinsuffizienz konnte ebenfalls eine erhöhte Expression von TRPC6 und auch von TRPC5 im Herzen gezeigt werden (Bush et al., 2006; Kuwahara et al., 2006). Außerdem wird durch die Stimulation des G_qPCR mit Endothelin 1 (ET1), Ang II oder PE in neonatalen Rattenkardiomyozyten (engl. neonatal rat cardiomyocytes, NRCs) TRPC1 und TRPC3, natriuretisches Peptid Typ B (engl. brain natriuretic peptide, BNP) und ANP verstärkt exprimiert. Des Weiteren kommt es zu einem erhöhten SOCE und gesteigertem Zellwachstum (Brenner & Dolmetsch, 2007; Ohba et al., 2007).

Auf der anderen Seite konnte aber auch gezeigt werden, dass durch den TRPC-abhängigen Ca²⁺-Einstrom ins Cytosol Signalwege aktiviert werden, die zu pathologischer Hypertrophie führen. Transgene Mäuse, die TRPC3 im Herzen überexprimieren, zeigen einen erhöhten SOCE und entwickeln eine Kardiomyopathie. Des Weiteren zeigen transgene TRPC3-Mäuse, die einer Druckbelastung oder einer Ang II/PE Stimulation mit Hilfe von osmotischen Minipumpen unterzogen werden, eine erhöhte NFAT-Aktivität sowie eine verstärkte Hypertrophie (Nakayama, Wilkin, Bodi, & Molkentin, 2006). Diese Effekte konnten auch *in vitro* gezeigt werden. Überexpression von TRPC3 in NRCs und Stimulation mit 1-Oleoyl-2-acetyl-*sn*-glycerol (OAG), ein membranpermeables DAG-Analogon (Woo et al., 2008), welches TRPC-Kanäle aktiviert, vergrößert die Zellen und induziert die Expression des hypertrophen Markers ANP und des α -Skelett-Actinin (Bush et al., 2006). Auch eine Hochregulation von TRPC1 und eine Stimulation des G_qPCR mit ET1 in NRCs führt zu hypertrophem Wachstum, einer erhöhten Aktivität von NFAT sowie zu einer erhöhten Expression von BNP, was ebenfalls ein kardialer Marker für die Hypertrophie darstellt. Eine

Co-Transfektion mit einer dominant-negativen Form von TRPC1 unterdrückt diese Effekte (Ohba et al., 2007).

Auch für andere TRPC Isoformen konnte gezeigt werden, dass eine verminderte Aktivität die pathologisch-kardiale Hypertrophie bremst. Wu *et al.* generierten herzspezifische transgene Mäuse, die dominant-negative (dn) TRPC3,4 und 6 Proteine (dnTRPC3, dnTRPC6 oder dnTRPC4) exprimieren, um die Aktivität der jeweiligen Kanäle zu blockieren. Dabei handelt es sich bei dnTRPC6 um eine TRPC6-Porenmutante und bei dnTRPC4 und dnTRPC3 um N-terminale Fragmente, die zu funktionslosen TRPC-Tetrameren assoziieren. Mit diesem Versuchsansatz konnte gezeigt werden, dass durch die Überexpression von allen dn-TRPC Proteinen eine Agonisten-vermittelte hypertrophe Antwort nach Infusion von Ang II/PE, sowie eine durch chronisch-erhöhte Nachlast verursachte Hypertrophie abgeschwächt sind. Außerdem ließ sich erkennen, dass die dominant-negativen Mäuse auch vor Funktionseinschränkungen nach langfristiger Druckbelastung geschützt sind (Wu et al., 2010). Ähnliche Effekte äußerten sich nach Downregulation von TRPC1 in NRCs. Der Knockdown von TRPC1 inhibiert den Anstieg der Expressionslevels von BNP und ANP nach Stimulation mit ET1, Ang II oder PE. Zusätzlich verhindert die Downregulation von TRPC, das durch Ang II oder PE induzierte Zellwachstum (Ohba et al., 2007). Außerdem ist es gelungen TRPC3 selektiv mit Hilfe einer Pyrazol-Verbindung Pyrazol 3 (Pyr3) zu inhibieren. In NRCs kann die Aktivität von NFAT und das hypertrophe Wachstum durch Pyr3 inhibiert werden. Zusätzlich wurde *in vivo* gezeigt, dass mit der Inhibierung von TRPC3 durch Pyr3, die durch TAC induzierte Hypertrophie, in Mäusen, gehemmt ist (Kiyonaka et al., 2009). Anhand dieser Ergebnisse lässt sich erkennen, dass TRPC-Kanäle eine wichtige Rolle bei der Entwicklung der kardialen Hypertrophie spielen.

1.3.1.3. Struktur und Interaktionspartner von TRPC3

TRPC3 (Abbildung 5) ist eine der wichtigsten und am besten charakterisierten Isoformen in hypertrophen Signalwegen bei kardiovaskulären Erkrankungen (Bandleon et al., 2019; Nakayama et al., 2006).

TRPC3 besteht wie alle TRPC-Untergruppen aus sechs TM Domänen mit einer Pore zwischen den TM Domänen 5 und 6 und einem zytosolischen C- und N-Terminus. Die beiden Termini sind für verschiedene Aufgaben von Bedeutung: Protein-Protein-Interaktionen, Vermittlung des Kanaltransports, Verankerung und Lokalisation in der Membran, Steuerung und funktionelle Regulation des Kanals und Bildung der Tetramerstrukturen (Eder & Molkentin, 2011).

Der N-Terminus von TRPC3 besteht aus vier Ankyrin-Wiederholungen, wobei andere TRPC Kanäle eine andere Anzahl an Ankyrin-Wiederholungen haben. Außerdem befindet sich im N-Terminus aller TRPC-Kanäle eine „coiled-coil“-Struktur (Eder, Schindl, Romanin, & Groschner, 2007). Im C-Terminus von TRPC-Kanälen ist eine TRP-Helix zu finden. Sie

besteht aus 25 Aminosäuren und kommt in nahezu allen TRP Unterfamilien vor, außer in TRPA und TRPP. In dieser TRP-Helix ist wiederum eine in allen TRPC-Kanälen hochkonservierte 6-Aminosäuren (EWK FAR) umfassende TRP box zu finden (Ramsey et al., 2006). Anschließend folgen auf der C-terminalen Seite eine „coiled-coil“-Struktur und eine prolinreiche Sequenz. Diese Sequenz ist in allen TRPC-Kanälen hochkonserviert und entspricht der Bindedomäne für FK506 bindendes Protein 59 (dFKBP59; LPPPFNVLP SVK) in den *Drosophila* Photorezeptorkanälen TRPL. dFKBP59 ist das *Drosophila*-Homolog von humanem FK506 bindendem Protein 52 (FKBP52), welches auch als FKBP4 bekannt ist. Das erste Leucin-Prolin (LP)-Dipeptid ist über alle TRPC-Kanäle konserviert. Das zweite LP-Dipeptid in dFKBP59 ist ein Valin-Prolin (VP)-Dipeptid in TRPC1/4/5 und ein Isoleucin-Prolin (IP)-Dipeptid in TRPC3/6/7 (Sinkins, Goel, Estacion, & Schilling, 2004). Die sich anschließende Calmodulin-IP₃R (CIRB) Region ist in allen TRPC Isoformen vorhanden. Am distalen Ende des C-Terminus ist außerdem noch eine weitere „coiled-coil“-Region zu finden (Eder & Molkenstin, 2011; Vazquez et al., 2004).

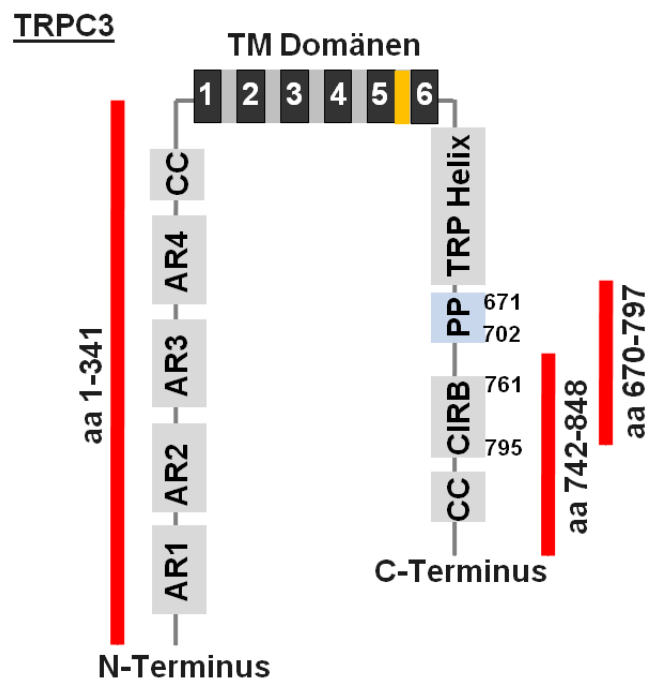


Abbildung 5: Struktur eines einzelnen TRPC3-Kanals mit seinen unterschiedlichen Domänen

Zu sehen ist der N-Terminus mit den Ankyrin-Wiederholungen 1-4 (AK1-4) und der „coiled-coil“ (CC) Domäne. Es folgen sechs Transmembrandomänen (TM Domänen) mit der Pore (gelb markiert) und der C-Terminus mit einer TRP-Helix, der Prolinreichen (PP) Region, der Calmodulin/IP₃-Rezeptor Binderegion (CIRB) und einer weiteren CC-Domäne. Die roten Balken zeigen die Proteinfragmente (aa 1-341, 670-797 und 742-848), die als *Baits* in dem Yeast Two-Hybrid Screen (Kapitel 1.3.1.4) verwendet wurden (Bandleon et al., 2019).

Die verschiedenen Domänen stellen Interaktionsstellen für verschiedene Proteine dar, die unterschiedliche Funktionen vermitteln. Diese deuten darauf hin, dass es einen

Zusammenhang zwischen Ca^{2+} -Veränderungen und der Aktivität von TRPC-Kanälen geben muss und Calmodulin dabei eine Rolle spielt. So besitzen alle TRPC-Kanäle ein CIRB Region am C-Terminus, die sowohl eine Interaktionsstelle für Calmodulin als auch eine für IP_3R darstellt. Es wurde schon gezeigt, dass niedrige Ca^{2+} -Konzentrationen die Bindung von IP_3R und hohe Ca^{2+} -Konzentrationen die Bindung von Calmodulin begünstigen (Tang et al., 2001). Beide Proteine sind in der Lage die Aktivität von TRPC3-Kanälen zu beeinflussen. So zeigten elektrophysiologische Messungen, dass das N-terminale Peptid von IP_3R direkt TRPC3 Kanäle aktiviert. Eine Verdrängung des Calmodulins von der Bindungsstelle führt hingegen zu einer Inhibition des Kanals (Eder et al., 2007). Es ist auch bekannt, dass TRPC-Kanäle mit anderen Ionenkanälen interagieren, so zum Beispiel TRPC3 mit dem NCX. Die beiden agieren als Signalpartner, die unterschiedliche Ca^{2+} -Signale generieren. Ein TRPC3-abhängiger Na^+ -Einstrom führt dazu, dass sich Na^+ in der Zelle anreichert und daraufhin der NCX in einem *reverse mode* Na^+ aus der Zelle hinaustransportiert und Ca^{2+} in die Zelle hinein. Die Interaktion wird über den C-Terminus der TRPC3-Kanäle vermittelt (Rosker et al., 2004).

Eine weitere Gruppe von Interaktionspartnern sind die FKBP, die zur Gruppe der Immunophiline gehören (Kapitel 1.4.1). Proteine, die ebenfalls mit TRPC3 interagieren, am Transport von TRPC3 zur Plasmamembran und der Plasmamembranexpression der Kanäle beteiligt sind, sind SNARE Proteine. Dazu gehören, VAMP2 oder αSNAP , welche mit dem N-Terminus von TRPC3 interagieren (Singh et al., 2004). Zusätzlich interagiert TRPC3 mit Caveolin-1 und der PLC γ . Diese beiden Proteine sind ebenfalls am Transport zur Plasmamembran sowie an der Lokalisierung von TRPC3-Kanälen und an deren Funktion beteiligt. Die Interaktion von TRPC-Kanälen und Caveolin1 kann so intramolekulare Wechselwirkungen zwischen TRPC-Kanälen und Proteinen, die an der Aktivierung von SOCE beteiligt sind, erleichtern (Ambudkar, Brazer, Liu, Lockwich, & Singh, 2004; van Rossum et al., 2005). Junctate ist ein weiteres Protein, das mit TRPC3-Kanälen interagiert und bei der Aktivierung von TRPC-Kanälen mitwirkt. Es wurde gezeigt, dass Junctate einen Komplex mit IP_3R und TRPC3 bildet. Die Binderegion für dieses Protein liegt im C-Terminus von TRPC3. Es wird vermutet, dass die Verbindung zwischen IP_3R und Junctate zu einem verstärkten TRPC3-abhängigen Ca^{2+} -Einstrom führt (Treves et al., 2004).

Es ist durchaus wahrscheinlich, dass TRPC3 weitere noch nicht-identifizierte Interaktionsbindedomänen aufweist. Die Identifikation dieser kann einen entscheidenden Beitrag zum Verständnis über die Regulation und Funktionsweise von TRPC3 Kanälen liefern und deren Beteiligung an der Pathogenese hypertropher Mechanismen aufklären.

1.3.1.4. Neue Interaktionspartner von TRPC3 im Herzen

In früheren Projekten dieser Arbeitsgruppe wurde bereits begonnen nach neuen Interaktionspartnern von TRPC3, die die Kanalaktivität in hypertrophen Krankheitsgeschehen

beeinflussen, zu suchen. Es wurde ein Yeast Two-Hybrid Screen durchgeführt, bei dem drei zytosolische TRPC-Fragmente (ein N-terminales Fragment (Aminosäuren (engl. amino acids, aa) 1-341) und zwei C-terminale Fragmente (aa 670-797 und aa 742-848)) als Köderprotein, im Folgenden als „*Bait*“ bezeichnet, verwendet wurden (Abbildung 5: rote Balken zeigen die Fragmente, die als *Baits* verwendet wurden). Mit Hilfe dieser *Baits* wurde in einer kardialen cDNA-Bibliothek nach möglichen Bindungspartnern von TRPC3 gesucht. Mit dem N-terminalen Fragment (aa 1-341) und einem C-terminalen Fragment (aa 742-848) wurden in der kardialen cDNA Bibliothek positive Klone, und damit Proteine die mit TRPC3 interagieren, entdeckt (Tabelle 2). Das dritte Fragment (C-Terminal; aa 670-797) zeigte keine Protein-Protein-Interaktion. Als Interaktionspartner von TRPC3 wurden Proteine gefunden, die der leichten Myosinkette zuzuordnen sind: Myosin regulatorische Leichtekette und Myosin-Leichtekette Polypeptid 2. Außerdem wurde die Triosephosphatisomerase als Partner ausgemacht. Diese drei Proteine wurden jedoch als nicht spezifische Interaktionen eingeordnet und deshalb nicht weiter untersucht. Des Weiteren konnten die sarkomeren Proteine, Desmin und Myomesin, als Interaktionspartner von TRPC3 durch den Yeast Two-Hybrid Screen identifiziert werden. Es war jedoch nicht möglich die Interaktion der beiden Proteine mit TRPC3 mit Hilfe von Co-Immunpräzipitationen (Co-IP) zu bestätigen. Zusätzlich wuchsen Kolonien, die verschiedene mitochondriale Proteine, Kreatinkinase, Aconitase und Translokase exprimierten. Es konnte auch eine Interaktion mit dem Prä-B-Zellen-Leukämie Transkriptionsfaktor Interaktionsprotein 1, einem bisher unbeschriebenen Transkriptionsfaktor im Herzen, ermittelt werden.

Tabelle 2: Ergebnis des Yeast Two-Hybrid Screens (geändert nach (Bandleon et al., 2019))

Proteininteraktionen mit dem N-Terminus (aa 1-341) von TRPC3:
Myosin regulatorische Leichtekette
Myosin-Leichtekette Polypeptid 2
Desmin
Myomesin
Mitochondriale Kreatinkinase
Mitochondriale Aconitase
Translokase der inneren mitochondrialen Membran 44
Triosephosphatisomerase
Proteininteraktionen mit dem C-Terminus (aa 742-848) von TRPC3:
FKBP52
Myosin-Leichtekette Polypeptid 2
Prä-B-Zellen-Leukämie Transkriptionsfaktor Interaktionsprotein 1
Triosephosphateisomerase

Unter Berücksichtigung dieser Kandidaten wurde das Immunophilin FKBP52, welches ebenfalls einen Treffer ergab, aufgrund seiner bekannten Rolle als Co-Chaperon und Regulator von Ionenkanälen (Kapitel 1.4), als physiologisch relevantester Interaktionspartner von TRPC3 erachtet (Bandleon et al., 2019).

FKBP52 ist ein Interaktionspartner des C-terminalen TRPC3 Fragments (aa 742-848) (Abbildung 6). Da dieses TRPC3-Fragment außerhalb der bisher vermuteten FKBP52-Bindestellen liegt, sollte die Interaktion zwischen FKBP52 und TRPC3 genauer untersucht werden (Kapitel 1.4.1).

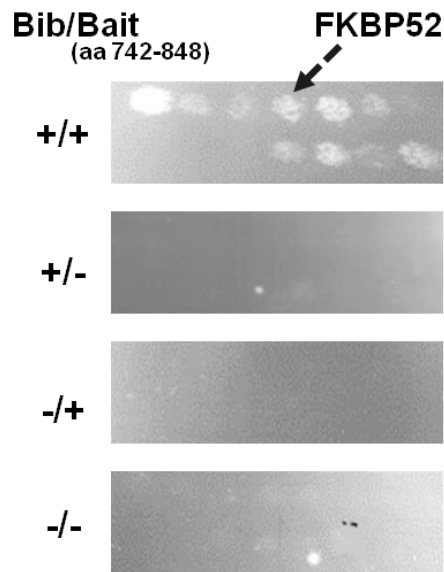


Abbildung 6: FKBP52 wurde mit Hilfe eines Yeast Two-Hybrid Screens als neuer Interaktionspartner von TRPC3 identifiziert

Ein Yeast Two-Hybrid Screen mit dem C-terminalen Ende von TRPC3 (aa 742-848) zeigte das Immunophilin FKBP52 als direkten Interaktionspartner von TRPC3. Hefezellen wurden mit TRPC3 (aa 742-848; *Bait*) und einer kardialen Maus cDNA Bibliothek (*Bib*) co-transfiziert. Die Zellen wuchsen auf einem Selektionsmedium um die Expression von jeweils *Bib* und *Bait* (+/+), *Bib* (+/-; Negativkontrolle), *Bait* (-/+; Negativkontrolle) oder weder *Bib* noch *Bait* (-/-) zu induzieren. Das Wachstum von Kolonien, die *Bib* und *Bait* exprimierten, zeigte eine direkte Protein-Protein-Interaktion (geändert nach (Bandleon et al., 2019)).

1.4. FKBP52

FKBPs sind Proteine, die zur Gruppe der Immunophiline gehören und Peptidyl-Prolyl Isomerase (PPIase) und Co-Chaperon Aktivität zeigen. So sind sie für die Immunsuppression, Ionenkanalregulation, die Proteinfaltung und den Proteintransport verantwortlich (Kang, Hong, Dhe-Paganon, & Yoon, 2008; Shim et al., 2009; Siekierka,

Hung, Poe, Lin, & Sigal, 1989; Siekierka et al., 1990). FKBP52 hat, auch bekannt als FKBP59, eine molekulare Masse von 52 kDa und kommt hauptsächlich im Cytosol und im Nucleus vor. In Säugetieren wurden bisher 18 unterschiedliche FKBP52 gefunden (Ghartey-Kwansah et al., 2018). Allen gemeinsam ist die cis/trans-Isomeraseaktivität, wodurch die Konformationsänderung von Peptidbindungen katalysiert wird. Die Immunsuppression, an der die FKBP52 ebenfalls beteiligt sind, wird durch die Interaktion von FKBP52 mit FK506 vermittelt und inhibiert dadurch Calcineurin (Abbildung 7) (Harding, Galat, Uehling, & Schreiber, 1989; Liu et al., 1991). Bereits bekannt ist die Bindung von FK506 an FKBP12 und die daraus resultierende Inhibition von Calcineurin, wodurch dessen Phosphataseaktivität gehemmt wird (Li, Rao, & Hogan, 2011).

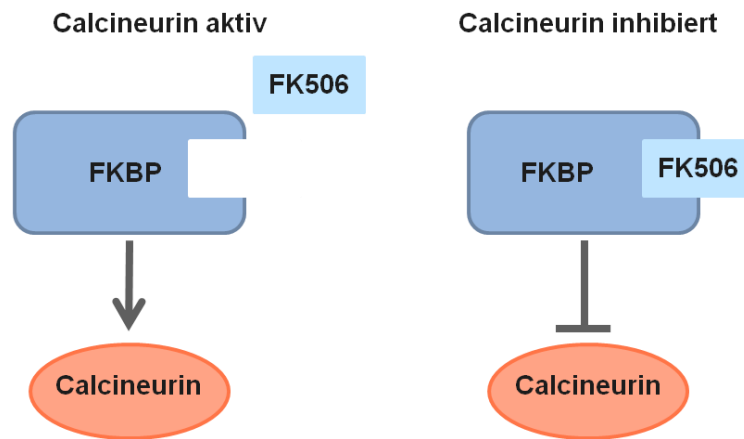


Abbildung 7: Die Bindung von FK506 (Tacrolimus) an FKBP52 inhibiert Calcineurin

Das Immunsuppressiva FK506 bindet im Komplex mit FKBP52 Calcineurin und inhibiert dessen Phosphataseaktivität.

FKBP52 wurde zuerst in einem Komplex mit dem Hitzeschockprotein (engl. heat shock protein 90, Hsp90) gefunden (Renoir, Radanyi, Faber, & Baulieu, 1990; Tai et al., 1986). Dieser Komplex, mit FKBP52 als Co-Chaperon und Hsp90, ist für die Aktivität von Glucocorticoid-Rezeptoren und für eine erhöhte Bindung von Hormonen an den Rezeptor verantwortlich (Davies & Sanchez, 2005).

Des Weiteren ist bekannt, dass FKBP52 an der Regulation von Ionenkanälen beteiligt sind. Sie erkennen XP-Peptidbindungen in ihren Zielproteinen. Ein Beispiel für eine Interaktion zwischen FKBP52 und Ionenkanälen ist die Regulation des RyR und des IP₃R durch FKBP12. FKBP12 ist für die normale Funktion des Kanals verantwortlich. In Abwesenheit des Immunophilins sind die Kanäle verstärkt für Ca²⁺ permeabel. Dies deutet darauf hin, dass FKBP12 den Kanal stabilisiert (Gaburjakova et al., 2001; MacMillan, 2013). Auch an der Regulation von TRP-Kanälen sind FKBP52 beteiligt. So ist zum Beispiel das *Drosophila*-Homolog von FKBP52, dFKBP59, direkt in die Regulation von TRPL-Kanälen involviert. Die

Expression von dFKBP59 führt zu einer Inhibition des durch TRPL-induzierten Ca^{2+} -Einstroms (Goel, Garcia, Estacion, & Schilling, 2001). Eine weitere Arbeitsgruppe zeigte ebenfalls eine Interaktion von TRPC-Kanälen mit verschiedenen FKBP5 (Kapitel 1.4.1).

FKBP52 (Abbildung 8) besteht aus einer katalytischen N-terminalen Domäne (FK1), in welcher die Region für die PPlase-Aktivität und die FK506-Binderegion zu finden ist. Es folgt eine zweite Domäne (FK2) ohne katalytische Aktivität. Diese beiden Domänen weisen strukturelle Gemeinsamkeiten mit FKBP12 auf, welches bis zum jetzigen Zeitpunkt besser untersucht ist als FKBP52 (Davies & Sanchez, 2005). An die FK2 Domäne schließt eine strukturelle Domäne mit drei Tetratricopeptid (TPR) Wiederholungen an. Darauf folgt eine Binderegion für Calmodulin am C-terminalen Ende (Davies & Sanchez, 2005; Erlejman, Lagadari, Harris, Cox, & Galigniana, 2014). Die FK1-Domäne und die TPR-Wiederholungen sind für die Regulation von Steroidrezeptoren verantwortlich, wobei die TPR-Region von FKBP52 die Interaktion mit Hsp90 vermittelt und die FK1-Domäne mit Hilfe der Isomeraseaktivität die Transaktivierung des Rezeptors verstärkt (Riggs et al., 2003; Sivils, Storer, Galigniana, & Cox, 2011).

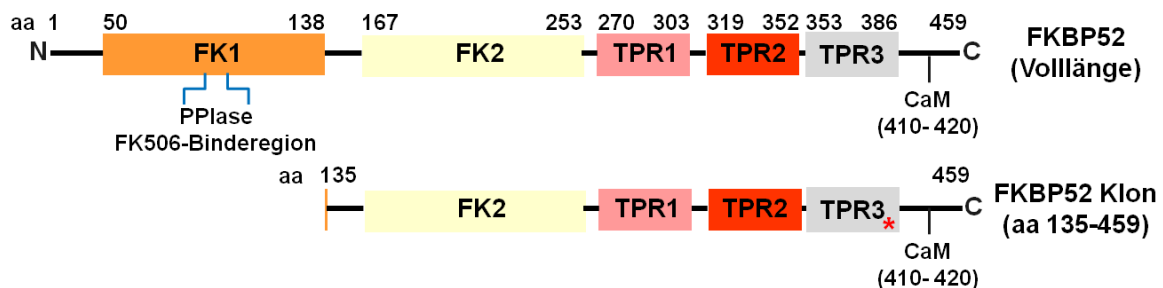


Abbildung 8: Struktur von FKBP52 (Volllänge) und von FKBP52 (aa 135-459), der Klon der über den Yeast Two-Hybrid Screen gefunden wurde

FKBP52 besteht aus einer N-terminalen katalytischen FKBP12-Domäne (FK1), die eine PPlase und eine FK506-Binderegion beinhaltet. An diese Region schließt sich eine zweite FKBP12-Domäne (FK2) und drei Tetratricopeptid (TPR) Wiederholungen an. Am C-terminalen Ende folgt eine Calmodulin (CaM)-Binderegion. Dem über den Yeast Two-Hybrid Screen ausgemachte Klon, FKBP52 (aa 135-459), fehlt bis auf drei Aminosäuren die FK1-Domäne. Die Punktmutation R358Q, die in dem Klon gefunden wurde, ist mit einem roten Stern gekennzeichnet (geändert nach (Bandleon et al., 2019)).

Der FKBP52 cDNA Klon, der bei dem Yeast Two-Hybrid Screen als Interaktionspartner von TRPC3 gefunden wurde (Abbildung 8), umfasst die FKBP52-Sequenz (Abbildung 9) von aa 135 bis aa 459. Diese Sequenz beinhaltet die FK2-Domäne (aa 167-253), die drei TPR-Domänen (aa 270-303, aa 319-352, aa 353-386) und den C-Terminus mit der Calmodulin-Binderegion. Die FK1-Domäne (aa 50-138) ist bis auf drei Aminosäuren (aa 135-138) nicht in der Sequenz vorhanden. Außerdem ist eine Punktmutation an der Stelle 1075

Einleitung

von Guanin nach Adenin (G1075) in der Sequenz des gefundenen FKBP52 Klons enthalten. Dies hat den Austausch der 358. Aminosäure in der TPR3-Region von Arginin zu Glutamin (R358Q) zur Folge (Bandleon et al., 2019).

```
mFKBP52 FKBP52 clone
Atgaccgcccaggagatgaaggcggcggagaaaggcggcagctggcgccccctgctctc 60
M T A E E M K A A E N G A Q S A P L P L 20
gaaggagtggacatcagcccaaacaggacgagggcgtgctcaaggtcatcaagagagag 120
E G V D I S P K Q D E G V L K V I K R E 40
ggtacaggcacagacacccatgatcggggaccgagctctttgtccactacactggctgg 180
G T G T E T P M I G D R V F V H Y T G W 60
ctgctagatggcacaaaagtttgactccagctctggaccgcaaggacaaaatctccctttgac 240
L L D G T K F D S S L D R K D K F S F D 80
ctgggaaaaaggggaggtcatcaaggcttgggatattgctgtggcaacctgaaaagtgagg 300
L G K G E V I K A W D I A V A T M K V G 100
gaagtgtgccacatcacctgcaagccagaataatgcctatggcgagcaggcagccctccg 360
E V C H I T C K P E Y A Y G A A G S P P 120
aagatcccccccaagccacacttgtatttgagtgagctgtttgagttcaaaaggagaa 420
K I P P N A T L V F E V E L F E F K G E 140
gatcttacagaagaagaagatggcgggatccatccgcagaatacggactcgggggtaagggc 480
D L T E E E D G G I I R R I R T R G E G 160
tatgccaggcccaatgatggtgctatggtggaagtgccctggaaggtaccacaaggac 540
Y A R P N D G A M V E V A L E G Y H K D 180
cgctctttgaccagcgggagctctgctttgaaagtcggggaaggggaaaagtctagatctg 600
R L F D Q R E L C F E V G E G E S L D L 200
ccctgtgggctggaggagccatcagcgcattggagaagggagagcattccatcgtgtac 660
P C G L E E A I Q R M E K G E H S I V Y 220
ctcaaacctagctatgcttttggcagtggtggggaaggagaggttccagatcccaccgac 720
L K P S Y A F G S V G K E R F Q I P P H 240
gctgagctgaggtatgaagtgcggctgaagagctttgagaaggccaaggagtcttgggag 780
A E L R Y E V R L K S F E K A K E S W E 260
atgagctccgcggagaagctggagcagagcaacatagtgaagagaggggaccgcgtac 840
M S S A E K L E Q S N I V K E R G T A Y 280
ttcaaggaaaggcaagtacaagcagcgttactgcagtacaagaagatcgtgtcttggcta 900
F K E G K Y K Q A L L Q Y K K I V S W L 300
gaatacaggtctagcttctccggtaggaaatgcaaaaggtccatgcactccgactggcc 960
E Y E S S F S G E E M Q K V H A L R L A 320
tcacacctcaatctggccatgtgtacctgaaactgcaggccttctcagctgccatcgaa 1020
S H L N L A M C H L K L Q A F S A A I E 340
agctgcaacaaggccttggagctggacagcaacaacgagaaggcctgtttcgccgggga 1080
agctgcaacaaggccttggagctggacagcaacaacgagaaggcctgtttcgccaggga 1080
S C N K A L E L D S N N E K G L F R R/Q G 360
gagggccacctggcctggaatgactttgacctggcaagagctgacttccaaaaggctcctg 1140
E A H L A V N D F D L A R A D F Q K V L 380
cagctctatcccagcaacaaggcggcaagaccagctggctgtgtgcccagcagcgacc 1200
Q L Y P S N K A A K T Q L A V C Q Q R T 400
cgtaggcagctcggccgggaaaaaagctctatgccaacatgtttgagaggctggctgag 1260
R R Q L A R E K K L Y A N M F E R L A E 420
gaggagcacaaggtgaaggcagaagtggcagcaggagacca tccccactgatgctgagatg 1320
G A E H K V K A E V A A G D H P T D A E M 440
aagggtagcgggaa caatgtggccgagaaccagctctcgggtggagacagaagcgtag 1377
K G E R N N V A E N Q S R V E T E A *
```

Abbildung 9: Sequenzalignment von Maus FKBP52 (mFKBP52) und von FKBP52 cDNA des Yeast Two-Hybrid Screens

In der ersten Zeile ist die Sequenz von mFKBP52, in der zweiten Zeile die Sequenz des FKBP52 cDNA Klons (FKBP52 (aa 135-459)) und darunter die entsprechenden Aminosäuren dargestellt. Die

unterstrichenen Sequenzen repräsentieren die verschiedenen Domänen von FKBP52. Die vorhandene Punktmutation des FKBP52 Klons ist rot markiert (Bandleon et al., 2019).

1.4.1. TRPCs und FKBP52

Wie in Kapitel 1.3.1.3 beschrieben besitzt der C-Terminus von TRPC-Kanälen eine hochkonservierte prolinreiche Sequenz. Diese Sequenz entspricht der Binderegion für dFKBP59 im Drosophila Ionenkanal TRPL, denn FKBP52 erkennen spezifische XP-Dipeptide in ihren Zielproteinen (Sinkins et al., 2004). Sinkins *et al.* stellten außerdem *in vivo* und *in vitro* fest, dass FKBP52 selektiv an TRPC1, 4 und 5 und FKBP12 selektiv an TRPC3, 6 und 7 binden. Eine konservierte LP-Dipeptidbindung in der prolinreichen Sequenz vermittelt die Bindung zwischen den Kanälen und den FKBP52. Die Vorversuche zu dieser Arbeit bestätigten diese Selektivität nicht. Im Yeast Two-Hybrid Screen konnte eine Bindung zwischen FKBP52 und TRPC3 gesehen werden (Bandleon et al., 2019). Die Interaktion zwischen dem TRPC-Kanal und dem Immunophilin kann durch FK506 gestört werden. Es scheint, dass andere Regionen der Proteine, außerhalb der LP-Dipeptidbindung, zusätzlich für die selektive Bindung der Immunophiline verantwortlich sein müssen (Sinkins et al., 2004). Der Effekt von FKBP52 auf TRPC-Kanäle ist bisher noch nicht hinreichend untersucht. Nachdem, wie bereits erwähnt, gezeigt wurde, dass dFKBP59 TRPL Kanäle inhibiert (Goel et al., 2001), kann davon ausgegangen werden, dass auch FKBP52 einen direkten Effekt auf die Aktivität und die nachgeschalteten Signalwege von TRPC-Kanälen hat. Es ist jedoch zu erwarten, dass der Effekt von FKBP52 auf TRPC-Kanäle komplexer ist, da FKBP52 ATP, GTP und Calmodulin binden kann. Außerdem kann FKBP52 die Bindung von anderen Proteinen, z.B. Homer1, an TRPC-Kanäle beeinflussen (Callebaut et al., 1992; Sinkins et al., 2004).

1.5. Ziel der Arbeit

In Vorarbeiten konnte FKBP52 als neuer direkter Interaktionspartner von TRPC3 ermittelt werden. Dabei wurde in TRPC3 eine neue Bindestelle für FKBP52 gefunden.

Das Ziel dieser Arbeit bestand daher aus der Verifizierung dieser Protein-Protein-Interaktion, sowie einer genaueren Untersuchung der FKBP52-Domänen in Hinblick auf die TRPC3-Bindung. Mit Hilfe von Co-IPs sollte die Interaktion zwischen TRPC3 und FKBP52 bestätigt werden. Anschließend wurde untersucht, welche Domänen von FKBP52 für die Wechselwirkung mit TRPC3 verantwortlich sind.

Im nächsten Schritt sollte die physiologische Relevanz dieser Interaktion herausgearbeitet werden. Hierbei sollen in Abhängigkeit von FKBP52 TRPC3-vermittelte kardiale Hypertrophie, Ca²⁺-abhängige Signalwege und Ca²⁺-Einstrom in die Zelle mitberücksichtigt

werden. Gleichzeitig wurde die TRPC3 Aktivität in Abhängigkeit von der FKBP52 Bindung untersucht.

2. MATERIALIEN

2.1. Chemikalien und Reagenzien

1,4-Dithiothreitol (DTT)	AppliChem GmbH, Darmstadt
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim
2-Propanol	VWR International GmbH, Darmstadt
2,3-Butandionmonoxim (BDM)	Sigma-Aldrich, Steinheim
2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]- Ethansulfonsäure (HEPES Pufferlösung)	Life technologies, Eugene, USA
2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]- Ethansulfonsäure (HEPES Pufferlösung)	Sigma-Aldrich, Steinheim
2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]- Ethansulfonsäure (HEPES Natriumsalz)	Sigma-Aldrich, Steinheim
4',6-Diamidino-2-Phenylindole (DAPI)	Life technologies, Eugene, USA
5-Bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-galactopyranoside	Sigma-Aldrich, Steinheim
5-Brom-2-desoxyuridin (BrdU)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Acrylamidmix: 30 % Acrylamide/Bis Solution 29:1	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Agarose	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Amersham ECL Western Blotting Analysis System	GE Healthcare, Buckinghamshire, UK
Ammoniumpersulfat (APS)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Ampicillin sodium salt	Sigma-Aldrich, Steinheim
Angiotensin II human	Sigma-Aldrich, Steinheim
Avicel® PH-101	Sigma-Aldrich, Steinheim
Blotting Grade Blocker	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Bovine Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Bromphenolblau	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Buprenorphin	Bayer AG, Leverkusen
Cäsiumchlorid (CsCl)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Cäsiumhydroxid (CsOH)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Cäsiummethansulfonat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Calciumchlorid Dihydrat ($\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Carbachol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Chloramphenicol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Cold Water Fish Skin Gelatin	AURION Immuno Gold Reagents & Accessories, Wageningen, NL
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	Merck KGaA, Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dulbecco's Modified Eagle's Medium - high glucose (DMEM)	Sigma-Aldrich, Steinheim
D-(+)-Glucose	Sigma-Aldrich, Steinheim
D-(+)-Glucose Monohydrat	Merck KGaA, Darmstadt
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe

<i>N,N,N,N</i> -tetraessigsäure (EGTA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ethanol ≥ 99,8 %	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Ethanol vergällt, ≥ 99,8 %	Sigma-Aldrich, Steinheim
Fetal Bovine Serum (FBS)	Life technologies, Eugene, USA
Fura-2, AM	VWR, Darmstadt
GelGreen™ in Wasser (10000x)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Glycerol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Glycine	Sigma-Aldrich, Steinheim
G418 Disulfatsalzlösung	Sigma-Aldrich, Steinheim
Hanks' balanced salt solution (HBSS)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Heparin	B. Braun Melsungen, Melsungen
holo-Transferrin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Immobilon Forte Western HRP substrate	Merck KGaA, Darmstadt
Insulin from bovine pancreas	Sigma-Aldrich, Steinheim
Isofluran	CP-Pharma-Handelsgesellschaft GmbH, Burgdorf
Isopropyl β-D-thiogalactoside	Sigma-Aldrich, Steinheim
Kaliumchlorid (KCl)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumhydrogencarbonat (KHCO ₃)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Kanamycin sulfate from <i>Streptomyces kanamyceticus</i>	Sigma-Aldrich, Steinheim
Kristallviolett	Sigma-Aldrich, Steinheim
Laminin (Maus, natürlich)	Corning, Kaiserslautern
LB Broth (Lennox)	Sigma-Aldrich, Steinheim
LB Broth mit Agar (Lennox)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Leica Microsystems™ Immersion Type G	Leica Microsystems, Wetzlar
L-Glutamine Solution 200 mM	Sigma-Aldrich, München
Lipofectamine® RNAiMAX	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Magnesiumchlorid Hexahydrat (MgCl ₂ x 6 H ₂ O)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Magnesiumsulfat Heptahydrat (MgSO ₄ x 7 H ₂ O)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Medium 199	Sigma-Aldrich, Steinheim
Methanol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Minimum Essential Medium Eagle (MEM)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumdodecylsulfat (SDS) Pellets	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	VWR International GmbH, Darmstadt
Natriumhydroxid – Lösung (2 mol/l) (NaOH)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Natriumselenit	Sigma-Aldrich, Steinheim
N-Methyl-D-glucamin (NMDG)	Sigma-Aldrich, Steinheim
N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine (TEMED)	Sigma-Aldrich, Steinheim
1-Oleoyl-2-acetyl- <i>sn</i> -glycerol (OAG)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Opti-MEM I Reduced Serum Medium	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Paraformaldehyde (PFA) 32 %	Science Services, Munich
Penicillin-Streptomycin (10000 U/ml Penicillin/ 10 mg/ml Streptomycin) (P/S)	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach

Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25/24/1)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Phenolrot Natriumsalz	Sigma-Aldrich, Steinheim
Phosphatase Inhibitor Cocktail Set II	Merck KGaA, Darmstadt
Phosphatase Inhibitor Cocktail Set IV	Merck KGaA, Darmstadt
Poly-D-Lysin Hydrobromid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ponceau S solution	Sigma-Aldrich, Steinheim
Probenecid	Life technologies, Eugene, USA
Protease Inhibitor Cocktail tablets (cOmplete Mini)	Roche, Mannheim
Protein A-Agarosebeads	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Protein Assay Farbstoff-Konzentrat	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Proteinstandard (Albumin von Rinderserum)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Re-Blot Plus Strong Solution (10 x)	Merck KGaA, Darmstadt
Ribonuklease (RNase) Inhibitor 20U/µl	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
(R)-(-)-Phenylephrin hydrochlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Salzsäure (2 mol/l) (HCl)	Merck KGaA, Darmstadt
Set: dATP, dCTP, dGTP, dTTP	Promega GmbH, Mannheim
siRNA Buffer (5 x)	GE Healthcare, Buckinghamshire, UK
S.O.C. Medium	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Taurine	Merck KGaA, Darmstadt
Tris	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Triton X-100	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
TRPC3 Channel Inhibitor, Pyrazol 3 (Pyr3)	Merck KGaA, Darmstadt
Trypsin/EDTA Lösung	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach
Trypanblau Lösung 0,40 %	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Tween® 20	Sigma-Aldrich, Steinheim
Vectashield Hard + Set Mounting Medium	Vector Laboratories, Burlingame
Vitamin B12	Sigma-Aldrich, München
Wasser für Injektionszwecke	B. Braun Melsungen, Melsungen
X-treme GENE™ HP DNA Transfection Reagent	Merck KGaA, Darmstadt
Xylencyanol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
(-)-Blebbistatin	Sigma-Aldrich, Steinheim

2.2. Geräte

Analysewaage ALJ-A	Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommern
Automatischer Zellzähler TC20™	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Axopatch 200B amplifier	Molecular Devices GmbH, Biberach an der Riß
BioDocAnalyze	Biometra GmbH, Göttingen
Biologische Sicherheitswerkbank Safe2020	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
CFX96 Touch™ Real-Time PCR	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
CO ₂ Inkubator HERA Cell 240i	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
CO ₂ Inkubator HERA Cell 150i	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
ChemiDoc™ Touch Imaging System Detection System	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Digidata-1440A Digitizer	Molecular Devices GmbH, Biberach an der Riß
Easycell Basic Cardiomyocyte Isolation System (umgebaut)	Hugo Sachs Elektronik- Harvard Apparatus GmbH, March

ECOMAX X-Ray Film Processor	PROTEC GmbH & Co. KG, Oberstenfeld
Eismaschine ZBE 30-10	Ziegra Eismaschinen GmbH, Isernhagen
Fluovac Anesthetic Mask, size 2	Hugo Sachs Elektronik – Harvard Apparatus GmbH, March
Gelsystem Mini S Peqlab	VWR International GmbH, Darmstadt
Gelsystem Mini M Peqlab	VWR International GmbH, Darmstadt
Harvard Apparatus Isoflurane Key-Fill Vaporizer	Hugo Sachs Elektronik – Harvard Apparatus GmbH March
Homogenisator, Precellys® 24	Bertin Technologies SAS, Montigny-le-Bretonneux, Frankreich
IMS Fluosorber Fliter Canister	Hugo Sachs Elektronik – Harvard Apparatus GmbH March
Magnetrührer mit Glaskeramik Heizplatte Sunlab SU1350	Sustainable Lab Instruments, Mannheim
Mehrkanalpipette Transferpette® S-8 20-200 µl	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim
Microplate reader Sunrise™	Tecan Austria GmbH, Gröding, AT
Microprocessor pH-Meter pH537	Xylem Analytics Germany Sales GmbH & Co. KG, Weilheim
Mikroskop DMi1	Leica Microsystems, Wetzlar
Mikroskop DMi8	Leica Microsystems, Wetzlar
Mikroskop Axiovert 135	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Mikroskop Axiovert 200	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Mikropipetten-Puller P-1000	Sutter Instruments, Novato, USA
Mikrowelle MS23F301EAS	Samsung, Yateley, UK
Mini-PROTEAN® Tetra Handcast Systems	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Mini-Rotator RS24	A. Hartenstein GmbH, Würzburg
Mini Trans-Blot® Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Mini Zentrifuge Sprout®	Heathrow Scientific, Vernon Hills, USA
Mini Zentrifuge FV-2400 Micro-Spin	Biosan, Riga, LV
Multitron Standard	Infors AG, Bottmingen
Myocyte and Contractility System	IonOptix Limited, Dublin, IRL
NanoDrop™ 2000C Spektralphotometer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Nitrous Oxide Flowmeter, 0.2 to 2.0 l/min for Small Anesthesia Bracket	Hugo Sachs Elektronik – Harvard Apparatus GmbH March
Oligochrome Lichtquelle	TILL Photonics GmbH, Gräfeling
Orbi-Blotter™ BT30	Benchmark Scientific, Inc., Edison, USA
PIPETBOY acu 2	INTEGRA Biosciences AG, Hudson, USA
Pipetten Research® Plus (0,5-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl, 1000-5000 µl)	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettierhelfer accu-jet® pro	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim
PowerPac™ Basic Power Supply	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Präzisionswaage PLJ	Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommern
SDS-PAGE Gelkammer Mini-PROTEAN Tetra Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Shaker DRS-12	neoLab Migge GmbH, Heidelberg
Small Anesthesia Bracket for 1 to 2 gases	Hugo Sachs Elektronik – Harvard Apparatus GmbH, March

Thermal Cycler T100™	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Thermal Cycler C1000 Touch™	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Thermomixer® C	Eppendorf AG, Hamburg
Tissue Lyser II	Qiagen N.V. Hilden
Ultraschall-Homogenisator mini20	Bandelin electronic GmbH & Co. KG Berlin
UV-Strahler N90-M	Benda Laborgeräte und Ultravioletstrahler, Wiesloch
Veterinärnästhesie-Induktionskammer	Hugo Sachs Elektronik – Harvard Apparatus GmbH, March
Vortexer MS1, mini	IKA®-Werke GmbH & CO. KG, Staufen
Vortexer MS3, basic	IKA®-Werke GmbH & CO. KG, Staufen
Vortexer RS-VA-10	Phoenix Instrument GmbH, Garbsen
Wasserbad alpha	Lauda Dr. R. Wobser GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen
Wasserbad WNE14	Memmert GmbH und Co. KG, Schwabach
Zentrifuge, Mikro 220R	Andreas Hettich GmbH & Co. KG. Tuttlingen
Zentrifuge Mikro 200	Andreas Hettich GmbH & Co. KG. Tuttlingen
Zentrifuge Rotina 380R	Andreas Hettich GmbH & Co. KG. Tuttlingen

2.3. Enzyme

Polymerasen

- DyNAzyme™ EXT DNA Polymerase 1 U/μl (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)
- Phusion DNA Polymerase 2 U/μl (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)

Restriktionsenzyme

Alle Restriktionsenzyme und die zugehörigen Puffer wurden über New England Biolabs GmbH (NEB), Frankfurt bezogen.

Sonstige Enzyme

- Calf Intestinal Alkaline Phosphatase (CIAP) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)
- Desoxyribonuklease (DNase) I from Bovine Pancreas (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- Gateway® LR Clonase™ II Enzym Mix (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)
- Liberase (Roche, Mannheim)
- Porcine Trypsin (1:250) (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- RNase-Free DNase Set (Qiagen GmbH, Hilden)
- T4 DNA Ligase (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)

2.4. Größenstandards

Proteine

- Precision Plus Protein Dual Color Standard (Bio-Rad Laboratories GmbH, München)

DNA

- GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder, ready-to-use (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)
- GeneRuler 1 kb DNA Ladder, ready-to-use (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)

2.5. Kits

- High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)
- Hi Yield® Gel/PCR DNA Fragment Extraction Kit (Süd-Laborbedarf GmbH, Gauting)
- NucleoBond® Xtra Midi Plus (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren)
- pAd/CMV/V5-Dest™ Gateway® Vector (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)
- PCR Mycoplasma Test Kit (AppliChem GmbH, Darmstadt)
- pENTR™ 3C Dual Selection Vector (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)
- Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)
- QIAprep® Spin Miniprep Kit (Qiagen GmbH, Hilden)
- QIAquick® PCR Purification Kit (Qiagen GmbH, Hilden)
- QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent, Santa Clara, USA)
- RNeasy® Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden)
- TaqMan™ Fast Universal PCR Master Mix (2 x) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)
- TaqMan™ Gene Expression Assays: Targets: NPPA, RCAN, Rpl13 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)

2.6. Medien

Medium für menschliche embryonale Nierenzellen (engl. human embryonic kidney cells, HEK 293 und HEK 293A Zellen)

- DMEM (10 % FBS): Medium zum Kultivieren der HEK 293 und HEK 293A Zellen
DMEM mit 10 % FBS, 1 % P/S
- DMEM (2 % FBS): Medium für Transduktion der HEK 293A Zellen
DMEM mit 2 % FBS, 1 % P/S

- DMEM (5 % FBS): Plaquemedium für Virentiter
DMEM mit 5 % FBS, 2 % P/S
- Immobilisierungsmedium (Avicel (2,4 %) in Plaquemedium (1/3 v/v))

Medium für T3.9

- DMEM (10 % FBS/G418): Medium zum Kultivieren der T3.9 Zellen
DMEM mit 10 % FBS, 1 % P/S, 0,5 mg/ml G418

Medium für neonatale Rattenkardiomyozyten (engl. neonatal rat cardiomyocytes, NRCs)

- MEM 0: 10,8 g/l MEM, 1 % P/S, 1,267 µM Vitamin B12, 4,2 mM NaHCO₃, 2 mM L-Glutamin
- MEM 0 mit BrdU: MEM 0 mit 0,1 mM BrdU
- MEM 1 mit BrdU: MEM 0 mit 1 % FBS und 0,1 mM BrdU
- MEM 5 (mit BrdU): MEM 0 mit 5 % FBS (und 0,1 mM BrdU)

Medium für adulte Rattenkardiomyozyten (engl. adult rat cardiomyocytes, ARCs)

- Platingmedium: M199, 5 % FBS, 0,5 % P/S, 870 nM Insulin, 65 nM Transferrin, 29 nM Natriumselenit, 10 mM BDM
- Kulturmedium: M199, 0,5 % P/S, 870 nM Insulin, 65 nM Transferrin, 29 nM Natriumselenit, 25 µM (-)-Blebbistatin

2.7. Puffer und Lösungen

1,4-Dithiothreitol (DTT)-Stocklösung

1 M: 1,54 g DTT in 10 ml dH₂O

5-Brom-2-desoxyuridin (BrdU)

20 mM: 1 g BrdU in 162 ml dH₂O

Agarosegel Ladepuffer

0,25 % Bromphenolblau, 0,25 % Xylencyanol, 30 % Glycerol in dH₂O

Amoniumpersulfat (APS)-Stocklösung

10 %: 0,1 g APS in 1 ml dH₂O

Ampicillin-Stocklösung

100 mg/ml: 0,1 g in 1 ml dH₂O

Angiotensin II (Ang II)-Stocklösung

10 mM: 1 mg Ang II in 100 µl dH₂O

Avicel-Stocklösung

1,2 %: 1,2 g Avicel in 100 ml dH₂O

Blockinglösung für Immunzytochemie

1 % BSA, 0,1 % cold water fish skin gelatine, 1 % Tween-20 in PBS

Blockinglösung für Western Blot

5 % Blotting Grade Blocker in TBS-T

Ca²⁺- und Bicarbonat freies Hanks mit HEPES (CBFHH)

136,89 mM NaCl, 5,36 mM KCl, 0,81 mM MgSO₄ + 7 H₂O, 5,55 mM Dextrose, 0,44 mM KH₂PO₄, 0,34 mM Na₂HPO₄, 20,01 mM HEPES, pH 7,4

CBFHH + P/S

1 % P/S in CBFHH: 1 ml P/S in 100 ml CBFHH

Chloramphenicol-Stocklösung

100 mg/ml: 100 mg Chloramphenicol in 1 ml dH₂O

Desoxyribonuklease (DNase)-Stocklösung

2 mg/ml: 40 mg DNase in 20 ml NaCl

Enzymlösung für Isolation NRCs

12,5 mg Trypsin pro Rattenbaby + 2 ml DNase (2 mg/ml in NaCl) in 250 ml CBFHH

Extrazellulärlösung (Patch-Clamp)

140 mM NaCl, 10 mM HEPES, 5 mM EGTA, 10 mM Glucose, 2 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂, pH 7,4 mit NMDG

Fura-2 AM-Stocklösung

1 mM: 50 µg Fura-2 AM in 50 µl DMSO

Kanamycin-Stocklösung

100 mg/ml: 100 mg in 1 ml dH₂O

Kristallviolett für Virentiter

1 % Kristallviolett in 20 % Ethanol in dH₂O

Lysepuffer für Gesamtprotein

150 mM NaCl, 50 mM Tris pH 7,4, 1 % Triton X-100, 5 mM DTT, 1 x Proteaseinhibitorcocktail, 1x Phosphataseinhibitorcocktail II, 1 x Phosphataseinhibitorcocktail IV

Lysepuffer für Proteinfractionierung (zytosolische Proteine und Membranproteine)

1 % Triton X-100, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, 1x Proteaseinhibitorcocktail, 1x Phosphataseinhibitorcocktail II, 1 x Phosphataseinhibitorcocktail IV, 10 % Glycerol, 10 mM Tris HCl pH 7,4

Perfusionspuffer für Isolation ARCs

113,01 mM NaCl, 4,69 mM KCl, 0,6 mM KH_2PO_4 , 0,6 mM Na_2HPO_4 , 1,22 mM $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$, 0,032 mM Phenolrot, 12,02 mM NaHCO_3 , 10 mM KHCO_3 , 10 mM HEPES Pufferlösung, 5,5 mM Glucose, 30 mM Taurine, 10 mM BDM

Permeabilisierungslösung für Immunzytochemie

0,5 % Triton X-100 in PBS

Phenylephrin (PE)-Stocklösung

10 mM: 0,02 g Phenylephrin in 10 ml dH_2O

Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS)

137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4 , 1,8 mM KH_2PO_4

Pipettenlösung (Patch-Clamp)

120 mM Cäsiummethansulfonat, 20 mM CsCl, 15 mM HEPES, 5 mM MgCl_2 , 3 mM EGTA, auf pH 7,3 mit CsOH

Probenecid-Stocklösung

250 mM: 77 g Probenecid in 1 ml HBSS

SDS-Ladepuffer (5x)

312,5 mM Tris pH 7,0 + 50 % Glycerol + 10 % SDS + 0,5 M DTT + 0,1 % Bromphenolblau

SDS-Laufpuffer

25 mM Tris, 192 mM Glycine, 0,1 % SDS

SDS-Lysepuffer für Proteinfractionierung (intaktes Zytoskelett, Adhäsionsproteine und unlösliches Kernmaterial)

4 % SDS, 20 % Glycerol, 125 mM Tris pH 6,8

Stopppuffer I

Perfusionspuffer + 10 % FBS, 12,5 μM CaCl_2

Stopppuffer II

Perfusionspuffer + 5 % FBS, 12,5 μ M CaCl₂

TBS-T

20 mM Tris, pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,1 % Tween 20

Transferpuffer

25 mM Tris, 192 mM Glycine, 20 % Methanol

TRIS-EDTA-Puffer (TE-Puffer)

10 mM Tris pH 8,0, 1 mM EDTA

TRIS-Borat-EDTA-Puffer (TBE-Puffer)

89 mM Tris, 89 mM Borsäure, 2 mM EDTA

Tyrode für Ca²⁺-Messungen

- Ca²⁺-freie Normaltyrode: 140 mM NaCl, 4 mM KCl, 1 mM MgCl₂ + 7 H₂O, 5 mM Hepes, 10 mM Glucose 10; pH 7,4
- Ca²⁺-Tyrode: Normaltyrode + 2 mM CaCl₂
- Tyrode zum Beladen der Zellen: Ca²⁺ freie Normaltyrode + 2 μ M Fura 2-AM + 0,5 mM Probenecid

Verdaupuffer

Perfusionspuffer + 0,072 mg/ml Liberase

Vitamin B12-Stocklösung

2 mg/ml: 50 mg Vitamin B12 in 25 ml dH₂O

2.8. Verbrauchsmaterialien

Biosphere® Filter Tips (10 μ l, 100 μ l 1000 μ l)

Cell Counting Slides; Dual Chamber

Cryotubes; 1,8 ml

Deckgläser Square #1 (25 x 25)

Deckgläser (24 x 24)

Flow Bottle Top Filter

Gel-Loadertips (1-200 μ l)

Gewebekulturschalen, Nuncleon™ Delta Surface
(100 x 17 mm, 150 x 18 mm)

ImmEdge-Pen

Immobilon®-P Transfermembran, PVDF, 0,45 μ M

Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht

Bio-Rad Laboratories GmbH, München

Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

Corning, Kaiserslautern

Paul Marienfeld GmbH & Co. KG,

Lauda-Königshofen, GER

Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

A. Hartenstein GmbH, Würzburg

Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

LINARIS Biologische Produkte GmbH,

Dossenheim

Merck KGaA, Darmstadt

Microseal® 'B' Adhesive Seals	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Mini Trans-Blot® Filterpapier	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Multiplate™ Low-Profile 96-Well Unskirted PCR Plates	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Objektträger Superfrost	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Pasteurpipetten aus Glas 150 mm	A. Hartenstein GmbH, Würzburg
Pasteurpipetten, Polyethylen, 3 ml	A. Hartenstein GmbH, Würzburg
Patch-Pipetten, dünne Wand, Borsilikatglas mit Filament	Harvard Apparatus GmbH, March
PCR soft Tubes (0,2 ml)	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
Pipettenspitzen (200 µl, 1000 µl)	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
Pipettenspitzen (10 µl, 5000 µl)	Eppendorf AG, Hamburg
Phase Lock Gel Heavy Reaktionsgefäße (1,5 ml)	5 Prime GmbH, Hamburg
Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2 ml)	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
Reaktionsgefäße, round-bottom, (14 ml)	Corning, Kaiserslautern
Reaktionsgefäße (15 ml, 50 ml)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Serologische Pipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Serologische Pipetten mit weiter Spitze (10 ml)	A. Hartenstein GmbH, Würzburg
Tissue homogenizing CKMix (2 ml Gefäße)	Bertin Technologies SAS, Montigny-le-Bretonneux, Frankreich
Zellkulturflaschen, 75 cm ²	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Zellkulturplatten, 6-well, Collagen Typ I	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Zellkulturplatten, 96-well	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Zellkulturschale (60 x 15 mm)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Zellschaber, 16 cm	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
Zellsiebe, 70 µm	Corning, Kaiserslautern

2.9. Primer

Alle Primer, die in dieser Arbeit verwendet wurden (Tabelle 3), wurden von Eurofins Scientific (Ebersberg) synthetisiert. Die Stocklösungen von 100 pmol/µl wurden nach dem mitgelieferten Datenblatt von Eurofins hergestellt.

Tabelle 3: Primer für Polymerase-Kettenreaktion (engl. polymerase chain reaction, PCR)

Gen		Sequenz (5' → 3')	Anmerkung
FKBP52 (aa 1-138)	fw	AAAAGAATTCATGTACCCATACGATGTT CCAGATTACGCTACCGCCGAGGAGATG	Klonierung in pcDNA3.1
	rv	AAAACTCGAGTCATTTGAACTCAAACAG CTCCACCTC	
FKBP52 (aa 139-253)	fw	AAAAGAATTCGGATCCGGAGAAGATCT TACAGAAGATGG	Klonierung in pcDNA3.1
	rv	AAAACTCGAGTCACTCAAAGCTCTTCAG CC	
FKBP52 (aa 230-303)	fw	AAAAGAATTCGGATCCGTGGGAAGGA GAGG	Klonierung in pcDNA3.1
	rv	AAAACTCGAGTCACTCGTATTCTAGCC	

FKBP52 (aa 280-352)	fw	AAAAAGAATTCGGATCCTACTTCAAGGAA GGCAAG	Klonierung in pcDNA3.1
	rv	AAAAACTCGAGTCAGTTGTTGCTGTCCA GCTC	
FKBP52 (aa 352-459)	fw	AAAAAGAATTCGGATCCAACGAGAAGGG CCTGTTTCGC	Klonierung in pcDNA3.1
	rv	AAAAACTCGAGCTACGCTTCTGTCTCCA CCCGAG	
FKBP52 (aa 280-352)	fw	AAAAAGTCGACATGTACCCATACGATGTT CCAGATTACGCTTACTTCAAGGAAGGCA AG	Klonierung in pENTR 3C (Adenovirus)
	rv	AAAAAGCGGCCGCTCAGTTGTTGCTGTC CAGCTCCAAGGC	
FKBP52 (aa 352-459)	fw	GCCTGTTTCGCCGGGAGAGGCCCA	für Quick Change II Site-Directed Mutagenesis Kit
	rv	TGGGCCTCTCCCCGGCGAAACAGGC	

2.10. Plasmide

In der folgenden Tabelle (Tabelle 4) sind die in dieser Arbeit verwendeten und hergestellten Plasmide zusammengefasst. Die Plasmide FKBP52 (aa 1-138, 139-253, 230-303, 280-352, 352-459mut, 352-459wt)-pcDNA3.1+Zeo 3 Hämagglutinin (HA) wurden im Rahmen dieser Arbeit generiert. FKBP52 (aa 135-459)-pcDNA3.1+Zeo 3 HA wurde von Petra Eder-Negrin hergestellt. Jeffery Molkentin (Cincinnati Children's Hospital Medical Center, USA) stellte freundlicherweise human-TRPC3-pcDNA3.1 und Klaus Groschner (Medizinische Universität Graz, Österreich) human-TRPC3-pEYFP-C1 (Lichtenegger et al., 2013) bereit. Maus FKBP52 Volllänge-pCMV-SPORT6 wurde über Open Biosystems (Huntsville, USA) bezogen. Desweiteren stellte Oliver Ritter (Medizinische Hochschule Brandenburg) (Olivares-Florez et al., 2018) human-Calcineurin A-pEGFP-C1 freundlicherweise zur Verfügung.

Das Plasmid in Tabelle 5 wurde generiert, um damit im Anschluss einen Adenovirus herzustellen. Der dafür benötigte Vektor (pENTR 3C) wurde von Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA) bezogen.

Tabelle 4: Plasmide für die Transfektion der HEK 293 Zellen

Gen	Vektor	Tag	Resistenz
Maus FKBP52 Volllänge	pCMV-SPORT6	--	Ampicillin
FKBP52 (aa 135-459)	pcDNA3.1+Zeo 3 HAa	HA	Ampicillin
FKBP52 (aa 1-138)	pcDNA3.1+Zeo 3 HAa	HA	Ampicillin
FKBP52 (aa 139-253)	pcDNA3.1+Zeo 3 HAa	HA	Ampicillin
FKBP52 (aa 230-303)	pcDNA3.1+Zeo 3 HAa	HA	Ampicillin
FKBP52 (aa 280-352)	pcDNA3.1+Zeo 3 HAa	HA	Ampicillin
FKBP52 (aa 352-459)mut	pcDNA3.1+Zeo 3 HAa	HA	Ampicillin

FKBP52 (aa 352-459)wt	pcDNA3.1+Zeo 3 HAa	HA	Ampicillin
human-TRPC3	pEYFP-C1	EYFP	Kanamycin
human-TRPC3	pcDNA3.1	--	Ampicillin
human-Calciuenerin A	pEGFP-C1	EGFP	Kanamycin

Tabelle 5: Generierte Plasmide für die Herstellung von Adenoviren

Gen	Vektor	Tag	Resistenz
FKBP52 (aa 280-352)	pENTR 3C	HA	Kanamycin

2.11. Adenoviren

Im Folgenden sind die Adenoviren aufgelistet, die in dieser Arbeit verwendet wurden, um NRCs und ARCs zu transduzieren. Adenoviren, die für N-terminal HA markiertes FKBP52 (aa 280-352) codieren, wurden im Rahmen dieser Arbeit kloniert. N-terminal HA markiertes FKBP52 (aa 135-459) wurde in der Arbeitsgruppe Eder-Negrin hergestellt. Weiterhin wurden die Adenoviren für human NFATc1-GFP und Maus TRPC6, sowie die β -Galactosidase (β gal) von Seven Hills Bioreagents (Cincinnati, USA) gekauft.

2.12. Zelllinien

- HEK 293 (American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, USA)
- HEK 293A (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)
- T3.9: stabile TRPC3 Zelllinie (Kollaboration mit der Medizinische Universität Graz, Österreich (Poteser et al., 2006))

2.13. Versuchstiere

- Wildtypmäuse (FVB/N) für Gesamtproteinlysate (eigene Zucht, Zentrum für Experimentelle Molekulare Medizin, Julius-Maximilians-Universität Würzburg)
- Wistar Ratten für Versuche mit ARCs (Charles River Wiga GmbH, Sulzfeld)
- Trächtige Wistar Ratten für Versuche mit NRCs (Charles River Wiga GmbH, Sulzfeld)

2.14. Bakterien

- Subcloning Efficiency™ DH5 α Competent Cells (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)
- MAX Efficiency™ DH5 α Competent Cells (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)

2.15. siRNA

- ON-TARGETplus SMARTpool Rat FKBP4 siRNA (Dharmacon, Lafayette, USA)
- ON-TARGETplus Non-targeting Control Pool (Dharmacon, Lafayette, USA)

2.16. Antikörper

In Tabelle 6 sind die in dieser Arbeit verwendeten Primärantikörper mit Wirt, molekularer Masse des Proteins, der eingesetzten Verdünnung, der in dieser Arbeit eingesetzten Anwendung und dem Hersteller zusammengefasst.

Tabelle 6: Primärantikörper

Protein	Wirt	Molekulare Masse [kDa]	Verdünnung	Anwendung	Hersteller
α-Actinin	Maus	--	1:200	Immunfluoreszenz	Sigma-Aldrich, München
Calcineurin A	Kaninchen	59	1:1000	Western Blot	Abcam, Cambridge, UK
FKBP12	Kaninchen	12	1:1000	Western Blot	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
FKBP52	Kaninchen	52	1:1000	Western Blot	Abcam, Cambridge, UK
FKBP52	Ziege	52	1:1000	Western Blot /Immunpräzipitation	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
GAPDH	Maus	37	1:1000	Western Blot	Merck KGaA, Darmstadt
YFP	Kaninchen	27	1:1000	Western Blot /Immunpräzipitation	Abcam, Cambridge, UK
HA	Maus	--	1:500	Western Blot /Immunpräzipitation	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
HA	Kaninchen	--	1:1000	Western Blot	Cell Signaling Technology, Cambridge, UK
HDAC4	Kaninchen	119/130	1:1000	Western Blot	Abcam, Cambridge, UK
Homer1	Kaninchen	40	1:1000	Western Blot	Abcam, Cambridge, UK
Lamin A/C	Kaninchen	28/ 70	1:1000	Western Blot	Cell Signaling Technology, Cambridge, UK
NFATc3	Kaninchen	130 / 190	1:1000	Western Blot	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg

TRPC3	Kaninchen	100	1:1000	Western Blot	Abcam, Cambridge, UK
TRPC3	Kaninchen	100	1:1000	Western Blot	custom-made; (Poteser et al., 2006)

In der folgenden Tabelle 7 sind die in dieser Arbeit verwendeten Sekundärantikörper mit Verdünnung, Anwendung in dieser Arbeit und dem Hersteller zusammengefasst. Antikörper, die für Western Blot verwendet wurden, sind mit Meerrettichperoxidase (engl. horseradish peroxidase, HRP) gekoppelt und erlauben eine Detektion der Membran mit Hilfe von Chemilumineszenz (ECL). Antikörper für Immunfluoreszenz sind mit einem Alexa Fluor®568 Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt, um die Zellen nach Anregung mit der Wellenlänge 568 nm mit dem Fluoreszenzmikroskop betrachten zu können.

Tabelle 7: Sekundärantikörper

Name	Verdünnung	Anwendung	Hersteller
Mouse IgG HRP Linked Whole Ab	1:3000	Western Blot	GE Healthcare, München
Rabbit IgG HRP Linked Whole Ab	1:3000	Western Blot	GE Healthcare, München
donkey anti-goat IgG-HRP	1:3000	Western Blot	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
goat anti-Mouse IgG Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 568	1:400	Immunfluoreszenz	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

Für die Co-IPs wurden zur Kontrolle und für das sogenannte Pre-Clearing folgende Immunglobuline G (IgGs) verwendet:

- normal Maus IgG-B (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg)
- normal Kaninchen IgG-B (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg)

2.17. Software und Datenbanken

- Adobe Photoshop Elements 10 (Adobe, San José, USA)
- Axio Vision Rel. 4.5 (Carl Zeiss AG, Oberkochen)
- BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>; letzter Zugriff: 04.09.2019)
- CFX Manager (Bio-Rad Laboratories GmbH, München)
- Clampex 11.0 (Molecular Devices GmbH, Biberach an der Riß)
- ImageJ (Wayne Rasband, National Institute of Health, USA)
- IonWizard 6.3 (IonOptixLimited, Dublin, IRE)
- LAS X (Leica Microsystems, Wetzlar)

- Magellan 7.2 SP1 (Tecan Austria GmbH, Gröding, AT)
- Microsoft Office 2010 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA)
- SigmaPlot 14.0 (Systat Software GmbH, Erkrath)

3. METHODEN

3.1. Molekularbiologische Methoden

FKBP52 cDNA Fragmente, die für aa 1-138; 139-253; 230-303; 280-352 und 352-459 codieren, wurden mit Polymerase-Kettenreaktion (engl. polymerase chain reaction, PCR) amplifiziert und in pcDNA3.1 Vektoren mit Hämagglutinin (HA)-Tag kloniert. Die cDNA von Maus FKBP52 diente dabei als Template. Diese Konstrukte wurden verwendet, um HEK 293 Zellen zu transfizieren. Um NRCs und adulte Rattenkardiomyozyten (engl. adult rat cardiomyocytes, ARCs) zu transduzieren, wurden Adenoviren hergestellt. Dazu wurde das FKBP52 cDNA Fragment FKBP52 (aa 280-352) zuerst in einen pENTR3C Vektor kloniert. Dieser Vektor ist ein Gateway® Entry Vektor. Durch eine LR-Rekombination zwischen diesem Vektor und einem Gateway® Destination Vektor (pAd/CMV/V5-Dest™) entstand ein Expressionsklon aus welchem, nach Pac I Verdau und Transduktion von HEK 293A Zellen, der eigentliche Virus hervorging.

3.1.1. Polymerase-Kettenreaktion

Für die PCR wurden die benötigten Komponenten nach folgendem Ansatz (Tabelle 8) in 0,2 ml Reaktionsgefäße pipettiert.

Tabelle 8: Pipettierschema einer PCR-Reaktion

Komponenten	Volumen
DNA	5 ng
PCR-Puffer (10 x)	5 µl
Polymerase	1 U
3'-Primer (10 µM)	1 µl
5'-Primer (10 µM)	1 µl
dNTPs (10 mM)	2 µl
dH ₂ O	auf 50 µl auffüllen

Die Ansätze wurden gemischt, abzentrifugiert und nach folgendem PCR-Programm (Tabelle 9) in einem Thermocycler inkubiert.

Tabelle 9: Temperaturprogramm einer PCR-Reaktion

Zeit	Temperatur [°C]
2 min	94
30 s	94
30 s	Primer abhängig
Primer abhängig	72
10 min	72
∞	4

} 30 x

Nach der PCR-Reaktion wurden die Proben mit Hilfe des QIAquick PCR Purification Kits nach Angaben des Herstellers aufgereinigt. Die DNA wurde in 40 µl dH₂O eluiert und bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert. Anschließend wurde die Größe des entstandenen PCR-Produkts mit Hilfe eines Agarosegels (Kapitel 3.1.2) überprüft.

3.1.2. Agarosegel

Nach der Aufreinigung der Proben wurden diese mit Ladepuffer versetzt und auf ein 1-2 % TBE-Agarosegel, welches GelGreen enthielt, aufgetragen. Wenn es für weitere Schritte nötig war, wurde das entsprechende Produkt mit dem Hi Yield® Gel/PCR DNA Fragment Extraction Kit nach Angaben des Herstellers aus dem Gel extrahiert und aufgereinigt. Die DNA wurde in 30 µl Elution Buffer eluiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

3.1.3. Restriktionsverdau

Um bestimmte PCR-Fragmente in einen Vektor einfügen zu können, mussten diese zuerst mit den gleichen Restriktionsenzymen geschnitten werden. Die entsprechenden Restriktionsenzyme wurden gemäß der Sequenz des Vektors und des Inserts gewählt. Der Verdau wurde gemäß dem Schema aus Tabelle 10 in 0,2 ml Reaktionsgefäße pipettiert.

Tabelle 10: Pipettierschema für den Restriktionsverdau

Komponenten	Verdau für den Vektor	Verdau für das Insert
	Volumen	
DNA	2 – 3 µg	Komplettes aufgereinigtes PCR-Produkt (40 µl)
Restriktionsenzym 1	1 µl	1,5 µl
Restriktionsenzym 2	1 µl	1,5 µl
Puffer (10 x)	4 µl	6 µl
dH₂O	auf 40 µl auffüllen	auf 60 µl auffüllen

Die Ansätze wurden gemischt, abzentrifugiert und der Verdau über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde zu den Proben, die den verdauten Vektor enthielten, 1 µl Calf Intestinal Alkaline Phosphatase (CIAP) hinzugegeben und für 40 min inkubiert. Anschließend konnten die Proben auf ein Agarosegel aufgetragen und das entsprechende DNA-Fragment mit der richtigen Größe extrahiert und aufgereinigt (Kapitel 3.1.2) werden. Die verdauten PCR-Proben, die das Insert enthielten, wurden mit dem QIAquick PCR Purification Kit nach Herstellerangaben aufgereinigt. Die Proben wurden mit 30 µl dH₂O eluiert.

3.1.4. Ligation

Um das passende Verhältnis für die Ligation zu bestimmen, wurden vor der Ligation Vektor und Insert auf ein Agarosegel aufgetragen. Anschließend konnten die Komponenten nach dem Schema aus Tabelle 11 in einem 0,2 ml Reaktionsgefäß gemischt werden.

Tabelle 11: Pipettierschema für die Ligation

Komponenten	Volumen [μ l]
Geschnittener aufgereinigter Vektor	1 - 2
Geschnittenes aufgereinigtes PCR-Produkt	4 – 8
Ligasepuffer (5 x)	8
Ligase	1
dH ₂ O	auf 40 μ l auffüllen

Der Ligationsansatz wurde über Nacht bei 16 °C inkubiert und direkt im Anschluss eine Transformation in kompetente Bakterien durchgeführt.

3.1.5. Transformation

Die Transformation nach der Ligation wurde mit MAX Efficiency™ DH5 α kompetenten Bakterien durchgeführt. Dafür wurden 10 μ l des Ligationsansatzes zu 50 μ l kompetenten Zellen gegeben. Um ein bereits vorhandenes Plasmid zu vermehren wurden 50 ng Plasmid in Subcloning Efficiency™ DH5 α kompetente Bakterien gegeben. Der jeweilige Ansatz wurde anschließend für 30 min auf Eis inkubiert. Danach folgte der Hitzeschock. Die Zellen wurden für 40 s bei 42 °C erhitzt, bevor sie erneut 2 min auf Eis gestellt wurden. Anschließend wurden 500 μ l S.O.C. Medium zu dem Ansatz gegeben und dieser dann 50 min bei 37 °C und 225 RPM im Schüttler inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen auf Agarplatten, mit Antibiotikum entsprechend der jeweiligen Resistenz des Plasmids, ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Wachstum der Kolonien überprüft und die Platten bei 4 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

3.1.6. Übernachtkultur

Nach erfolgreicher Transformation der Plasmide in die Bakterien folgte die Übernachtkultur. Dafür wurde das entsprechende Antibiotikum in LB-Medium gegeben. Für jede Übernachtkultur wurde eine Kolonie einer Agarplatte gepickt und in das LB-Medium gegeben. Die Kulturen wurden über Nacht bei 37 °C und 225 RPM inkubiert. Am nächsten Tag konnte die Plasmidpräparation durchgeführt werden. Es wurde entweder das QIAprep® Spin Miniprep Kit verwendet, wenn die Plasmide anschließend zur Überprüfung sequenziert werden sollten. Das NucleoBond® Xtra Midi Plus Kit wurde verwendet, wenn die Plasmide für weitere Versuche vermehrt werden sollten. Die DNA wurde entweder in 50 μ l (Mini-Präparation) oder in 300 μ l (Midi-Präparation) dH₂O eluiert. Beide Plasmidpräparationen

wurden gemäß den Angaben des jeweiligen Herstellers durchgeführt. Nach der Plasmidpräparation wurde die DNA mit Hilfe des NanoDrop™ Spektralphotometers gemessen.

Anschließend wurde anhand einer Sequenzierung überprüft, ob die Klonierung erfolgreich war. Dafür wurde die aus der Mini-Präparation gewonnene DNA verwendet, um gemäß den Angaben von Eurofins Scientific eine Sequenzierungsprobe zu pipettieren. Die Sequenzierung wurde anschließend von der Firma Eurofins Scientific durchgeführt und die Ergebnisse wurden mit Hilfe des Basic Local Alignment Search Tools (BLAST) überprüft. War die Klonierung erfolgreich, wurden die Proben für eine Midi-Präparation vorbereitet, um das neue Konstrukt zu vermehren und für weitere Versuche verwenden zu können.

3.1.7. Mutagenese

Das QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit wurde verwendet, um eine Mutagenese bei Plasmiden durchzuführen. Die verwendeten Primer sind in Tabelle 3 dargestellt. Der Ablauf erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers.

3.1.8. RNA-Isolation

Für die RNA-Isolation wurden die NRCs 24 h nach Stimulation geerntet. Dafür wurden die Zellen mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung (engl. phosphate-buffered saline, PBS) gewaschen und die Zellen anschließend mit Trypsin abgelöst. Die Zellen wurden 5 min bei 1000 x g zentrifugiert und der Überstand wurde abgenommen. Nach diesem Schritt wurde die RNA-Isolation gemäß den Anweisungen des Herstellers aus dem RNeasy® Mini Kit weiter durchgeführt. Die Pellets wurden in 25 µl RNase freiem Wasser resuspendiert und bei -80 °C gelagert bis die cDNA synthetisiert wurde. Die Konzentration und die Reinheit der RNA wurden mit Hilfe des NanoDrop™ Spektralphotometers gemessen. Das Verhältnis A260/A280 sollte zwischen 1,8 und 2 liegen, damit eine ausreichende Reinheit für die weiteren Experimente vorliegt.

3.1.9. cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese wurde gemäß den Anweisungen des Herstellers aus dem High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit durchgeführt. Für jede Reaktion wurden je nach RNA Ausbeute, bis zu 2 µg RNA in cDNA transkribiert. Bis zum Gebrauch wurde die cDNA bei -20 °C gelagert und für quantitative Echtzeit PCR (qPCR) Experimente herangezogen.

3.1.10. Quantitative Echtzeit PCR

Die cDNA für die qPCR Experimente wurde wie in Kapitel 3.1.9 beschrieben transkribiert. Die cDNA wurde je nach umgeschriebener Menge mit RNase freiem Wasser verdünnt (2 µg wurden 1:20 (v/v) verdünnt). Für die qPCR Reaktion wurden 16 µl/well Mastermix (Tabelle

12) in eine 96-well Platte vorgelegt. Anschließend wurden 4 µl der verdünnten Probe hinzugegeben. Die Ansätze wurden in Duplikaten pipettiert. Zusätzlich zu dem Genexpressionsmix für das Zielgen wurde ein Mastermix zur Referenz mit Rpl13 Genexpressionsmix hergestellt. Auch dieser wurde wie oben beschrieben zusammen mit der cDNA in die 96-well PCR-Platte pipettiert. Die Platte wurde zum Schluss mit einer Klebedichtung abgedeckt.

Tabelle 12: Zusammensetzung des qPCR Mastermix für ein Well

Komponenten	Volumen [µl]
Taqman PCR Mastermix	10
Genexpressionsmix	1
dH ₂ O	5

Die 96-well Platten wurden im CFX96-Cycler mit folgendem Programm (Tabelle 13) inkubiert:

Tabelle 13: qPCR Inkubationsprogramm

Temperatur [°C]	Zeit [s]
95	180
95	5
60	20

} 45 x

Die Ergebnisse wurden mit dem CFX Manager und Excel ausgewertet. Dafür wurde die relative Quantifizierung und damit folgende Formeln angewendet:

$$\Delta Ct = Ct_{\text{Zielgen}} - Ct_{\text{Referenzgen}}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{Behandlung}} - \Delta Ct_{\text{Kontrolle}}$$

$$\text{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

3.2. Herstellung der Adenoviren

3.2.1. Herstellung des Gateway® Entry Vektors

Im ersten Schritt um Adenoviren herzustellen, muss das FKBP52-Fragment FKBP52 (aa 280-352) durch PCR (Kapitel 3.1.1) amplifiziert und in den pENTRC3 Vektor mit Hilfe von Restriktion (Kapitel 3.1.3) und Ligation (Kapitel 3.1.4) kloniert werden. Wenn das Fragment in diesen Vektor kloniert wurde, schloss sich an die Transformation und die Übernachtkultur eine Plasmidpräparation mit Hilfe des QIAprep® Spin Miniprep Kits an. Die Plasmide wurden anschließend durch die Firma Eurofins Scientific sequenziert, um die Korrektheit der

Sequenz und der Ausrichtung zu überprüfen. Dafür wurden Sequenzierungsproben nach Anleitung der Firma Eurofins Scientific angesetzt.

3.2.2. LR Rekombination

Für die LR-Rekombination musste das entsprechende Gen im pENTR3C Vektor vorliegen. Die LR-Rekombination wurde nach den Herstellerangaben des pAd/CMV/V5-Dest™ Gateway® Vector Kits durchgeführt, wobei für die Inkubationszeit der LR-Rekombination 18 h gewählt wurde, bevor die Proteinase K hinzugegeben wurde. Für die Transformation (Kapitel 3.1.5) wurden anschließend 3 µl des Rekombinationsansatzes zu MAX Efficiency™ DH5α kompetenten Bakterien gegeben und auf Ampicillin-Agarplatten ausplattiert. Von jeder Platte wurden etwa fünf Kolonien gepickt und für eine Übernachtskultur (Kapitel 3.1.6) in LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin überführt. Am nächsten Tag wurden 100 µl der Übernachtskultur auf Chloramphenicol-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Wenn keine Bakterienkolonie auf den Chloramphenicol-Agarplatten zu sehen war, handelte es sich bei der entsprechend gepickten Kolonie um adenovirale Expressionsklone. Die Übernachtskulturen von diesen Klonen wurden verwendet, um die Plasmide zu isolieren. Da die entstandenen Konstrukte zu groß waren, um sie nach Herstellerangaben des QIAprep® Spin Miniprep Kit zu isolieren, wurden lediglich die Puffer dieses Kits verwendet. Zu Beginn wurden 3 ml Übernachtskultur pelletiert (5 min, 6000 x g, Raumtemperatur). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 150 µl P1 resuspendiert. Anschließend wurden 175 µl P2 hinzugegeben, das Reaktionsgefäß invertiert und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden 200 µl N3 hinzugegeben und das Gemisch 5 min auf Eis inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde das Gemisch 5 min bei 18000 x g und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und es wurde zusätzlich 1 ml 100 % Ethanol hinzugegeben. Das Gemisch wurde nochmals 15 min auf Eis inkubiert, bevor es 10 min bei 18000 x g und Raumtemperatur zentrifugiert wurde. Anschließend konnte der Überstand verworfen, das Pellet mindestens 30 min getrocknet und daraufhin in 200 µl TE-Puffer resuspendiert werden. Als letztes wurde die DNA-Konzentration gemessen und die Proben bei -20 °C bis zum weiteren Gebrauch gelagert. Um zu bestätigen, dass das entsprechende Gen in der richtigen Ausrichtung vorliegt, wurde ein Teil der Probe der Firma Eurofins Scientific zum Sequenzieren zugeschickt. Für diese Sequenzierung wurde ein T7-Primer verwendet.

3.2.3. Pac I-Verdau

Die aufgereinigten und nach der Sequenzierung positiven Klone wurden für den Pac I-Verdau ausgewählt. Es war nötig den Vektor mit dem Enzym Pac I zu verdauen, um die viralen *Inverted Terminal Repeats* freizulegen und, um die bakteriellen Sequenzen zu

entfernen. Der Pac I-Verdau wurde nach dem Schema der folgenden Tabelle (Tabelle 14) angesetzt.

Tabelle 14: Pipettierschema des Pac I-Verdau

Komponenten	Volumen/Menge
DNA	20 µg
Enzym Pac I	2 µl
NEBuffer 1.1	10 µl
BSA	10 µl
dH₂O	auf 100 µl auffüllen

Der Verdau wurde über Nacht bei 37 °C inkubiert. Im nächsten Schritt musste das verdaute Plasmid mit Hilfe von Phenol/Chloroform-Extraktion und anschließender Ethanolpräzipitation aufgereinigt werden. Für die Phenol/Chloroform-Extraktion mussten 100 µl der DNA mit 100 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol in einem Phase Lock Gel Heavy Reaktionsgefäß gemischt und bei 18000 x g für 10 min bei Raumtemperatur zentrifugiert werden. Die obere Phase enthielt die DNA und wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurden 400 µl 100 % Ethanol hinzugegeben, das Gemisch bei 18000 x g für 10 min bei Raumtemperatur zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet mit der DNA musste daraufhin mit 70 % Ethanol gewaschen, bei 18000 x g für 4 min bei Raumtemperatur zentrifugiert und der Überstand wieder verworfen werden. Das Pellet wurde anschließend getrocknet und in 60 µl TE-Puffer resuspendiert. Zum Schluss musste die DNA-Konzentration mit Hilfe des NanoDrop™ Spektralphotometers gemessen werden.

3.2.4. Transduzieren der HEK 293A Zellen für die Virusproduktion

HEK 293A Zellen wurden für die Transduktion in 6 cm-Schalen mit DMEM + 10 % FBS + 1 % P/S (DMEM (10 % FBS)) ausgesät. Zusätzlich wurden Zellen, die nicht transduziert wurden, als Negativkontrolle in eine Platte ausgesät. Die Zellen sollten am Tag der Transduktion eine Konfluenz von 85 – 95 % aufweisen. Vor der Transduktion musste das Medium auf DMEM + 2 % FBS + 1 % P/S (DMEM (2 % FBS)) gewechselt werden. Für die Transduktion sollten 5 µg des adenoviralen Plasmids verwendet und wie in Kapitel 3.4.2 beschrieben, durchgeführt werden. Die transduzierten Zellen wurden für 10 - 15 Tage bei 37 °C und 5 % CO₂ im Inkubator inkubiert. Jeden Tag wurde überprüft, ob bereits die Lyse der Zellen oder eine virale Plauebildung begonnen hat. Wenn 80 – 90 % der Zellen lysiert waren, wurde der Überstand mit dem Adenovirus abgenommen und in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt. Die restlichen Zellen, die noch am Boden hafteten, konnten abgespült und ebenfalls in das Reaktionsgefäß überführt werden.

Um die Zellen aufzubrechen und die Viruspartikel aus den Zellen freizusetzen, wurde das abgenommene Medium mit den Viren dreimal eingefroren und wieder aufgetaut. Dafür wurde

das Medium mindestens 30 min bei -80 °C gefroren und 15 min bei 37 °C wieder aufgetaut. Nach drei Abläufen wurde das Medium zentrifugiert (3000 x g, 15 min, Raumtemperatur). Der Überstand, der die Viruspartikel enthielt, wurde abgenommen und bei -80 °C gelagert. Diese Adenoviruslösung, die durch die Transduktion der Plasmid DNA hergestellt wurde, wird als Mutterstock bezeichnet und für die weitere Vermehrung verwendet.

3.2.5. Vermehrung des adenoviralen Stocks

Nachdem der Mutterstock des Adenovirus hergestellt wurde, musste der Virus vermehrt werden. Dafür wurden je Mutterstock drei 15 cm-Schalen und eine 15 cm-Schale als Negativkontrolle verwendet. In jede Schale wurden HEK 293A Zellen in DMEM (10 % FBS) ausgesät. Nachdem die Zellen eine Konfluenz von 90 % erreicht hatten, wurde das Medium auf DMEM (2 % FBS) gewechselt. Zusätzlich wurden 50 - 100 µl des Mutterstocks zu dem Medium auf die Zellen gegeben. Die Zellen wurden die nächsten 2 - 6 Tage beobachtet. Bei beginnender Lyse der Zellen, wurden diese von der Schale abgespült und mit dem Medium in einem 50 ml Reaktionsgefäß gesammelt. Wieder wurde das Medium wie oben beschrieben dreimal bei -80 °C gefroren und bei 37 °C aufgetaut. Zum Schluss wurde der Virusstock bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

3.2.6. Virentiter

Um die Konzentration der Viren zu bestimmen, wurde die Methode von Baer & Kehn-Hall (Baer & Kehn-Hall, 2014) mit Modifikationen durchgeführt. Am ersten Tag wurden für jede zu bestimmende Virusstocklösung in zwei 6-well Platten HEK 293A Zellen ausgesät. Wenn die Zellen 85 – 95 % konfluent waren, wurden sie mit verschiedenen Konzentrationen der Virusstocklösung transduziert. Dafür wurden von jedem Virus 10-fach Verdünnungen von 10^{-3} bis 10^{-7} in serumfreiem Medium hergestellt. Die Zellen jeder Platte wurden jeweils mit den fünf Verdünnungen und einer Negativkontrolle ohne Virus transduziert. Das vorhandene Medium wurde von den HEK 293A Zellen entfernt und 100 µl jeder Verdünnung pro Well auf die Zellen gegeben. Anschließend wurden zusätzlich 600 µl DMEM (10 % FBS) in jedes Well gegeben. Die Zellen wurden 2 h bei 37 °C und 5 % CO₂ im Inkubator inkubiert, alle 20 min wurden die Platten leicht geschwenkt. Nach 1 h 15 min wurden weitere 200 µl DMEM (10 % FBS) auf die Zellen gegeben. Das Medium wurde nach insgesamt 2 h abgenommen und die Zellen mit 3 ml Immobilisierungsmedium (Avicel (2,4 %) mit Plaquemedium (1/3 v/v)) überschichtet. Die Zellen wurden für sechs Tage im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert.

Nach den sechs Tagen wurde das Immobilisierungsmedium abgenommen und die Zellen einmal mit PBS gewaschen, um das restliche Avicel zu entfernen. Danach wurden die Zellen 30 min mit 4 % Paraformaldehyd (PFA) fixiert. Anschließend wurden die Zellen nochmals mit PBS gewaschen. Für die folgende Färbung mussten die Zellen 15 min mit Kristallviolett

beschichtet und anschließend mit Wasser gewaschen werden, um das überschüssige Kristallviolett zu entfernen. Als letztes wurden die Plaques in den Wells gezählt. Zum Auswerten können die Wells ausgewählt werden, in denen zwischen 1 und 150 Plaques zu erkennen waren. Es wurde der Mittelwert der Duplikate aus den zwei Platten gebildet und mit folgender Formel der Virentiter bestimmt:

$$\frac{\text{Durchschnitt der Plaques}}{\text{Verdünnung} \times \text{Virusvolumen}} = \text{Virentiter (pfu/ml)}$$

Nachdem von jedem auswertbaren Well die Konzentration des Virus in der Verdünnung bestimmt wurde, konnte aus allen Werten ein Mittelwert gebildet werden. Dieser Wert wurde herangezogen um das benötigte Volumen an Virus in Bezug auf die gewünschte Multiplizität der Infektion (engl. multiplicity of infection, MOI) zu berechnen:

$$\frac{\text{MOI} \times \text{Zellzahl}}{\text{Virentiter}} = \text{Virusvolumen}$$

3.3. Isolation primärer Kardiomyozyten

Alle Tierversuche wurden von der Regierung von Unterfranken und der zuständigen Behörde des Universitätsklinikums Würzburg genehmigt (Genehmigungsnummer: 55-2-2531.01-77/13).

3.3.1. Isolation neonataler Rattenkardiomyozyten

Für die Isolation der NRCs wurden 1 - 3 Tage alte Wistar Ratten verwendet. Die Tiere wurden dekapitiert, der Thorax geöffnet und das Herz vorsichtig entnommen. Die entnommenen Herzen wurden in ein mit kaltem CBFHH + P/S gefülltes 50 ml Reaktionsgefäß gegeben und gewaschen. Nachdem alle Herzen entnommen waren, wurden die Vorhöfe und die Gefäße entfernt und die Herzen in kleine Stücke geschnitten. Die zerkleinerten Herzstücke und 20 ml Enzymlösung wurden mit einer Pipette mit weiter Öffnung in ein 50 ml Becherglas überführt. Die Suspension wurde 15 min auf einem Heizblock bei 37 °C unter Rühren inkubiert. Nachdem sich die Gewebestücke abgesetzt hatten, wurde der erste Überstand abgenommen und verworfen, da sich in diesem hauptsächlich Zelltrümmer, Erythrozyten und Bindegewebszellen befinden. Die sich in dem Becherglas befindlichen Gewebestücke wurden anschließend auf zwei Bechergläser aufgeteilt und auf 15 ml mit Enzymlösung aufgefüllt. Diese Suspension wurde ebenfalls 10 min auf einem Heizblock bei 37°C unter Rühren inkubiert. Anschließend wurde die Suspension mit einer Pipette mit weiter Öffnung 10 x vorsichtig auf- und ab pipettiert. 10 ml

des Überstandes wurden nach dem Absetzen der Gewebestücke abgenommen und in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt, in welchem 7,5 ml FBS vorgelegt waren, um die Enzymlösung zu inaktivieren. Anschließend wurde 10 ml neue Enzymlösung in die Bechergläser gegeben. Der Verdau, das Überführen des Überstandes in ein 50 ml Reaktionsgefäß und das Auffüllen der Bechergläser mit neuer Enzymlösung wurde wiederholt bis das komplette Gewebe verdaut war und der Überstand während des Verdaus nicht mehr trüb wurde. Die Anzahl der Zyklen war stets unterschiedlich, da sie von verschiedenen Faktoren, wie Anzahl der Herzen, Zerkleinerung des Gewebes und Wirksamkeit der Enzymlösung, abhängig waren. Nachdem der letzte Überstand in das 50 ml Reaktionsgefäß überführt wurde, wurde die Zellsuspension bei 500 x g für 5 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Zellpellets wurden alle zusammen, abhängig von der Ausgangsherzzahl (pro 10 Herzen wurden 10 ml Medium verwendet), mit Minimum Essential Medium Eagle + 5 % FBS ohne BrdU (MEM 5) resuspendiert und vereint. Anschließend wurde die Zellsuspension durch ein Zellsieb mit 70 µm Porengröße filtriert. Um Fibroblasten aus der Zellsuspension zu eliminieren, wurden jeweils 10 ml der filtrierten Zellsuspension in eine 10 cm-Kulturschale pipettiert. Diese Zellsuspension wurde für 1 h im Inkubator bei 37 °C, 5% CO₂ inkubiert. Da die Fibroblasten nach dieser Zeit am Schalenboden adhärten und die Kardiomyozyten noch im Medium schwammen, wurde das Medium abgenommen und in ein steriles Gefäß überführt. Die 10 cm-Kulturschalen wurden anschließend mit Minimum Essential Medium Eagle + 5 % FBS mit BrdU (MEM 5 mit BrdU) gespült, welches daraufhin ebenfalls in das Gefäß überführt wurde.

Die Zellzahl wurde mit Hilfe eines Hämozytometers bestimmt. Dafür wurden Zellsuspension und Trypanblau im Verhältnis 1:1 gemischt und 10 µl des Gemischs in jede Seite der Zählkammer pipettiert. Anschließend wurden anhand einer Doppelbestimmung die Gesamtzellzahl, die Lebendzellzahl und die Lebensrate bestimmt, der Mittelwert gebildet und die entsprechende Zellzahl ausgesetzt. Die NRCs wurden entweder für Protein- und RNA-Isolationen in 6-well Schalen oder für Immunzytochemie und Ca²⁺-Messungen auf Laminin (6 µl Laminin/ml PBS) beschichteten Plättchen ausgesetzt (Tabelle 15). Die Plättchen wurden vor der Lamininbeschichtung mit einem Fettstift umrandet.

Tabelle 15: Zellzahlen neonataler Rattenkardiomyozyten in verschiedenen Experimenten

Experiment	Kultivierung	Zellzahl
Protein- und RNA-Isolation	6-well Platten	2*10 ⁶ Zellen/well
Immunzytochemie	Plättchen (25 mm x 25 mm)	2*10 ⁵ Zellen/Plättchen
Ca²⁺-Messungen	Plättchen (24 mm x 24 mm)	1,6*10 ⁵ Zellen/Plättchen

3.3.2. Isolation adulter Rattenkardiomyozyten

ARCs wurden von Michelle Gulentz und Annette Berbner (Translationale Forschung, DZHI) isoliert.

ARCs wurden aus fünf Monate alten Wistar Ratten gewonnen. Die Ratten wurden mit einem Gemisch aus 5 % Isofluran und O₂, einer Lösung aus Buprenorphin (0,05 mg/kg Körpergewicht der Ratte) und Heparin (500 I.U./kg Körpergewicht der Ratte) in 0,9 % NaCl anästhesiert. Der Thorax wurde geöffnet, das Herz vorsichtig entnommen und die Aorta auf einer Spritze kanüliert. Anschließend wurde die Kanüle an der Langendorff-Apparatur angebracht und retrograd mit Perfusionspuffer perfundiert. Nach 4 min wurde von Perfusionspuffer auf Verdaupuffer umgestellt. Der enzymatische Verdau wurde so lange fortgesetzt bis das Herz geschwollen und leicht blass war. Dieser Vorgang dauerte zwischen 6 und 10 min. Nach vollständigem Verdau wurden die Aterien entfernt und die Ventrikel in eine Schale mit 5 ml Perfusionspuffer gegeben. Das Gewebe wurde sternförmig eingeschnitten und in Perfusionspuffer leicht hin und hergeschwenkt, damit sich die Zellen aus dem Verband lösen konnten. Der Perfusionspuffer und die herausgelösten Zellen wurden in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt und 5 ml Stopppuffer I hinzugegeben. Nach ca. 5 min haben sich die Zellen abgesetzt und der Überstand wurde verworfen. Für den Ca²⁺-Aufbau wurden die Zellen in 10 ml Stopppuffer II resuspendiert. Anschließend wurde der Ca²⁺-Aufbau mit CaCl₂-Lösungen, welche jeweils nach 4 min gewechselt wurden, nach folgendem Schema weitergeführt: 50 µl 10mM, 50 µl 10 mM, 100 µl 10 mM, 30 µl 100 mM, 50 µl 100 mM. Nach dem letzten Schritt CaCl₂ wurden die Zellen in Platingmedium resuspendiert und für die Zellgrößenbestimmung auf Laminin- (6 µl Laminin/ml PBS) beschichteten Plättchen ausgesetzt.

3.4. Zellkultur

3.4.1. Kultivierung von HEK 293, HEK 293A und T3.9 Zellen

Die HEK 293 und HEK 293A Zellen wurden in DMEM (10 % FBS) und die T3.9 Zellen in DMEM + 10 % FBS + 1 % P/S + 0,5 mg/ml G418 (DMEM (10 % FBS/G418)) im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Bei einer Konfluenz von 80 – 90 % wurden die Zellen in eine neue T75-Flasche passagiert oder für Versuche in ausgesät. Dazu wurden die Zellen mit dem vorhandenen Medium vom Flaschenboden gespült und für 5 min bei 1000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, das Pellet in einem entsprechenden Volumen an frischem Medium resuspendiert und ein Anteil davon in eine neue T75-Flasche, in eine Zellkulturschale oder auf Plättchen (25 x 25 cm) mit frischem Medium gegeben.

Mit Hilfe des PCR-Mycoplasmen Test Kits, welches nach Herstellerangaben durchgeführt wurde, wurde bestätigt, dass die Zellen Mycoplasmen-negativ waren.

3.4.2. Transfektion und Transduktion von HEK 293 Zellen

Für die Transfektion und Transduktion wurden HEK 293 bzw. HEK 293A Zellen mit DMEM (10 % FBS) in 6 cm- oder 10 cm-Schalen ausgesetzt. Für die Transfektion sollten die Zellen eine Konfluenz von 70 – 90 % aufweisen. Es wurde das X-tremeGENE HP DNA Transfection Reagent nach Herstellerangaben verwendet. Das Verhältnis Reagenz zu DNA war 1:1. In 10 cm-Schalen wurden für Co-Transfektionen mit zwei Plasmiden von jedem Plasmid 5 µg DNA verwendet, für Transfektionen mit nur einem Plasmid wurden 10 µg dieser DNA verwendet. Bei der Herstellung der Adenoviren (Kapitel 3.2.4) wurden für die Transduktion 5 µg adenovirales Plasmid verwendet. Das Transfektionsreagenz und die DNA wurden in OptiMEM gemischt und anschließend 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde das Gemisch vorsichtig auf die Zellen geträufelt. Die transfizierten HEK 293 Zellen wurden 24 - 48 h nach der Transfektion geerntet und für weitere Versuche herangezogen. Die HEK 293A Zellen, die mit den viralen Plasmiden transduziert wurden, wurden geerntet, wenn die Lyse bereits begonnen hatte.

3.4.3. Kultivierung von neonatalen Rattenkardiomyozyten

Die ausgesäten NRCs wurden für maximal fünf Tage nach der Isolation bei 37 °C, 5 % CO₂ im Brutschrank inkubiert und wie in Tabelle 16 zusammengefasst, behandelt.

Tabelle 16: Kultivierung der neonatalen Rattenkardiomyozyten

Tag	Protein-/RNA-Isolation und Immunzytochemie		Ca ²⁺ -Messungen
	chronische Stimulation	akute Stimulation	
0	Zellen isolieren	Zellen isolieren	Zellen isolieren
1	Zellen waschen	Zellen waschen	Zellen waschen
2	Zellen transduzieren bzw. transfizieren	Zellen transduzieren bzw. transfizieren	Zellen transduzieren
3	Zellen starven	Zellen starven	Ca ²⁺ messen
4	Zellen stimulieren	Zellen stimulieren und Experiment	
5	Experiment		

Zellen waschen

Wenn sich die Zellen nach etwa 24 h abgesetzt und morphologische und physiologische Veränderungen durchlaufen haben, wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen, um tote Zellen und Zelltrümmer zu entfernen. Anschließend wurde neues MEM 5 mit BrdU auf die Zellen gegeben.

Zellen transduzieren bzw. transfizieren

Nach weiteren 24 h wurden die Zellen mit Adenoviren transduziert, um entsprechende Proteine zu exprimieren oder mit siRNA transfiziert, um die entsprechenden Proteine downzuregulieren. Die verwendeten Adenoviren sind in Kapitel 2.11 und die verwendete siRNAs sind in Kapitel 2.15 zusammengefasst.

Für die Transduktion wurden die Kardiomyozyten mit 50 – 100 MOI des entsprechenden Virus in OptiMEM transduziert und 4 h kultiviert. Nach 4 h wurde der Virus abgenommen und Minimum Essential Medium Eagle + 1 % FBS mit BrdU (MEM 1 mit BrdU) auf die Zellen gegeben und weitere 24 h kultiviert.

Für die Transfektion wurde die entsprechende siRNA für das Gen, das downreguliert werden sollte, Scramble siRNA (Scr siRNA) zur Kontrolle und Lipofectamine® RNAiMAX Reagent verwendet. Die Transfektion wurde laut den Herstellerangaben des Lipofectamine® RNAiMAX Reagents durchgeführt.

Zellen starven

Damit die Zellen nicht aufgrund des Serums, sondern nur in Abhängigkeit der Agonisten ihre Größe verändern, wurde das vorhandene Medium nach 24 h gegen serumfreies Medium (Minimum Essential Medium Eagle ohne FBS ohne BrdU (MEM 0)) ausgetauscht.

Zellen stimulieren

Nachdem die Zellen 24 h gestarvt wurden, konnten sie stimuliert werden. Dafür wurden sie bei der chronischen Stimulation mit 50 μ M PE, 100 nM Ang II, 100 μ M OAG oder Lösungsmittelkontrolle in MEM 0 24 h stimuliert. Um den TRPC3-Kanal zu hemmen, wurden die Zellen für einige Experimente zeitgleich mit 10 μ M Pyr3 oder Lösungsmittelkontrolle behandelt. Für andere Experimente wurden 2 μ M FK506 oder Lösungsmittelkontrolle in MEM 0 auf die Zellen gegeben. Nachdem die Zellen 24 h behandelt wurden, wurden sie am nächsten Tag für RNA-/Proteinisolation oder Immunzytochemie verwendet. Bei der akuten Stimulation wurden die Zellen mit 10 μ M Pyr3 oder Lösungsmittelkontrolle in MEM 0 6 h vorbehandelt und anschließend mit 50 μ M PE oder 1 μ M Ang II in MEM 0 15 min stimuliert. Anschließend wurden die Zellen direkt für Immunzytochemie verwendet.

3.4.4. Kultivierung von adulten Rattenkardiomyozyten

Die isolierten ARCs (Kapitel 3.3.2) wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank kultiviert (Abbildung 10).

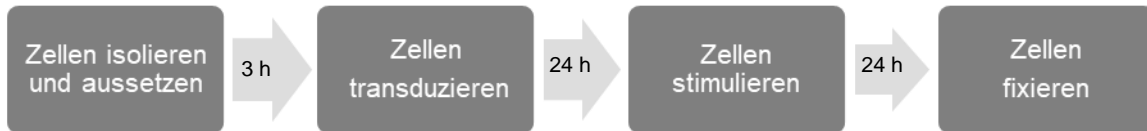


Abbildung 10: Schema zur Behandlung der ARCs

Die ARCs wurden isoliert und ausgesät. Nach 3 h wurden die Zellen transduziert. Nach weiteren 24 h folgte die Stimulierung. Zum Schluss wurden die ARCs nach weiteren 24 h fixiert.

3 h nach dem Aussetzen wurden die Zellen für 24 h mit 50 - 100 MOI Adenovirus (β gal oder N-terminal HA markiertes FKBP52 (aa 135-459)) in Kulturmedium transduziert. Nach 24 h wurden die ARCs für weitere 24 h mit 50 μ M PE in Kulturmedium stimuliert und am nächsten Tag mit 4 % PFA in PBS für 8 min bei Raumtemperatur fixiert. Um die Zellen zu mikroskopieren und deren Größe zu bestimmen, wurden die Plättchen mit den Zellen mit Vectashield auf Objektträgern fixiert.

3.5. Proteinbiochemische Methoden

3.5.1. Gesamtproteinlysate

Vor der Gesamtproteinisolation wurden die NRCs oder die HEK 293 Zellen geerntet. Dazu wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen, anschließend mit Trypsin/EDTA-Lösung abgelöst und in ein vorgekühltes Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden bei 1000 x g, 5 min, 4 °C abzentrifugiert. Das Pellet wurde abhängig von der Größe mit Lysepuffer resuspendiert, 7 s mit Ultraschall behandelt und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen bei 16000 x g, 5 min, 4 °C abzentrifugiert. Zum Schluss wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt, direkt für die Proteinbestimmung nach Bradford (Kapitel 3.5.3) und für weitere Versuche herangezogen oder bis zum Gebrauch bei -80 °C gelagert.

Für die Proteinisolation aus murinen Herzen wurden die Mäuse getötet, der Thorax geöffnet und das Herz entnommen. Ein Stück des Herzens wurde zusammen mit 300 μ l Lysepuffer in ein 2,0 ml Reaktionsgefäß, das bereits Keramikbeads enthielt, gegeben. Das Gewebe wurde mit Hilfe des Precellys® 24 Homogenisators homogenisiert und dreimal 10 s mit Ultraschall

behandelt. Der weitere Ablauf entsprach dem oben beschriebenen Ablauf zur Lyse von Zellen.

3.5.2. Zellfraktionierung

Für die Zellfraktionierung wurden die NRCs einmal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden in drei Wells einer 6-well Mikrotiterplatte 50 µl Lysepuffer gegeben und die Zellen für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Im Laufe der 5 min wurden die Zellkerne sichtbar. Nach der Inkubationszeit wurde der Lysepuffer der drei Wells gepoolt und anschließend das Lysat auf die drei anderen Wells verteilt. Der Lysepuffer wurde auch hier nach einer Inkubationszeit von 5 min wieder abgenommen und in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß gesammelt. Das Lysat enthielt nun zytosolische Proteine und Membranproteine einer 6-well Platte. Die Proben wurden 10 min bei 12000 x g zentrifugiert und der Überstand in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Von den Proben, die die zytosolischen Proteine und die Membranproteine enthielten, wurde zur Proteinbestimmung ein Bradford-Assay (Kapitel 3.5.3) durchgeführt. Um anschließend das intakte Cytoskelett, Adhäsionsproteine und unlösliches Kernmaterial zu isolieren wurden 20 µl SDS-Lysepuffer in jedes Well der 6-well Mikrotiterplatte gegeben. Das Zellmaterial wurde im SDS-Lysepuffer mit Zellschabern von der Platte gekratzt und in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß gepoolt. Von diesen Proben wurde die Proteinkonzentration anhand eines Bicinchoninsäure (engl. bicinchoninic acid, BCA) - Assays (Kapitel 3.5.4) bestimmt.

3.5.3. Proteinbestimmung mit Bradford-Assay

Von allen Lysaten, außer den Lysaten der Zellfraktionierung, die das intakte Cytoskelett, Adhäsionsproteine und unlösliches Kernmaterial enthalten, wurde die Proteinkonzentration mit Hilfe des Bradford-Assays bestimmt. Die Lysate wurden so verdünnt, dass die Messung im linearen Bereich erfolgte. Die gemessene Extinktion der Proben wurde auf eine BSA-Standardreihe (0 mg/ml, 0,2 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,9 mg/ml) bezogen. Die Proben und die Standardreihe wurden in Duplikaten gemessen, dafür wurden 10 µl in eine 96-well Mikrotiterplatte pipettiert und 200 µl Bradfordreagenz hinzugegeben. Anschließend wurde die Absorption bei 595 nm gemessen. Aus den Werten der BSA-Reihe konnte eine Kalibrationsgerade erstellt werden. Die Proteinkonzentrationen der Proben wurden aus den gemessenen ODs mit Hilfe der Kalibrationsgeraden interpoliert.

3.5.4. Proteinbestimmung mit BCA-Assay

Von den Lysaten der Zellfraktionierung, die intaktes Cytoskelett, Adhäsionsproteine und unlösliches Kernmaterial enthielten, wurde zur Proteinbestimmung ein BCA-Assay durchgeführt. Um die BCA-Arbeitslösung herzustellen wurden BCA-Reagenz A und BCA-Reagenz B im Verhältnis 50:1 gemischt. Die Proteinkonzentrationen wurden mit Hilfe

einer BSA-Standardreihe (0 mg/ml, 0,125 mg/ml, 0,25 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,75 mg/ml, 1 mg/ml, 1,5 mg/ml, 2 mg/ml) bestimmt. Die Proben wurden 1:10 verdünnt und anschließend 25 µl jeder Probe und jedes Standards als Duplikat in eine 96-well Mikrotiterplatte pipettiert. Danach wurden 200 µl der BCA-Arbeitslösung hinzugegeben, die Platte 30 s geschwenkt und 30 min bei 37°C inkubiert. Zum Schluss wurde die Absorption bei 562 nm bestimmt und die Proteinkonzentration über Interpolation mit Hilfe der Standardreihe bestimmt.

3.5.5. Immunpräzipitation

Nach der Lyse der Zellen und der Proteinbestimmung nach Bradford wurden Proben mit 1000 µg Protein in einem Gesamtvolumen von 400 µl angesetzt. Als erstes wurde das sogenannte Pre-Clearing durchgeführt. Dazu wurde zu jedem Ansatz 1 µg IgG hinzugegeben, wobei die Spezies der IgGs auf die Spezies des verwendeten Antikörpers abgestimmt wurde. Daraufhin wurden die Proben 1 h bei 4 °C über Kopf drehend inkubiert. Danach wurden 20 µl Protein A-Agarosebeads hinzugegeben und nochmal 1 h bei 4 °C über Kopf drehend inkubiert. Anschließend wurden die Proben zentrifugiert (1000 x g, 5 min, 4 °C), der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und ein Antikörper, der gegen das zu präzipitierende Protein gerichtet war, wurde hinzugegeben. Die Proben wurden über Nacht bei 4 °C über Kopf drehend inkubiert. Als nächstes wurden zu den Proben jeweils 30 µl Protein A-Agarosebeads hinzugegeben und diese nochmals über Kopf drehend inkubiert (2 h, 4 °C). Die Protein A-Agarosebeads wurden anschließend abzentrifugiert (1000 x g, 5 min, 4 °C) und die Proben dreimal gewaschen. Dazu wurden 500 µl Puffer hinzugegeben, die Proben über Kopf drehend inkubiert (5 min, 4 °C) und zum Schluss zentrifugiert (1000 x g, 5 min, 4 °C). Nach dem letzten Waschschrift wurden 35 µl Lämmli-puffer auf die Pellets gegeben und bei 95 °C 2 min inkubiert. Danach wurden die Proben 2 min auf Eis gestellt und zum Schluss abzentrifugiert (1000 x g, 5 min, 4 °C). Die Überstände wurden in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit Hilfe von eindimensionaler SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Western Blot analysiert.

3.5.6. Eindimensionale SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot

Um Proteine nach ihrer Größe mit Hilfe der eindimensionalen SDS-PAGE aufzutrennen, wurden Gele gegossen, die aus einem Sammelgel und aus einem Trenngel bestehen. Das Trenngel wurde je nach zu trennenden Proteinen in unterschiedlichen Konzentrationen hergestellt. Trenngele mit 8 % Acrylamid wurden verwendet um Proteine zwischen 50 - 250 kDa aufzutrennen und 15 % Trenngele für Proteine < 50 kDa. In Tabelle 17 sind die Zusammensetzungen der verschiedenen Trenngele aufgelistet. Nachdem das Trenngel

gegossen war, wurde es bis zur vollständigen Polymerisation mit Isopropanol überschichtet. Das Sammelgel wurde, wie in Tabelle 18 zusammengefasst, über das Trenngel gegossen und ein Kamm für die Bildung der Taschen eingefügt.

Tabelle 17: Zusammensetzung für 10 ml Trenngel bei verschiedenen Acrylamidkonzentrationen

Acrylamidkonzentration	8 %	15 %
dH ₂ O	4,62 ml	2,3 ml
30 % Acrylamidmix	2,67 ml	5,0 ml
Tris 1,5 M (pH 8,8)	2,5 ml	2,5 ml
10 % SDS	0,1 ml	0,1 ml
10 % APS	0,1 ml	0,1 ml
TEMED	0,01 ml	0,01 ml

Tabelle 18: Zusammensetzung für 3 ml Sammelgel mit 5 % Acrylamid

Acrylamidkonzentration	5 %
dH ₂ O	2,057 ml
30 % Acrylamidmix	0,5 ml
Tris 1,0 M (pH 6,8)	0,380 ml
10 % SDS	0,03 ml
10 % APS	0,03 ml
TEMED	0,003 ml

Nach vollständiger Polymerisation des Sammelgels wurden die Proben, welche mit fünffach SDS-Probenpuffer angesetzt wurden, in das Gel geladen. Zusätzlich wurde ein Größenstandard aufgetragen. Damit sich die Proben zu Beginn sammeln konnten, erfolgte die Elektrophorese für ca. 20 min bis zur Aufkonzentrierung bei 80 V. Anschließend wurde die Elektrophorese bis zur vollständigen Auftrennung der Proteine bei 130 V durchgeführt.

Nach der Elektrophorese wurden die Proteine mit Hilfe des Wetblot-Verfahrens auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran übertragen. Die Membran wurde zuvor 1 min in Methanol aktiviert. Anschließend erfolgte der Transfer bei 100 V, 4 °C für 2 h bei großen Proteinen (> 30 kDa) und für 1 h bei kleinen Proteinen (< 30 kDa). Nach dem Transfer wurden unspezifische Bindungsstellen auf der Membran mit Blockinglösung 1 h bei Raumtemperatur geblockt. Daraufhin wurde der Primärantikörper in der entsprechenden Verdünnung (Tabelle 6) über Nacht, bei 4 °C unter Schütteln inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran dreimal 10 min mit TBST-T bei Raumtemperatur gewaschen. Im nächsten Schritt folgte die Inkubation mit dem entsprechenden HRP-gekoppelten Sekundärantikörper für 1 h bei Raumtemperatur unter Schütteln (Tabelle 7). Anschließend wurde die Membran erneut dreimal 10 min mit TBS-T gewaschen. Zum Schluss konnten die Proteine auf der Membran mit Chemilumineszenz detektiert werden.

3.5.7. Membran strippen

Um andere Proteine auf der Membran zu detektieren, wurde die Membran nach der Detektion 40 min bei Raumtemperatur in Re-Blot Plus Strong Solution unter leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend wurde die Membran viermal jeweils für 10 min mit TBS-T gewaschen. Nach dem Waschen konnte ein neues Protein auf der Membran detektiert werden, indem die Membran mit dem entsprechenden Antikörper über Nacht inkubiert wurde.

3.5.8. Immunzytochemie

Für die Bestimmung der Zellgröße oder der NFAT-Translokation mit Hilfe von Immunzytochemie wurden NRCs auf Laminin beschichteten Deckgläschen (24 x 24 cm) kultiviert. Zunächst wurden diese 8 min mit 4 % PFA bei Raumtemperatur fixiert. Nachdem die fixierten Zellen dreimal mit PBS gewaschen wurden, wurden sie mit 0,05 % Triton X-100 bei Raumtemperatur 5 min permeabilisiert. Anschließend mussten die Zellen dreimal mit PBS gewaschen werden. Um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren, wurden die Zellen 1 h bei Raumtemperatur mit Blocking Solution inkubiert. Der Primärantikörper α -Actinin wurde 1:200 in PBS verdünnt und auf die Zellen gegeben. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4 °C. Nachdem die Zellen mit PBS gewaschen wurden, wurde der fluoreszenzgekoppelte Sekundärantikörper anti-Maus 568 1:200 in PBS verdünnt und die Zellen 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der Zellen mit PBS wurde für 5 min 134 μ M 4',6-Diamidino-2-Phenylindole (DAPI) auf die Zellen gegeben. Im nächsten Schritt wurden die Zellen erneut dreimal mit PBS gewaschen. Das Eindeckeln der Präparate erfolgte mit Vectashield. Daraufhin wurden die Zellen mit dem Mikroskop Axiovert 200 oder dem Mikroskop DMI8 mikroskopiert. Die Auswertung der Größe und der NFAT-Translokation erfolgte zum Schluss entweder mit ImageJ oder mit dem Programm LAS X von Leica.

3.6. Ca²⁺-Messungen

HEK 293 oder T3.9 Zellen wurden für die Ca²⁺-Messungen auf Poly-D-Lysin Hydrobromid beschichteten Deckgläsern (25 x 25 mm) kultiviert. NRCs wurden auf Deckgläsern kultiviert, die mit Laminin beschichtet waren. HEK 293 Zellen wurden vor den Messungen mit YFP-TRPC3, YFP-TRPC3 + FKBP52 (aa 280-352) oder YFP transfiziert. In den T3.9 Zellen wurde FKBP52 mit siRNA downreguliert und in den NRCs wurde FKBP52 (aa 135-459), FKBP52 (aa 280-352) oder β gal mit Hilfe von Adenoviren überexprimiert.

Vor den Ca²⁺-Messungen wurden die Zellen zuerst dreimal mit Ca²⁺-freier Normaltyrode gewaschen und anschließend 40 min bei Raumtemperatur mit Fura 2-AM (2 μ M) und

Probenecid (0,5 mM) in Ca^{2+} -freier Normaltyrode beladen. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen dreimal mit Ca^{2+} -Tyrode gewaschen. Zytosolische Ca^{2+} -Level wurden durch Stimulation von HEK 293 Zellen und NRCs für 100 s mit OAG (100 μM) und T3.9 Zellen mit Carbachol (Cch, 300 μM) in Ca^{2+} -freier Normaltyrode gemessen. Anschließend wurden die Zellen mit 2 mM extrazellulärem CaCl_2 in Tyrode perfundiert. Bei den Messungen der NRCs wurde zusätzlich Pyr3 oder Vehikel in die Lösungen gegeben. Die zytosolischen Ca^{2+} -Levels wurden aus dem Fluoreszenzverhältnis von 340 nm zu 380 nm (F_{340}/F_{380}) bestimmt. Die Messungen wurden mit dem "Myocyte and Contractility System" von Ionoptix durchgeführt und die Daten mit der IonWizard 6.3 Software analysiert. Die zytosolischen Ca^{2+} -Level wurden durch Subtraktion des Basiswert vom höchsten Wert nach Ca^{2+} -Zugabe gemessen (Δ Verhältnis F_{340}/F_{380}).

3.7. Elektrophysiologie - Whole Cell Voltage Patch-Clamp Analysen

Die Patch-Clamp-Messungen wurden in Kooperation mit der Medizinischen Universität Graz von PhD Oleksandra Tiapko durchgeführt.

Für die Messungen wurden HEK 293 Zellen auf Deckgläsern ausgesetzt und mit TRPC3-YFP transfiziert oder mit TRPC3-YFP und FKBP52 (aa 280-352) bzw. mit YFP-TRPC3, FKBP52 (aa 280-352) und FKBP52 Volllänge co-transfiziert. Zu Beginn wurden mit dem Mikroskop Axiovert 200 und einer oligochromen Lichtquelle bei 500 nm grün fluoreszierende und damit erfolgreich transfizierte Zellen, bestimmt. Für die Experimente wurden ausschließlich grün fluoreszierende Zellen herangezogen.

Mit der „Whole Cell Voltage Patch-Clamp“ – Methode wurde der Stromfluss und damit die Aktivität des TRPC3-Kanals gemessen. Dafür wurde der Axopatch 200B Amplifier in Verbindung mit dem Digidata-1440A Digitizer verwendet. Die Patch-Clamp-Pipetten wurden mit Hilfe eines Mikropipettenpullers so präpariert, dass sie Pipettenwiderstände von 2-4 M Ω aufwiesen, wenn sie mit der Pipettenlösung befüllt waren. Die extrazelluläre Lösung wurde auf die Zellen gegeben. Mit Kontrolle des Mikroskops wurde die Pipette an die Zelle gebracht und ein Unterdruck angelegt bis der sogenannte Gigaseal entstanden ist und die Zelle geöffnet wurde. So kam es zu einer Verbindung zwischen dem Inneren der Zelle und der Elektrode in der Patchpipette. Die Signale wurden mit 2 kHz gefiltert und mit 8 kHz digitalisiert. Die Software Clampex 11.0 wurde zur Überwachung der Ströme verwendet, die in positiv transfizierten Zellen über eine Spannungsrampe (von -130 bis +80 mV, Haltepotenzial 0 mV) ausgelöst wurden. Nach 20 s wurden 100 μM OAG in extrazellulärer Lösung auf die Zellen gegeben und weitere Spannungsrampen gefahren. Die Stromdichten

bei -90 mV (einwärts) und +70 mV (auswärts) wurden gegen die Zeit aufgetragen und auf die Kapazität normalisiert.

3.8. Statistik

Für alle Datenanalysen werden Mittelwerte (mean) \pm SEM angegeben. Der zweiseitige ungepaarte Student-t-Test wurde verwendet, um signifikante Unterschiede zwischen zwei Gruppen zu analysieren. Signifikante Unterschiede zwischen mehr als zwei Gruppen wurden durch den one-way ANOVA mit der Holm-Sidak-Methode bewertet. Ein two-way ANOVA, gefolgt von der Holm-Sidak-Methode, wurde verwendet, um signifikante Unterschiede festzustellen, wenn Variablen von zwei Faktoren abhängig waren. In Abbildung 17, Abbildung 18 B, und Abbildung 21 C wurde das two-way ANOVA / Holm-Sidak-Verfahren verwendet, um Daten innerhalb der Kontroll- bzw. Stimulationsgruppe zu analysieren. Der zweiseitige ungepaarte Student-t-Test wurde angewendet, um Daten der Kontrollgruppe mit der Behandlungsgruppe zu vergleichen. In Abbildung 14 wurde die Varianzanalyse nach der Dunn-Methode angewendet, um signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen festzustellen. Alle Analysen wurden unter Verwendung von SigmaPlot 13 durchgeführt. $P \leq 0,05$ wurde als signifikant angesehen.

4. ERGEBNISSE

4.1. FKBP52 als Interaktionspartner von TRPC3

In Vorversuchen wurde bereits das Immunophilin FKBP52 als Interaktionspartner von TRPC3 gefunden. Im ersten Schritt sollte dieses Ergebnis des Yeast Two-Hybrid Screens in weiteren Versuchen bestätigt werden. HEK 293 Zellen wurden mit YFP-TRPC3 und HA-FKBP52 (aa 135-459) oder mit der Vektorkontrolle HA-pcDNA3.1 co-transfiziert. Nach Präzipitation von HA-FKBP52 (aa 135-459) und Nachweis von YFP-TRPC3 bzw. FKBP52 (aa 135-459) nach einem Western Blot, konnte nach der Transfektion von FKBP52 (aa 135-459) und YFP-TRPC3 eine Interaktion dieser beiden Proteine bestätigt werden (Abbildung 11 A). Im nächsten Schritt wurden HEK 293 Zellen nur mit YFP-TRPC3 transfiziert. Nach Immunpräzipitation von FKBP52 konnte nach einem Western Blot YFP-TRPC3 detektiert werden. In Kontrolllexperimenten wurde anstatt eines FKBP52-Antikörpers IgG zu den Proben gegeben. Hierbei konnte gezeigt werden, dass YFP-TRPC3 mit endogen exprimiertem FKBP52 interagiert (Abbildung 11 B).

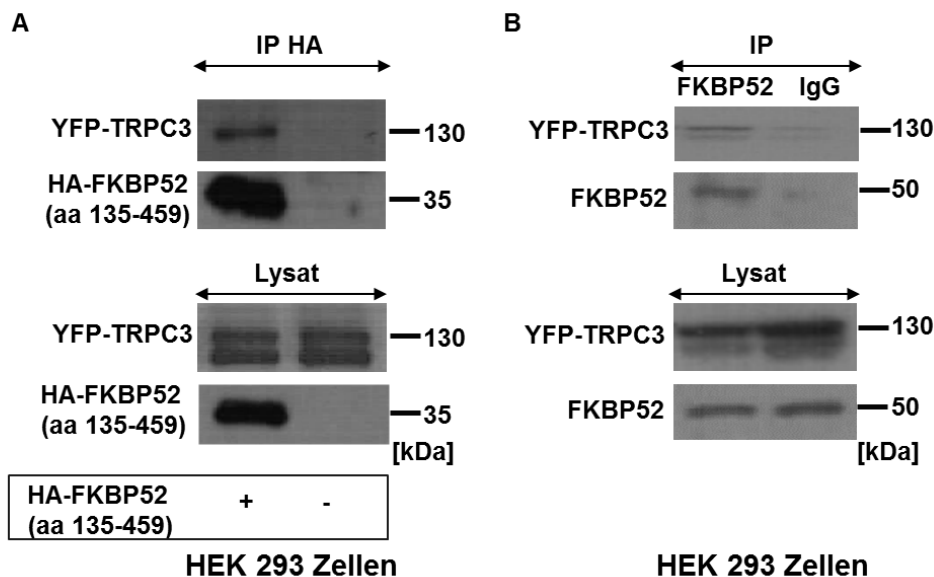


Abbildung 11: Bestätigung der Interaktion zwischen FKBP52 und TRPC3 *in vitro*

(A) HEK 293 Zellen wurden mit HA-FKBP52 (aa 135-459) oder der Vektorkontrolle (HA-pcDNA3.1) zusammen mit YFP TRPC3 co- transfiziert. Um die Interaktion zu untersuchen, wurde HA-FKBP52 (aa 135-459) mit Co-IP Experimenten immunpräzipitiert. Nach der Co-IP und im Lysat wurden jeweils YFP-TRPC3 und HA-FKBP52 detektiert. (B) HEK 293 Zellen wurden mit YFP-TRPC3 transfiziert. Die Co-IP wurde mit FKBP52 oder als Kontrolle mit IgG durchgeführt. YFP-TRPC3 und FKBP52 wurden in den Proben nach Co-IP und in den Lysaten detektiert. So wurde die Interaktion zwischen TRPC3 und endogen exprimiertem FKBP52 nachgewiesen. Es ist jeweils ein repräsentativer Blot aus drei unabhängigen Experimenten dargestellt (geändert nach (Bandleon et al., 2019)).

Nach diesen *in vitro* Versuchen sollte die Interaktion auch *in vivo* nachgewiesen werden. Mausherzen wurden hierfür lysiert und Co-IPs mit diesen Proben durchgeführt. Endogenes FKBP52 wurde immunpräzipitiert und FKBP52 und TRPC3 nach einem Western Blot detektiert. In Kontrolleexperimenten wurden die Co-IPs mit IgGs durchgeführt und ebenfalls die beiden Proteine detektiert. Auch *in vivo* war eine Interaktion der endogen exprimierten Proteine FKBP52 und TRPC3 im Herzen zu erkennen (Abbildung 12).

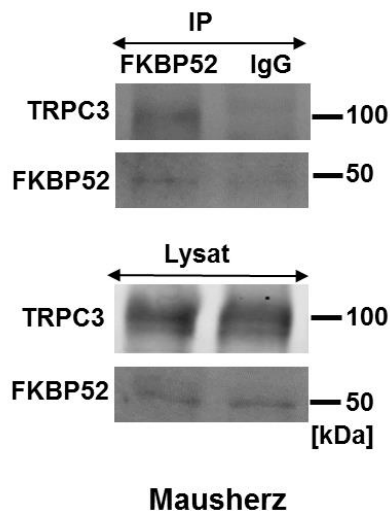


Abbildung 12: Bestätigung der Interaktion zwischen FKBP52 und TRPC3 *in vivo*

In Mausherzlysaten wurde die Interaktion zwischen FKBP52 und TRPC3 untersucht. FKBP52 wurde in Co-IP Experimenten präzipitiert. IgGs wurden als Kontrolle verwendet. TRPC3 sowie FKBP52 wurden jeweils nach der Co-IP und in den Lysaten detektiert. Es ist ein repräsentativer Blot von drei unabhängigen Experimenten dargestellt (geändert nach (Bandleon et al., 2019)).

Aus diesen Versuchen und den Vorversuchen mit dem Yeast Two-Hybrid Screen lässt sich zusammenfassend sagen, dass FKBP52 *in vitro* und *in vivo* mit TRPC3 interagiert. Die Bindestelle in TRPC3 liegt C-terminal, neben der bisher bekannten klassischen FKBP-Bindestelle. Welche FKBP52-Domänen für die Interaktion mit TRPC3 verantwortlich sind, wurde im weiteren Verlauf bestimmt.

4.2. Proteinstrukturen von FKBP52, welche die Interaktion mit TRPC3 vermitteln

Im nächsten Schritt wurde die Interaktion von FKBP52 mit TRPC3 genauer untersucht. Von Interesse war, welche Proteinstrukturen von FKBP52 mit TRPC3 interagieren. Dafür wurden fünf Konstrukte erstellt, die ein N-terminales HA-Tag und jeweils eine unterschiedliche Region der FKBP52 cDNA enthielten: aa 1-138 (PPIase/FK506 Domäne), aa 139-253 (FK2 Domäne), aa 230-303 (FK2 und TPR1), aa 280-352 (TPR1 und TPR2), aa 352-459 (TPR3

mit der R358Q Mutation, die der Klon des Yeast Two-Hybrid Screens enthielt (Markierung der Mutation: mit rotem Stern) und das C-terminale Ende von FKBP52) (Abbildung 13). Diese Fragmente wurden für die anschließende Untersuchung der Interaktion zwischen TRPC3 und FKBP52 sowie für weitere Versuche verwendet.

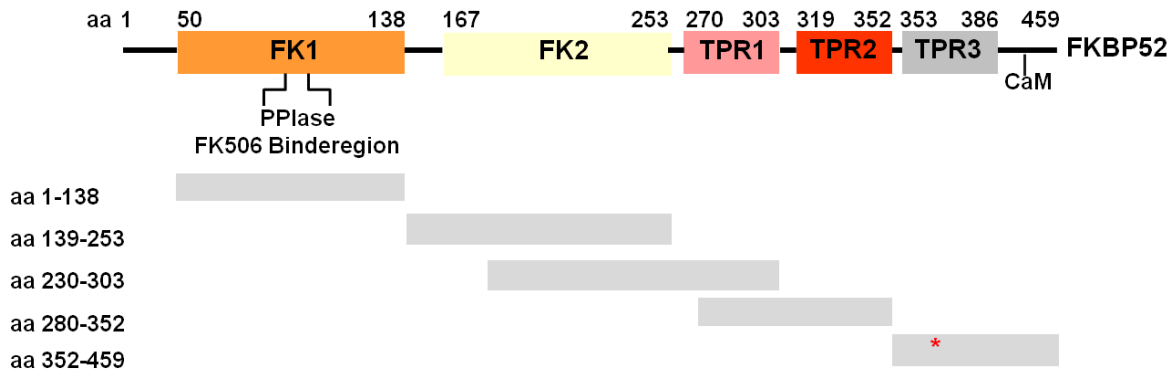


Abbildung 13: Klonierte FKBP52-Bruchstücke, die für weitere Versuche herangezogen wurden

Proteinstruktur von FKBP52 mit den klonierten Fragmenten, die für Co-IP Experimente in HEK 293 Zellen verwendet wurden. FKBP52 besteht aus folgenden Domänen: FK1 mit der PPlase und der FK506 Binderegion, FK2, drei Tetratricopeptid (TPR) Wiederholungen (TPR1-3) und dem C-Terminus mit einer Calmodulin (CaM) Bindestelle. Der rote Stern markiert die Punktmutation R358Q in dem über den Yeast Two-Hybrid Screen gefundenen Klon (geändert nach (Bandleon et al., 2019)).

Um die Interaktion der einzelnen Bruchstücke mit TRPC3 zu untersuchen, wurden Co-IP Experimente durchgeführt. Hierfür wurden HEK 293 Zellen mit YFP-TRPC3 und einem dieser FKBP52-Bruchstücke mit HA-Tag co-transfiziert. Die Co-IPs wurden unter Verwendung eines HA-Antikörpers zur Präzipitation der verschiedenen Bruchstücke durchgeführt. Nach anschließendem Western Blot wurde YFP-TRPC3 in den IP-Proben sowie YFP-TRPC3 und HA in den Lysaten detektiert. Die Daten zeigten eine Interaktion zwischen TRPC3 und den FKBP52-Fragmenten aa 1-138, aa 139-253, aa 230-303 und aa 280-352. Das C-terminale FKBP52-Fragment (aa 352-459), welches die Mutation in TRP3 und die Calmodulin-Bindestelle enthält, zeigte keine Interaktion mit TRPC3 (Abbildung 14 A und B).

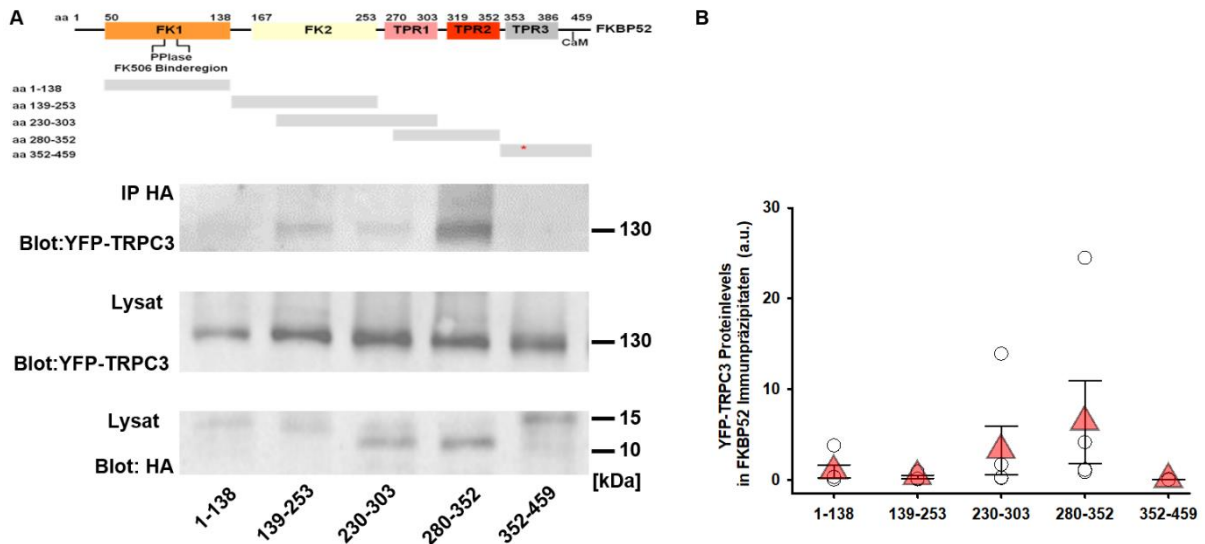


Abbildung 14: Interaktion der FKBP52-Bruchstücke mit TRPC3

(A) FKBP52-Fragmente mit HA-Tag (aa 1-138, 139-253, 230-303, 280-352, 352-459mut) wurden zusammen mit YFP-TRPC3 in HEK 293 Zellen exprimiert. Co-IPs wurden mit HA-Antikörper durchgeführt. Die Proteine wurden mit YFP- oder HA-Antikörpern detektiert. Die Abbildung zeigt einen repräsentativen Blot aus drei unabhängigen Experimenten. (B) Proteinexpression von YFP-TRPC3 nach Co-IPs mit verschiedenen FKBP52-HA-Fragmenten. *P < 0,05 vs. 352-459 (Varianzanalyse für Ränge nach der Dunn's Methode), n = 5, mean ± s.e.m (geändert nach (Bandleon et al., 2019)).

Um die Interaktion abschließend noch genauer zu charakterisieren, sollte untersucht werden, ob die Mutation in der TPR-Domäne der Grund für die fehlende Bindung zwischen FKBP52 (aa 352-459) und TRPC3 war. Die Mutation wurde mit Hilfe des QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit von Agilent zurückmutiert. Dadurch entstand ein FKBP52-Fragment, welches der cDNA des Wildtyps entspricht. HEK 293 Zellen wurden mit der Vektorkontrolle (HA Ktrl), FKBP52 (aa 352-459; Mutation (R358Q)) bzw. FKBP52 (aa 352-459; Wildtyp (wild)) und YFP-TRPC3 co-transfiziert. Nach Co-IP mit einem HA-Antikörper konnte man im Western Blot erkennen, dass es auch nach Rückmutation keine Interaktion des Bruchstücks mit TRPC3 gab (Abbildung 15).

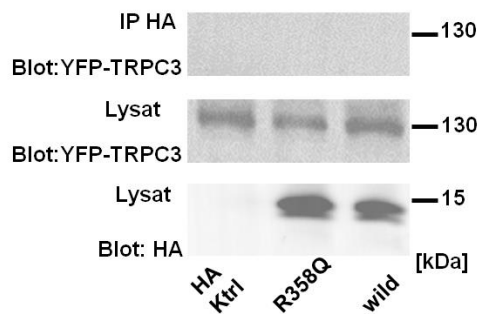


Abbildung 15: Interaktion von FKBP52 (aa 352-459) mit TRPC3

Co-IPs von YFP-TRPC3 in Lysaten von HEK 293 Zellen, die YFP-TRPC3 mit HA-FKBP52 (aa 352-459; Mutation (R358Q)), HA-FKBP52 (aa 352-459; Wildtyp (wild)) oder HA-Vektorkontrolle (HA Ktrl)

exprimierten. Die Co-IP wurde mit einem HA-Antikörper durchgeführt. Die Proteine wurden mit YFP- oder HA-Antikörper detektiert. Die Abbildung zeigt einen repräsentativen Blot aus drei unabhängigen Experimenten (geändert nach (Bandleon et al., 2019)).

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass verschiedene Regionen, darunter die FK1-, FK2-, TPR1- und TPR2-Domäne von FKBP52 mit TRPC3 interagieren. TPR3 und die C-terminale Region von FKBP52 sind unabhängig von der Mutation nicht mit TRPC3 assoziiert.

4.3. Hypertrophe Effekte

Es ist bereits bekannt, dass TRPC3 in der pathologischen Hypertrophie des Herzens eine wichtige Rolle spielt. Deshalb wurden Experimente durchgeführt, die überprüfen sollten, ob eine Abhängigkeit zwischen FKBP52 und den pro-hypertrophen Effekten von TRPC3 besteht.

4.3.1. FKBP52 beeinflusst TRPC3-abhängige hypertrophe Effekte in neonatalen Rattenkardiomyozyten

Zunächst wurde das hypertrophe Wachstum von NRCs untersucht, die mit FKBP52 siRNA und mit dem TRPC3 Inhibitor Pyr3 behandelt wurden (Abbildung 16 A und B).

Die Downregulation von FKBP52 durch FKBP52 siRNA wurde im Western Blot bestätigt. NRCs wurden 72 h mit FKBP52 siRNA bzw. Scr siRNA behandelt. Anschließend wurden Proteine isoliert und ein Western Blot durchgeführt. Bei gleichbleibender Ladekontrolle (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase, GAPDH) war FKBP52 nach Transfektion mit FKBP52 siRNA in NRCs downreguliert (Abbildung 16 A).

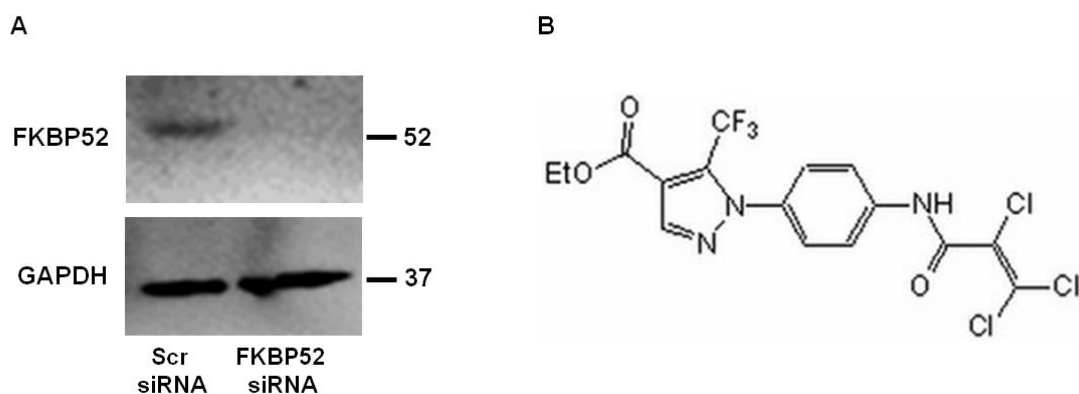


Abbildung 16: Downregulation von FKBP52 und Hemmung von TRPC3 mit Pyrazol 3

(A) NRCs wurden mit FKBP52 siRNA oder Scramble siRNA (Scr siRNA) transfiziert. Die Downregulation von FKBP52 wurde nach einem Western Blot durch Detektion von FKBP52 gezeigt. Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) wurde als Ladekontrolle herangezogen. (B)

Strukturformel von Pyrazol 3 (Pyr3). Pyr3 wurde als TRPC3-Inhibitor verwendet (geändert nach (Bandleon et al., 2019)).

Anschließend wurde das hypertrophe Wachstum von NRCs durch Stimulation des G_qPCR mit PE in Abhängigkeit von TRPC3 und FKBP52 untersucht. Dafür wurden die Zellen, nach Downregulation von FKBP52 durch FKBP52 siRNA, 24 h mit 50 µM PE stimuliert und mit 10 µM Pyr3 behandelt, um die Hypertrophie zu induzieren und TRPC3 zu inhibieren. Zur Kontrolle wurden die Zellen mit Scr siRNA und Vehikel behandelt. Anschließend wurden die Zellen fixiert, mit α-Actinin Antikörper und DAPI gefärbt und nach mikroskopischen Aufnahmen (Abbildung 17 A) die Zellflächen bestimmt. In Abbildung 17 B ist die durchschnittliche Zellfläche von unterschiedlich behandelten NRCs zusammengefasst.

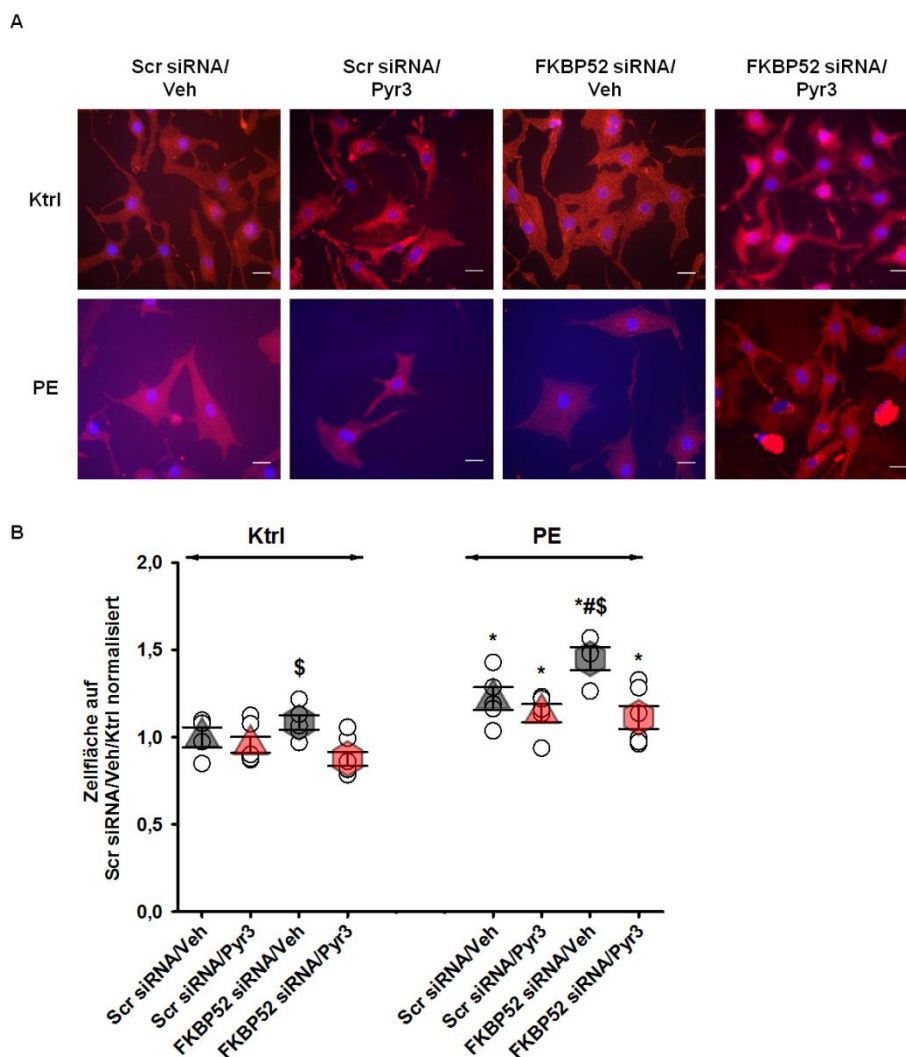


Abbildung 17: TRPC3-Inhibition vermindert die durch Downregulation von FKBP52-induzierte Hypertrophie

(A) Das hypertrophe Wachstum von NRCs wurde durch Messen der Zellflächen nach 24 h Phenylephrin- (PE; 50 µM) oder Kontroll- (Ktrl) Stimulation bestimmt. Die Zellen wurden zusätzlich mit FKBP52 siRNA oder Scramble siRNA (Scr siRNA) und 10 µM Pyrazol 3 (Pyr3) oder Vehikel (Veh)

behandelt. Rot: α -Actinin, blau: DAPI, Maßstab: 20 μ M. Die Aufnahmen wurden mit einem 63 x Ölobjektiv gemacht. (B) Quantifizierung der Zellgrößen in Relation zu Scr siRNA/Veh/Ktrl. *P < 0,05 vs. jeweilige Ktrl-Stimulation, #P < 0,05 vs. Scr siRNA/Veh/PE, §P < 0,05 vs. FKBP52 siRNA/Pyr3/Ktrl. bzw. PE (two-way ANOVA mit Holm-Sidak Methode und ungepaartem t-Test), n = 4-7, mean \pm s.e.m (geändert nach (Bandleon et al., 2019)).

Wie in Abbildung 17 A und B zu sehen ist, führte die Stimulation mit PE zu einer Vergrößerung der NRCs um ca. 30 % im Vergleich zur Ktrl. Dieses verstärkte Wachstum der NRCs nach PE-Stimulation war nach Downregulation von FKBP52 nochmals signifikant erhöht. Die NRCs zeigten danach eine um 20 % vergrößerte Zellfläche im Vergleich zur Behandlung mit Scr siRNA (vgl. graues Dreieck mit grauem Sechseck). Als die Zellen zusätzlich mit dem TRPC3-Inhibitor Pyr3 behandelt wurden, zeigten sich in der Scr siRNA Gruppe keine signifikanten Veränderungen im hypertrophen Wachstum (vgl. graue Dreiecke mit roten Dreiecken). Dagegen hatten NRCs mit downregulierten FKBP52-Levels eine um durchschnittlich ca. 30 % signifikant reduzierte Zellgröße nach Behandlung mit Pyr3 im Vergleich zu Veh. Dieser Effekt ist in der Ktrl-Gruppe und nach PE Stimulation sichtbar (vgl. graue Sechsecke mit roten Sechsecken). Die Ergebnisse zeigten, dass die Inhibition von TRPC3 nur bei verringerten FKBP52 Levels zu einem verringerten hypertrophen Wachstum führte. Bei normaler Proteinexpression von FKBP52 war durch die Inhibition von TRPC3 das hypertrophe Wachstum der NRCs unbeeinflusst.

TRPC3-Kanäle sind funktionell und strukturell mit TRPC6-Kanälen verwandt und bilden zusammen funktionsfähige Komplexe. Weiterhin ist ebenfalls eine Beteiligung von TRPC6 im hypertrophen Krankheitsgeschehen bereits bekannt (Onohara et al., 2006). Aufgrund der strukturellen Verwandtschaft und der Bedeutung beider Proteine in der kardialen Pathologie, lag die Vermutung nahe, dass FKBP52 auch den hypertrophen Effekt von TRPC6 hemmt. Um dies genauer zu untersuchen, wurden weitere Experimente in NRCs durchgeführt, in denen TRPC6 mit Hilfe von Adenoviren überexprimiert und FKBP52 downreguliert wurde. Zusätzlich wurden die Zellen 24 h mit 50 μ M PE stimuliert. Auch hier wurde nach Fixierung und Färbung der Zellen mit α -Actinin und DAPI nach mikroskopischen Aufnahmen (Abbildung 18 A) die durchschnittliche Zellfläche bestimmt (Abbildung 18 B).

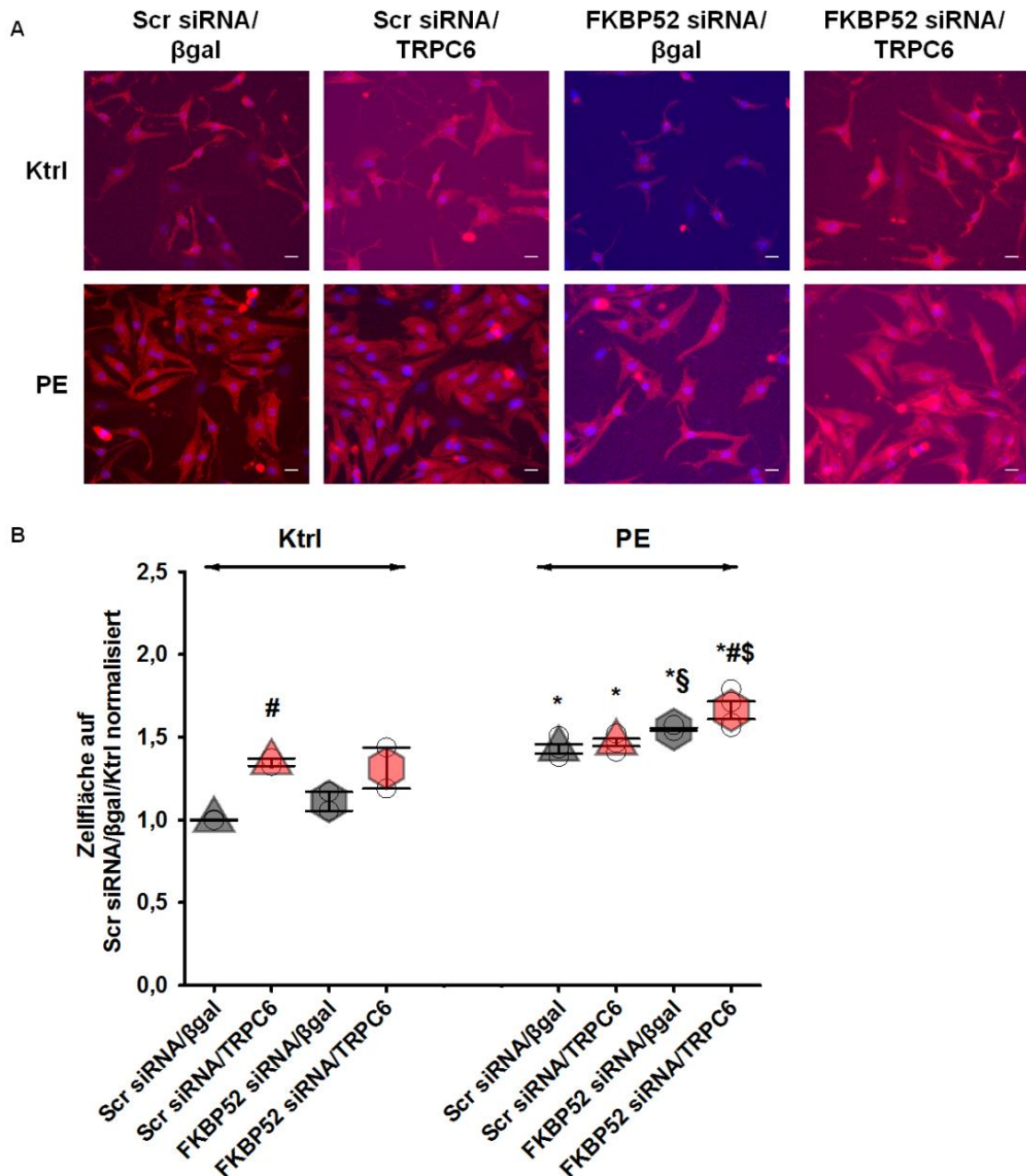


Abbildung 18: Downregulation von FKBP52 führt zu einer erhöhten hypertrophen Antwort in NRCs, die durch TRPC6 induziert wird

(A) NRCs wurden mit Adenoviren, die für β -Galactosidase (β gal) oder TRPC6 codieren, transduziert. Außerdem wurden die Zellen zusätzlich mit FKBP52 siRNA oder Scramble siRNA (Scr siRNA) transfiziert. Das hypertrophe Wachstum von NRCs wurde als eine Vergrößerung der Zellflächen nach 24 h Phenylephrin- (PE; 50 μ M) oder Kontroll- (Ktrl) Stimulation bestimmt. Rot: α -Actinin, Blau: DAPI, Maßstab: 20 μ m. Die Aufnahmen wurden mit einem 40 x Objektiv gemacht. (B) Quantifizierung der Zellflächen in Relation zu Scr siRNA/ β gal/Ktrl. *P < 0,05 vs. jeweilige Ktrl-Stimulation, #P < 0,05 vs. Scr siRNA/ β gal/Ktrl bzw. FKBP52 siRNA/ β gal/PE, \$P < 0,05 vs. Scr siRNA/ β gal/PE, §P < 0,05 vs. FKBP52 siRNA/ β gal/PE (two-way ANOVA mit Holm-Sidak Methode und ungepaartem t-Test), n = 2-4, mean \pm s.e.m (geändert nach (Bandleon et al., 2019)).

Die Überexpression von TRPC6 führte bei Kontrollbedingungen zu einer signifikant erhöhten Hypertrophie in NRCs. Die Zellen zeigten nach Behandlung mit Scr siRNA, ohne Stimulation und nach Überexpression von TRPC6 eine um 35 % vergrößerte Zellfläche im Vergleich zur Kontrolle mit β gal (vgl. graues Dreieck mit rotem Dreieck). Nach Stimulation mit PE und Überexpression von TRPC6 kam es nach zusätzlicher Downregulation von FKBP52 zu einem um 15 % erhöhten Wachstum der NRCs im Vergleich zu Scr siRNA Bedingungen (vgl. rotes Dreieck mit rotem Sechseck) (Abbildung 18).

Die vorherigen Ergebnisse zeigten, dass es eine funktionelle Verbindung zwischen TRPC3 und FKBP52 gibt. Hier ist zu sehen, dass TRPC6 dabei auch eine Rolle spielen kann, entweder durch eine direkte Interaktion mit FKBP52 oder aber auch indirekt durch eine Heterodimerisierung mit TRPC3.

Der pro-hypertrophe Effekt auf die NRCs, der nach Downregulation von FKBP52 zu sehen war, kann auch auf TRPC-unabhängige Mechanismen zurückzuführen sein. Die Hypertrophie umfasst auch Veränderungen im Cytoskelett und dabei insbesondere die Stabilisierung der Mikrotubuli. Da bereits gezeigt wurde, dass FKBP52 mit Tubulin interagiert (Chambraud, Belabes, Fontaine-Lenoir, Fellous, & Baulieu, 2007), wurden Cytoskelettfractionen von NRCs nach 24 h PE Stimulation (50 μ M) auf die Expression von Tubulin untersucht (Abbildung 19 A und B).

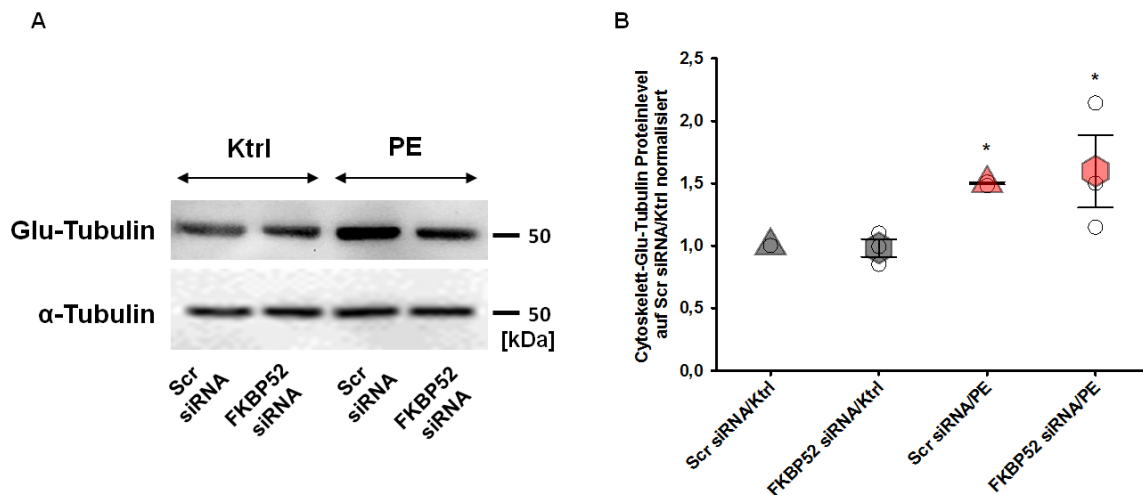


Abbildung 19: Die Stabilisation von Microtubuli ist durch die Downregulation von FKBP52 während hypertropher Stimulation unbeeinflusst

(A) Western Blot Analyse von α -Tubulin und Glu-Tubulin Expressionslevels in Cytoskelettextrakten von NRCs nach 24 h Phenylephrin- (PE; 50 μ M) oder Kontroll- (Ktrl) Stimulation. Die Zellen wurden mit FKBP52 siRNA oder Scramble siRNA (Scr siRNA) transfiziert. (B) Quantifizierung der Proteinlevels in Relation zu Scr siRNA/Ktrl. *P < 0,05 vs. Scr siRNA/Ktrl bzw. FKBP52 siRNA/Ktrl (two-way ANOVA mit Holm-Sidak Methode), n = 3, mean \pm s.e.m (geändert nach (Bandleon et al., 2019)).

Die Stabilisierung der Mikrotubuli ist durch eine erhöhte Detyrosinierung von α -Tubulin charakterisiert. Detyrosinierung ist eine posttranslationale Modifikation, bei welcher das C-terminale Tyrosin von α -Tubulin entfernt wird und einen Glutaminrest am C-Terminus zurücklässt (Glu-Tubulin) (Fassett et al., 2009).

Die Western Blot Experimente (Abbildung 19) der Cytoskelettfractionen zeigten nach Stimulation mit PE eine Zunahme der Expression von Glu-Tubullin, was für eine erhöhte Stabilisierung von Tubulin und damit für eine gesteigerte Hypertrophie spricht. Jedoch konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen FKBP52 siRNA und Scr siRNA transfizierten NRCs beobachtet werden.

4.3.2. Verkürzte FKBP52 Mutanten fördern Hypertrophie in Kardiomyozyten

Es ist bereits bekannt, dass FKBP52 mit verschiedenen Regionen von Steroidrezeptoren interagieren und diese auch über unterschiedliche Bereiche regulieren können (Sivils et al., 2011).

Wie in Kapitel 4.2 gezeigt wurde, interagiert TRPC3 auch mit verschiedenen Domänen von FKBP52. Daher ist es von Interesse, welche FKBP52-Domäne für die Regulation von TRPC3 verantwortlich ist. Die TRP-Region könnten die Verbindung mit TRPC3 vermitteln und die funktionelle PPlase-Region, die TRPC3-Aktivität sowie die nachgeschalteten hypertrophen Signalwege beeinflussen. Um dies zu untersuchen, wurden Adenoviren hergestellt, die für zwei unterschiedliche PPlase-defiziente FKBP52-Fragmente codieren: FKBP52 (aa 135-459) und FKBP52 (aa 280-352) (Abbildung 20).

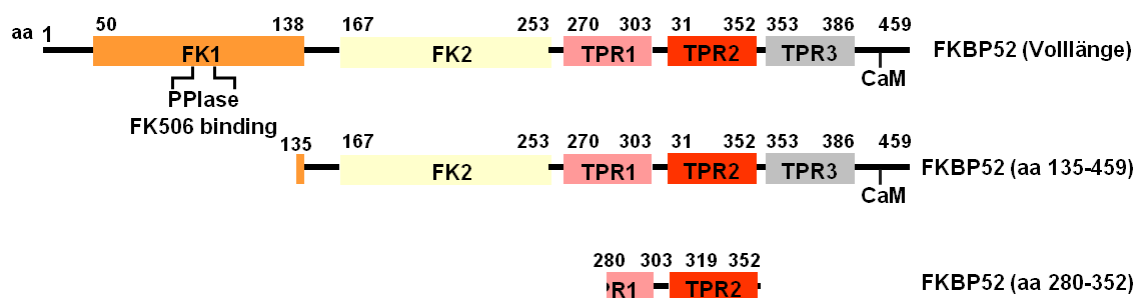


Abbildung 20: Verwendete FKBP52 Adenoviren im Vergleich

FKBP52 (aa 135-459) fehlt bis auf drei Aminosäuren, die FK1-Domäne mit PPlase und der FK506-Binderegion. FKBP52 (aa 280-352) ist dagegen ein kurzes Fragment, bestehend aus einem Teil der TPR1-Domäne und der kompletten TPR2-Domäne. Beide Adenoviren sind im Vergleich zu FKBP52 (Volllänge) dargestellt.

NRCs wurden mit einer MOI von 50 - 100 mit dem PPlase-defizienten FKBP52-Fragment FKBP52 (aa 135-459) oder β gal als Kontrolle transduziert. Nach der Transduktion wurden die Zellen 24 h mit PE (50 μ M) oder dem DAG-Analogen OAG (100 μ M), welches ein direkter

Aktivator von TRPC3 ist (Tiapko & Groschner, 2018), stimuliert. Zusätzlich wurden die Zellen mit 10 μ M Pyr3 behandelt. Die NRCs wurden anschließend fixiert, mit α -Actinin und DAPI gefärbt und zum Schluss, nach mikroskopischen Aufnahmen (Abbildung 21 B), die Zellflächen (Abbildung 21 C) bestimmt.

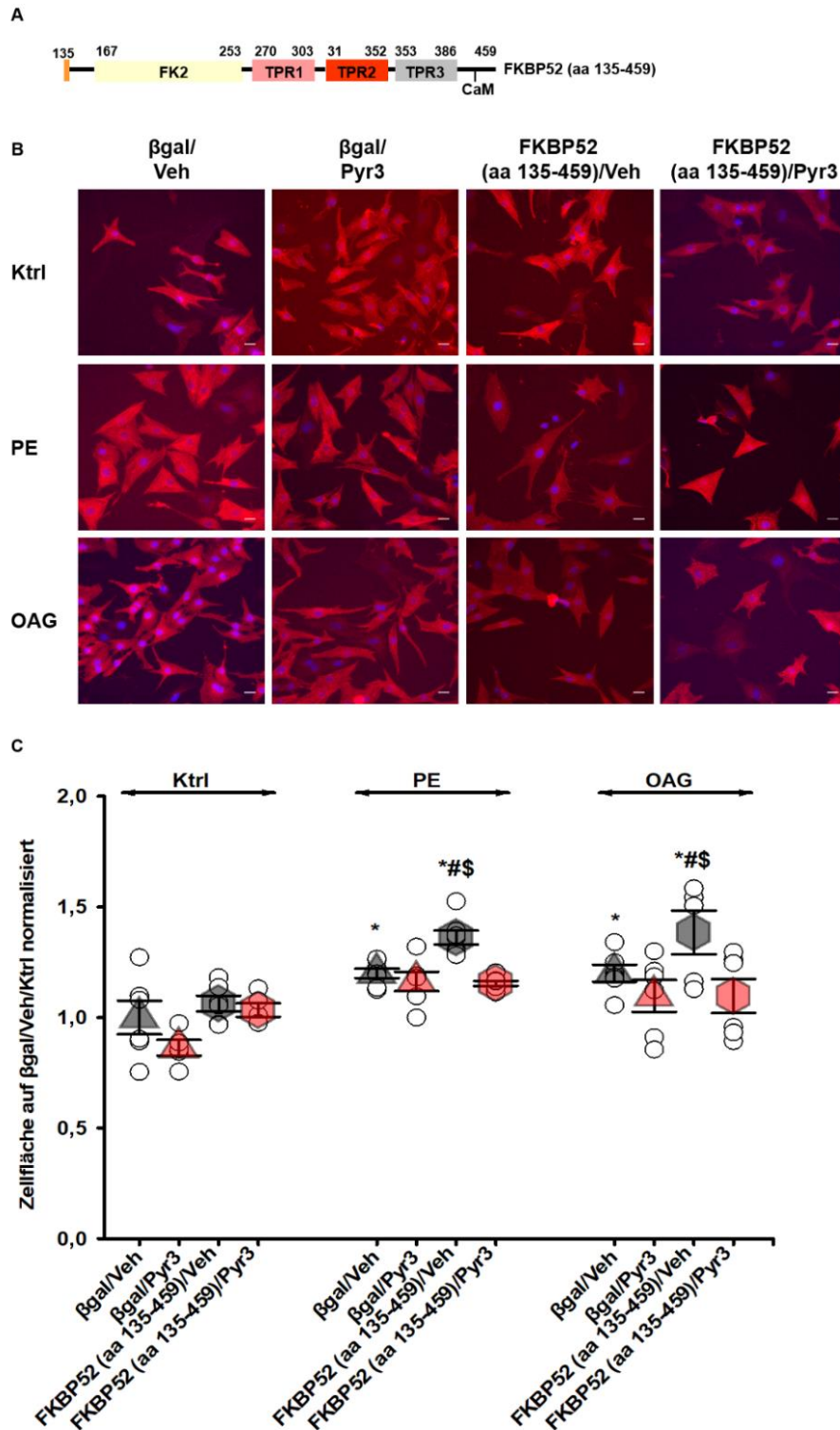


Abbildung 21: Überexpression von FKBP52 (aa 135-459) fördert die Hypertrophie in NRCs

(A) Schema des Adenovirus, der bei diesen Experimenten eingesetzt wurde. (B) NRCs wurden mit Adenoviren, die β -Galactosidase (β gal) oder FKBP52 (aa 135-459) codieren, transduziert und mit

Pyrazol 3 (Pyr3, 10 μ M) oder Vehikel (Veh) behandelt. Die Zellflächen wurde nach 24 h Phenylephrin- (PE, 50 μ M), 1-Oleoyl-2-acetyl-sn-glycerol- (OAG, 100 μ M) oder Kontroll- (Ktrl) Stimulation bestimmt. Rot: α -Actinin, blau: DAPI, Maßstab: 20 μ M. Die Aufnahmen wurden mit eine 40 x Objektiv gemacht. (C) Quantifizierung der Zellflächen in Relation zu β gal/Veh. *P < 0,05 vs. jeweilige Ktrl Stimulation, #P < 0,05 vs. β gal/Veh/PE bzw. OAG, \$P < 0,05 vs. FKBP52 (aa 135-459)/Pyr3 (two-way ANOVA mit Holm-Sidak Methode und ungepaartem t-Test), n = 5-7, mean \pm s.e.m (geändert nach (Bandleon et al., 2019)).

Wie in Abbildung 21 zu erkennen ist, kam es nach Expression von FKBP52 (aa 135-459) und Stimulation mit PE oder OAG zu signifikant erhöhten Zellflächen. Nach Stimulation mit PE waren die Zellen, die FKBP52 (aa 135-459) exprimierten, um 15 % größer im Vergleich zu den β gal-Kontrollbedingungen (vgl. PE: graues Dreieck mit grauem Sechseck). Nach Stimulation mit OAG konnte der gleiche Effekt gesehen werden. Auch hier zeigten die Zellen, die das FKBP52-Fragment exprimierten, eine um 15 % größere Zellfläche als die NRCs, die mit β gal transduziert wurden (vgl. OAG: graues Dreieck mit grauem Sechseck) (Abbildung 21 B und C). Wenn die Zellen zusätzlich mit Pyr3 behandelt wurden, blieb der pro-hypertrophe Effekt, welcher unter Stimulationsbedingungen und Expression von FKBP52 (aa 135-459) zu erkennen war, aus. Die Zellen zeigten nach Pyr3-Behandlung ein um etwa 20 % kleineres Zellwachstum als nach Vehikel-Behandlung (vgl. PE, OAG: graues Sechseck mit rotem Sechseck) (Abbildung 21 B und C).

Anschließend war es von größerem Interesse zu sehen, ob ARCs in gleicherweise auf die Expression von FKBP52 (aa 135-459) reagieren würden wie NRCs. ARCs wurden isoliert, anschließend mit FKBP52 (aa 135-459) Adenoviren und zur Kontrolle mit β gal Adenoviren transduziert und mit 50 μ M PE für 24 h stimuliert. Die Zellen wurden fixiert, mikroskopiert (Abbildung 22 A) und zum Schluss die Größe der Zellen (Abbildung 22 B) bestimmt.

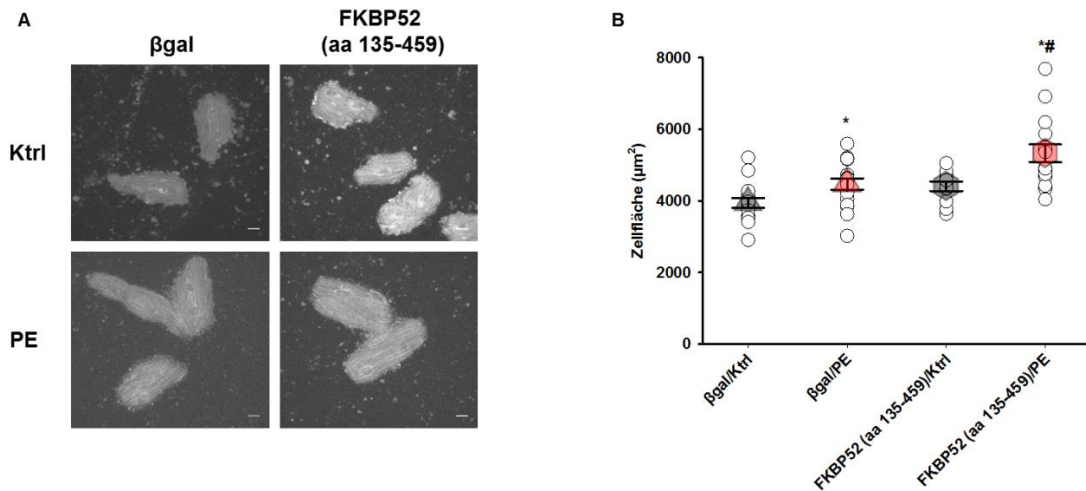


Abbildung 22: Überexpression von FKBP52 (aa 135-459) fördert die Hypertrophie in ARCs

(A) ARCs wurden mit β -Galactosidase (β gal) oder FKBP52 (aa 135-459) transduziert und das hypertrophe Wachstum nach 24 h Phenylephrin- (PE, 50 μ M) oder Kontroll- (Ktrl) Stimulation bestimmt. Maßstab: 20 μ M. Die Aufnahmen wurden mit einem 40 x Objektiv gemacht. (B) Quantifizierung der Zellflächen in Relation zu β gal/Ktrl. *P < 0,05 vs. jeweilige Ktrl Stimulation, #P < 0,05 vs. β gal/PE (two-way ANOVA mit Holm-Sidak Methode), n = 11-17 Zellen, mean \pm s.e.m (geändert nach (Bandleon et al., 2019)).

Die Stimulation mit PE führte auch bei ARCs zu einem um 15 % erhöhten Zellwachstum im Vergleich zu Ktrl (vgl. graues Dreieck mit rotem Dreieck).

Auch die Expression von FKBP52 (aa 135-459) führte bei ARCs zu einem signifikant erhöhten Zellwachstum unter Stimulationsbedingungen. Die Zellen, die das FKBP52-Fragment exprimierten, waren nach Stimulation um 20 % größer als die Zellen der β gal-Kontrollgruppe (vgl. rotes Dreieck mit rotem Sechseck) (Abbildung 22).

Um andere GPCR Signalwege zu untersuchen, die Einfluss auf TRPC3-Kanäle haben, wurden Zellen auch mit Ang II stimuliert (Onohara et al., 2006). NRCs wurden mit FKBP52 (aa 135-459) Adenoviren transduziert und anschließend mit 100 nM Ang II stimuliert (Abbildung 23). Da bereits bekannt ist, dass das Immunsuppressivum FK506 an FKBP52 bindet und dadurch Calcineurin inhibiert (Harding et al., 1989; Liu et al., 1991), wurde in einem weiteren Versuch der Effekt von FK506 untersucht. Dafür wurden die Zellen mit 2 μ M FK506 behandelt (Abbildung 23 C). Für die Untersuchung des hypertrophen Wachstums wurden, nachdem die Zellen fixiert und mit α -Actinin und DAPI gefärbt waren, anhand mikroskopischer Aufnahmen, die Zellflächen bestimmt (Abbildung 23 A und B). Für die Bestimmung des hypertrophen Markers ANP (Abbildung 23 C und D) wurde aus NRCs RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und qPCR Experimente durchgeführt.

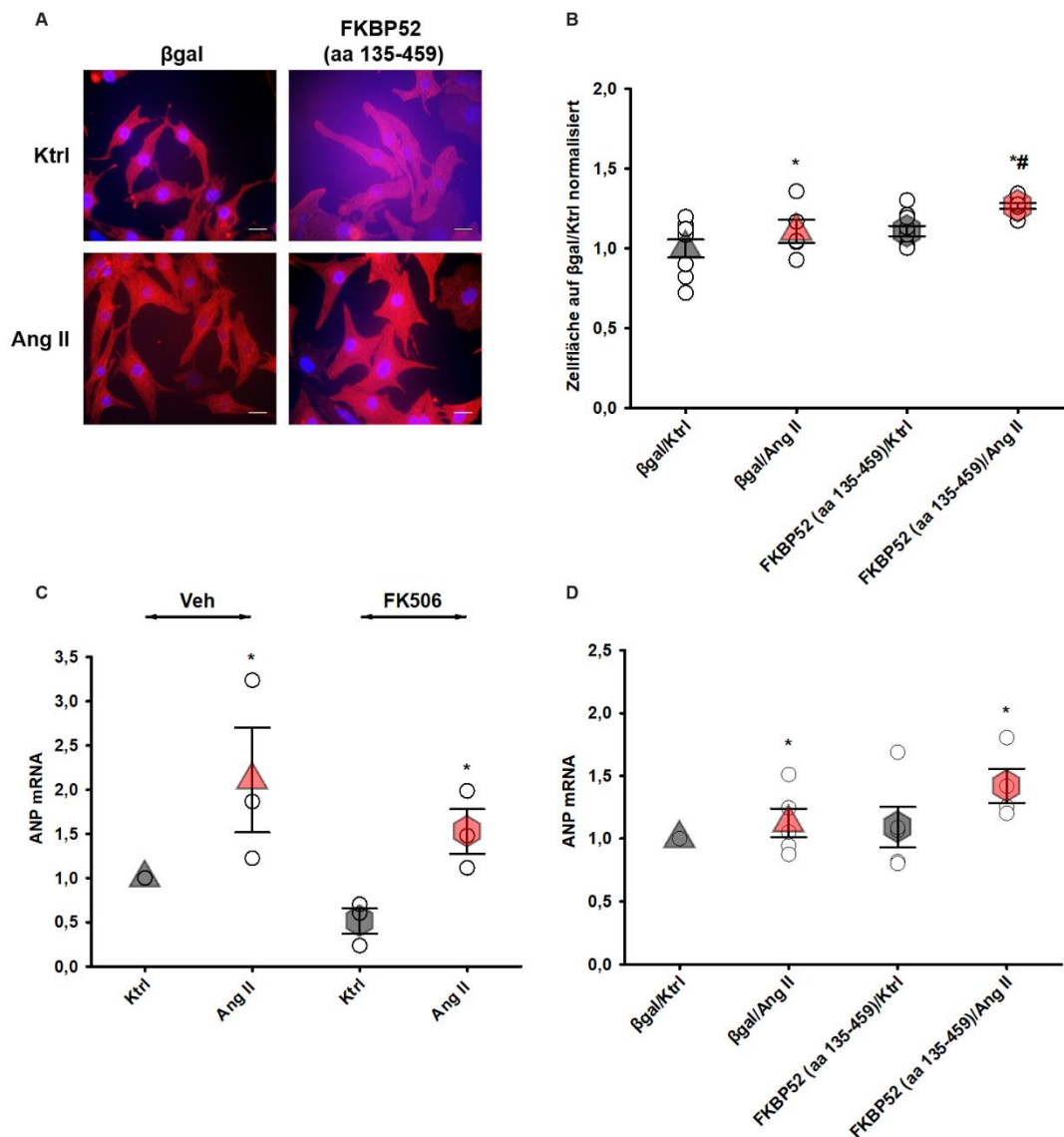


Abbildung 23: FKBP52 (aa 135-459) beeinflusst, im Gegensatz zu FK506, die durch Angiotensin II induzierte hypertrophe Antwort

(A) NRCs wurden mit Adenoviren, die β -Galactosidase (β gal) oder FKBP52 (aa 135-459) codieren, transduziert. Die Zellflächen wurde nach 24 h Angiotensin II- (Ang II, 100 nM), oder Kontroll- (Ktrl) Stimulation bestimmt. Rot: α -Actinin, blau: DAPI, Maßstab: 20 μ M. Die Aufnahmen wurde mit einem 63 x Öbobjektiv gemacht. (B) Quantifizierung der Zellflächen nach 24 h Ang II (100 nM) oder Ktrl-Stimulation. NRCs wurden mit FKBP52 (aa 135-459) oder zur Kontrolle mit β gal transduziert. Die Daten sind in Relation zu β gal/Ktrl dargestellt. *P < 0,05 vs. β gal/Ktrl, #P < 0,05 vs. β gal/Ang II (two-way ANOVA mit Holm-Sidak Methode), n = 5-9, mean \pm s.e.m. (C) mRNA Levels des atrialen natriuretischen Peptids (ANP) in NRCs wurden nach 24 h Ang II- (100 nM) oder Ktrl-Stimulation bestimmt. Zusätzlich wurden die Zellen für 24 h mit FK506 (2 μ M) oder Vehikel (Veh) stimuliert. Die Daten sind in Relation zu Ktrl dargestellt. *P < 0,05 vs. Ktrl (two-way ANOVA mit Holm-Sidak Methode), n = 3, mean \pm s.e.m. (D) mRNA Levels von ANP wurden nach 24 h Ang II- (100 nM) oder Ktrl-Stimulation mit Hilfe von qPCR Experimenten bestimmt. NRCs wurden mit FKBP52 (aa 135-459) oder β gal zur Kontrolle transduziert. Die Daten sind in Relation zu β gal/Ktrl dargestellt. *P < 0,05 vs.

β gal bzw. FKBP52 (aa 135-459)/Ktrl (two-way ANOVA mit Holm-Sidak Methode), n = 4-5, mean \pm s.e.m (geändert nach (Bandleon et al., 2019)).

Wie in Abbildung 23 zu sehen ist, wurde das hypertrophe Wachstum auch durch Ang II induziert. Dies war durch eine um 10 % vergrößerte Zellfläche und eine um 12 % erhöhte ANP Expression zu erkennen (vgl. graues Dreieck mit rotem Dreieck in Abbildung 23 B und D). Nach Stimulation mit Ang II kam es ebenfalls durch die Expression von FKBP52 (aa 135-459) zu einem um 15 % erhöhtem hypertrophen Wachstum und zu einer um 30 % erhöhten Expression von ANP im Vergleich zur Kontrollbedingung mit β gal (vgl. rotes Dreieck mit rotem Sechseck in Abbildung 23 B und D). Die Behandlung der NRCs mit FK506 führte hingegen zu verringerten ANP-Levels im Vergleich zur Vehikel-Stimulation (Abbildung 23 C). Im weiteren Verlauf wurde der TRPC3-abhängige Calcineurin/NFAT-Signalweg in Abhängigkeit von FKBP52 näher betrachtet.

4.4. Calcineurin/NFAT-Signaling in Kardiomyozyten

4.4.1. FKBP52-Mutanten beeinflussen den Calcineurin/NFAT-Signalweg in Kardiomyozyten

In den vorhergehenden Experimenten konnte gezeigt werden, dass FKBP52 mit TRPC3 interagiert und dadurch die Hypertrophie beeinflusst wird. Im nächsten Schritt untersuchten wir Mechanismen, die in das nachgeschaltete Signaling involviert sind. Als erstes wurde die Aktivität von Calcineurin analysiert. Die Phosphatase Calcineurin dephosphoryliert den Transkriptionsfaktor NFAT, welcher daraufhin in den Nucleus wandert. Die relative NFAT Translokation vom Cytosol in den Nucleus wurde als Maß zur Quantifizierung der NFAT Aktivität herangezogen. Für diese Versuche transduzierten wir NRCs mit Adenoviren, welche die NFAT Isoform NFATc1 codieren (NFATc1 mit GFP-getagged). Außerdem behandelten wir die Zellen mit FKBP52 (aa 135-459), FKBP52 (aa 280-352) oder β gal. Die Zellen wurden anschließend 15 min mit PE (50 μ M) oder Ang II (1 μ M) stimuliert und zusätzlich mit Pyr3 (10 μ M) behandelt. Für die immunzytochemischen Experimente wurden die Zellen fixiert, mit α -Actinin und DAPI gefärbt. Nach mikroskopischen Aufnahmen (Abbildung 24 A und C), wurde die grüne Färbung im Nucleus und im Cytosol quantifiziert und ins Verhältnis gesetzt (Abbildung 24 B, D und E).

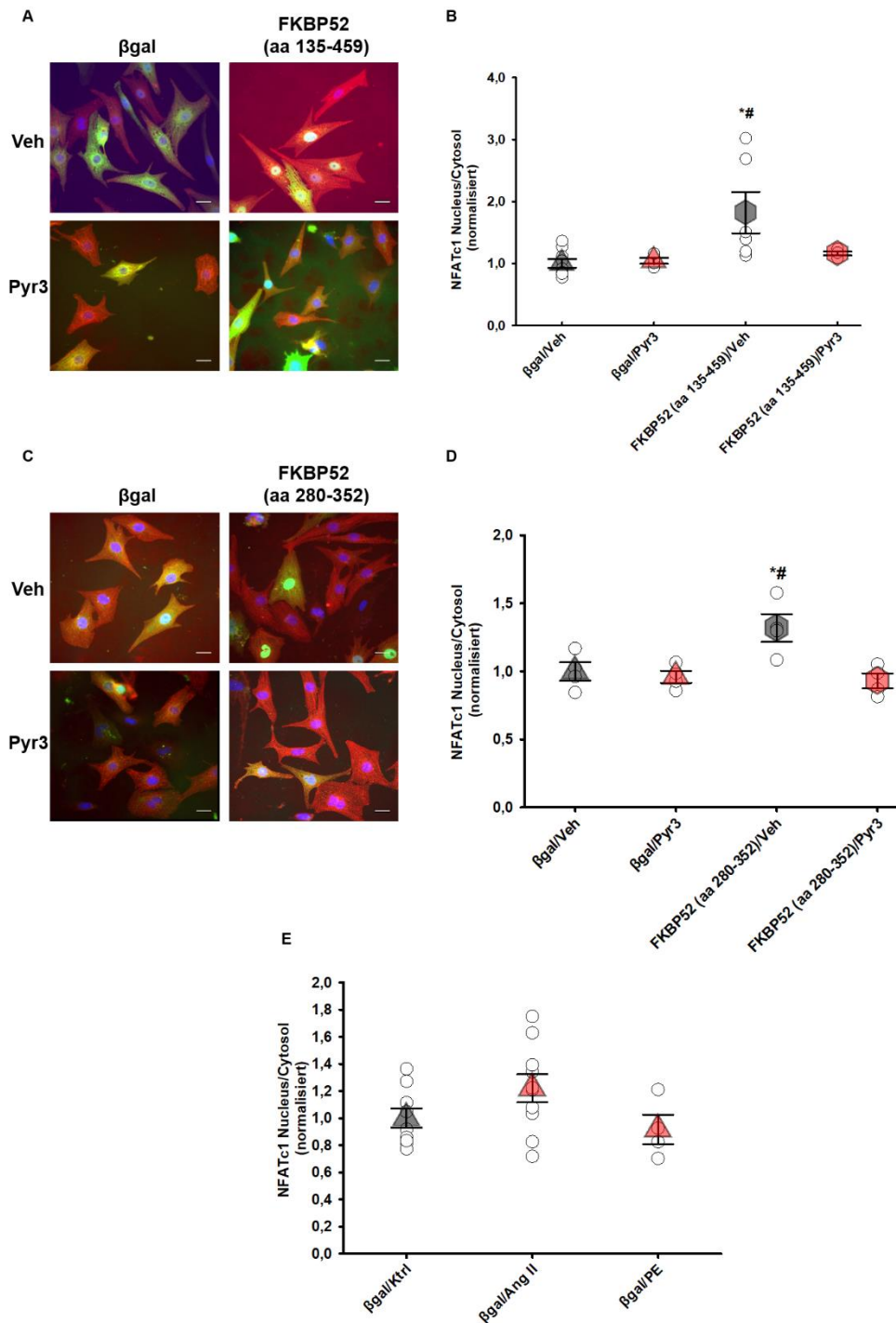


Abbildung 24: Die Überexpression von verkürzten FKBP52 Mutanten beeinflusst die Calcineurin/NFAT-Aktivität

(A) NRCs wurden mit Adenoviren, die FKBP52 (aa 135-459) oder β -Galactosidase (β gal) zur Kontrolle und NFATc1-GFP (grün) codieren, transduziert. Die Zellen wurden mit Pyrazol 3 (Pyr3, 10 μ M) oder Vehikel (Veh) behandelt. Die Lokalisation von NFATc1 im Nucleus (blau) zeigt seine Aktivität bzw. die Aktivität von Calcineurin. Rot: α -Actinin, blau: DAPI, grün: NFATc1, Maßstab: 20 μ M. Die Aufnahmen wurden mit einem 63 x Objektiv gemacht. (B) Quantifizierung des Anteils von NFATc1, der im Nucleus von NRCs lokalisiert ist. Die Werte sind in Relation zu β gal/Veh dargestellt. $P < 0,05$ vs. β gal/Veh, $\#P < 0,05$ vs. FKBP52 (aa 135-459)/Pyr3 (two-way ANOVA mit Holm-Sidak Methode), $n = 4-9$, mean \pm

s.e.m. (C) NRCs wurden mit Adenoviren, die FKBP52 (aa 280-352) oder β gal zur Kontrolle und NFATc1-GFP (grün) codieren, transduziert. Die Zellen wurden mit Pyr3 (10 μ M) oder Veh behandelt. Die Lokalisation von NFATc1 im Nucleus (blau) zeigt seine Aktivität bzw. die Aktivität von Calcineurin. Rot: α -Actinin, blau: DAPI, grün: NFATc1, Maßstab: 20 μ M. Die Aufnahmen wurden mit einem 63 x Objektiv gemacht. (D) Quantifizierung des Anteils von NFATc1, der im Nucleus von NRCs lokalisiert ist. Die Werte sind in Relation zu β gal/Veh dargestellt. $P < 0,05$ vs. β gal/Veh, $^{\#}P < 0,05$ vs. FKBP52 (aa 280-452)/Pyr3 (two-way ANOVA mit Holm-Sidak Methode), $n = 4$, mean \pm s.e.m. (E) Quantifizierung des Anteils von NFATc1, der im Nucleus von NRCs lokalisiert ist NRCs wurden mit β gal transduziert und die Lokalisation von NFATc1 nach 15 min Angiotensin II- (Ang II, 1 μ M), Phenylephrin- (PE, 50 μ M) oder Kontroll- (Ktrl) Stimulation bestimmt. Die Daten sind in Relation zu β gal/Ktrl dargestellt (one-way ANOVA mit Holm-Sidak Methode), $n = 4-10$, mean \pm s.e.m (geändert nach (Bandleon et al., 2019)).

In NRCs, die FKBP52 (aa 135-459) (Abbildung 24 A und B) oder FKBP52 (aa 280-352) (Abbildung 24 C und D) überexprimierten, kam es zu einer verstärkten Translokation von NFATc1 in den Nucleus und damit zu einer erhöhten Calcineurin Aktivität (vgl. graues Dreieck mit grauem Sechseck). Nach Behandlung der Zellen mit Pyr3 blieb dieser Effekt aus (vgl. graues Sechseck mit rotem Sechseck). Nach Stimulation mit Ang II oder PE für 15 min, zeigte sich keine verstärkte Translokation von NFATc1 in den Nucleus (Abbildung 24 E).

Im nächsten Schritt sollte nun untersucht werden, ob FKBP52 (aa 135-459) nach Stimulation mit Ang II den Calcineurin Signalweg beeinflusst. Dafür wurden mRNA Levels des *Regulators of Calcineurin 1* (RCAN1) und die Proteinexpression von NFATc3 untersucht. RCAN1 interagiert mit Calcineurin und inhibiert Calcineurin-abhängige Signalwege (Parra & Rothermel, 2017). NFATc3 ist ein bekanntes nachgeschaltetes Target von TRPC Kanälen und wird über Calcineurin aktiviert (He et al., 2017; Kuwahara et al., 2006). Für die Bestimmung der RCAN 1 mRNA Levels wurden NRCs mit FKBP52 (aa 135-459) Adenovirus und zur Kontrolle mit β gal transduziert und 24 h mit 100 nM Ang II stimuliert. Aus den Zellen wurde mRNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und anschließend mit Hilfe von qPCR Experimenten die RCAN 1 Expressionsevels bestimmt (Abbildung 25).

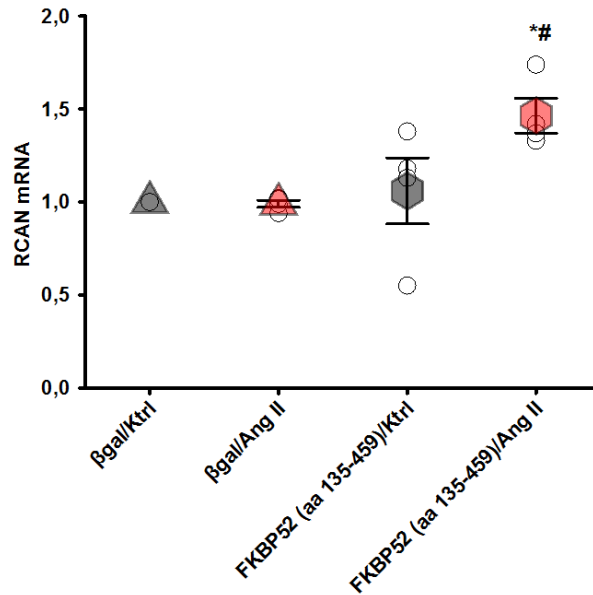


Abbildung 25: RCAN mRNA Levels nach Überexpression von FKBP52 (aa 135-459)

Regulator of Calcineurin 1 (RCAN1) mRNA Expressionsprofile wurden als Parameter für die Aktivierung von Calcineurin in NRCs herangezogen. RCAN1 mRNA Levels wurden nach 24 h Angiotensin II- (Ang II, 100 nM) oder Kontroll- (Ktrl) Stimulation mit Hilfe von qPCR Experimenten bestimmt. Außerdem wurden die Zellen mit FKBP52 (aa 135-459) oder zur Kontrolle mit β -Galactosidase (β gal) transduziert. Die Daten sind in Relation zu β gal/Ktrl dargestellt. *P < 0,05 vs FKBP52 (aa 135-459)/Ktrl, #P < 0,05 vs. β gal/Ang II (two-way ANOVA mit Holm-Sidak Methode), n = 4, mean \pm s.e.m (geändert nach (Bandleon et al., 2019)).

Wie in Abbildung 25 zu sehen ist, kam es nach der Kontrollinfektion und Stimulation mit Ang II zu keinem Anstieg der mRNA Levels. Nach Expression von FKBP52 (aa 135-459) und Stimulation mit Ang II stieg hingegen RCAN1 um 50 % im Vergleich zu den Kontrollbedingungen an.

Für die Bestimmung der NFATc3 Expressionslevels (Abbildung 26) wurden NRCs ebenfalls mit FKBP52 (aa 135-459) Adenoviren transduziert und mit 50 μ M PE für 24 h stimuliert. Zur Kontrolle wurden auch Zellen mit β gal transduziert. Anschließend wurde die nucleäre Fraktion der NRCs isoliert und im Western Blot die Expressionslevels von NFATc3 analysiert. Als Ladekontrolle wurden die Expressionslevels von Lamin verwendet.

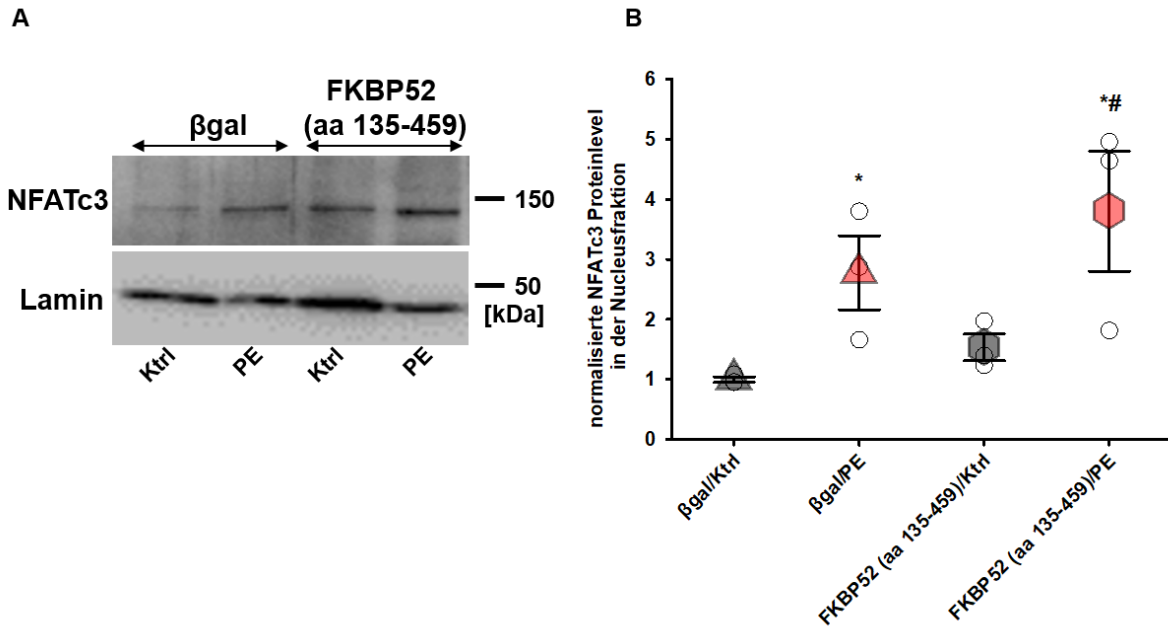


Abbildung 26: Überexpression von verkürzten FKBP52 Mutanten beeinflussen NFATc3 Proteinlevels im Nucleus

(A) Western Blot Analyse von NFATc3 in nucleären Extrakten von NRCs, die FKBP52 (aa 135-459) oder β -Galactosidase (β gal) zur Kontrolle überexprimierten. Die Zellen wurden 24 h mit Phenylephrin (PE, 50 μ M) oder Kontrolle (Ktrl) stimuliert. Lamin wurde als Ladekontrolle herangezogen. (B) Quantifizierung der Proteinlevels von NFATc3. Die Expression von NFATc3 wurden auf die Levels von Lamin (Ladekontrolle) normalisiert und in Relation zu β gal/Ktrl im Diagramm dargestellt. * $P < 0,05$ vs β gal bzw. FKBP52 (aa 135-459)/Ktrl, # $P < 0,05$ vs. β gal/PE (two-way ANOVA mit Holm-Sidak Methode), $n = 3$, mean \pm s.e.m (geändert nach (Bandleon et al., 2019)).

In Abbildung 26 ist zu sehen, dass es in β gal-transduzierten NRCs nach Stimulation mit PE zu einer erhöhten Expression von NFATc3 im Nucleus und damit zu einer verstärkten Aktivität kam. Diese Expression bzw. Aktivität war nach Infektion mit FKBP52 (aa 135-459) im Vergleich zu β gal noch stärker erhöht.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass FKBP52 den Calcineurin/NFAT-Signalweg sowohl mit als auch ohne Stimulation von G_q PCR beeinflusst. Hypertrophe Prozesse sind hingegen nur nach Stimulation beeinflusst. Dies zeigt, dass FKBP52 in der Lage ist, den Calcineurin/NFAT Signalweg unabhängig von der Stimulation G_q PCRs zu aktivieren. Die daraus resultierende NFAT-Aktivität ist jedoch nicht ausreichend, um eine Hypertrophie zu induzieren. Dies lässt vermuten, dass weitere Transkriptionsfaktoren, die durch die Aktivierung des G_q PCR aktiviert werden, benötigt werden, um eine hypertrophe Antwort auszulösen. Deshalb wurde im nächsten Schritt die Expression der Histondeacetylase 4 (HDAC4) untersucht. HDAC4 ist ein nachgeschaltetes Target der CamKII. Auch die CamKII kann, wie Calcineurin, durch den G_q PCR-vermittelten Ca^{2+} -Einstrom aktiviert werden (Backs,

Song, Bezprozvannaya, Chang, & Olson, 2006). Daraufhin wird HDAC4 phosphoryliert, was einen Export von HDAC4 aus dem Nucleus zur Folge hat. Dies führt zu einer Expression von Genen, die eine kardiale Hypertrophie begünstigen. Für dieses Experiment wurde in NRCs FKBP52 (aa 135-459) oder zur Kontrolle β gal überexprimiert. Anschließend wurden die Zellen 24 h mit 50 μ M PE stimuliert. Nach der Stimulation wurden Proteine isoliert und fraktioniert. Die Expression von HDAC4 wurde in der nucleären und der zytosolischen Fraktion untersucht. Als Ladekontrolle für die nucleäre Fraktion wurde Lamin und für das Cytosol GAPDH herangezogen (Abbildung 27 A und B).

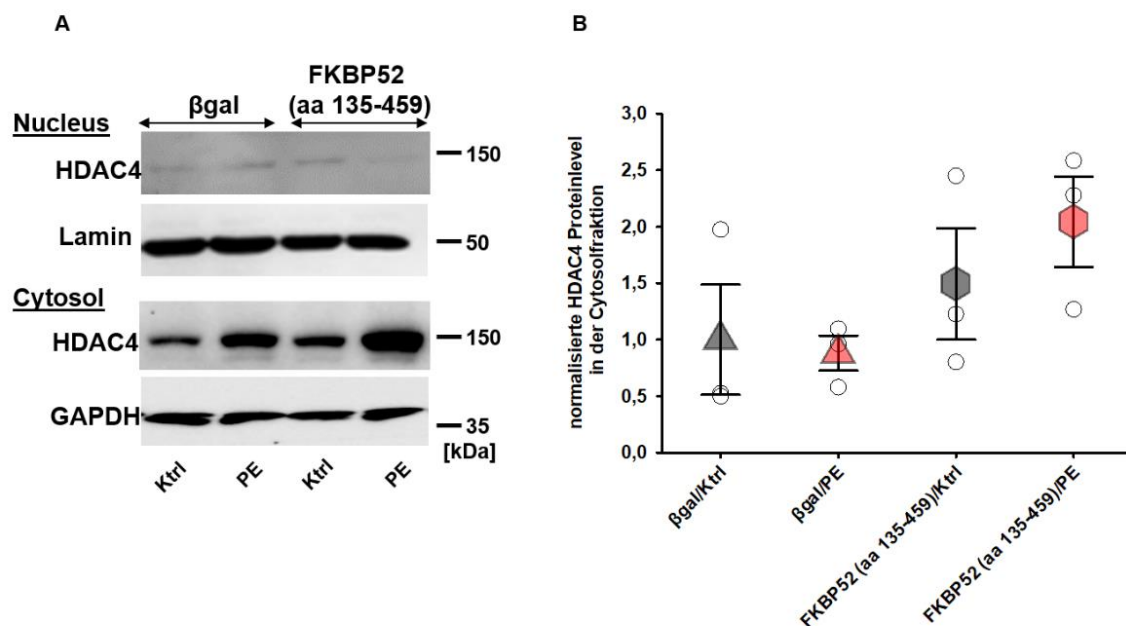


Abbildung 27: Die verkürzte FKBP52 Mutante beeinflusst die HDAC4 Expressionslevels nicht

(A) Western Blot Analyse von Histondeacetylase 4 (HDAC4) in nucleären und zytosolischen Extrakten von NRCs, die FKBP52 (aa 135-459) oder β -Galactosidase (β gal) zur Kontrolle überexprimierten. Die Zellen wurden 24 h mit Phenylephrin (PE, 50 μ M) oder Kontrolle (Ktr) stimuliert. Als Ladekontrolle für die nucleäre Fraktion wurde Lamin herangezogen und für die zytosolische Fraktion GAPDH. (B) Quantifizierung der Proteinexpressionslevels der zytosolischen Fraktion. Die Werte wurden auf die Ladekontrolle normalisiert und in Relation zu β gal/Ktrl im Diagramm dargestellt. Die Unterschiede waren nicht signifikant (two-way ANOVA mit Holm-Sidak Methode), $n = 3$, mean \pm s.e.m (geändert nach (Bandleon et al., 2019)).

Wie in Abbildung 27 zu sehen ist, wurden nach Stimulation mit PE keine veränderten Expressionslevels von HDAC4 in Vergleich zur Kontrollstimulation gefunden. Nach Expression von FKBP52 (aa 135-459) konnte man hingegen leicht-erhöhte HDAC4 Expressionslevels im Cytosol und leicht verringerte HDAC4 Levels im Nucleus (Abbildung 27 A) finden, wobei die Unterschiede zu den kontroll-transduzierten Zellen nicht signifikant waren (Abbildung 27 A und B). Da die Versuche in NRCs durchgeführt wurden, müsste die

Rolle von HDAC4 im hypertrophen Profil von adulten Kardiomyozyten näher untersucht werden.

4.5. Funktionelle Interaktion zwischen FKBP52 und TRPC3

4.5.1. FKBP52 beeinflusst TRPC3 induzierte Ca^{2+} -Signale

Nachdem unsere bisherigen Ergebnisse zeigten, dass FKBP52 mit TRPC3 interagiert und die durch TRPC3 induzierte Hypertrophie beeinflusst, untersuchten wir im nächsten Schritt, ob es auch eine funktionelle Interaktion zwischen FKBP52 und TRPC3 gibt. Dafür wurde zytosolisches Ca^{2+} in NRCs und HEK 293 Zellen mit Hilfe von Fura 2-AM gemessen. HEK 293 Zellen wurden entweder mit YFP-TRPC3 + FKBP52 (aa 280-352), YFP-TRPC3 oder YFP transfiziert. Die Zellen wurden während der Messung 100 s mit 100 μM OAG, stimuliert. Anschließend wurden die Zellen mit 2,5 mM Ca^{2+} perfundiert (Abbildung 28 A und B).

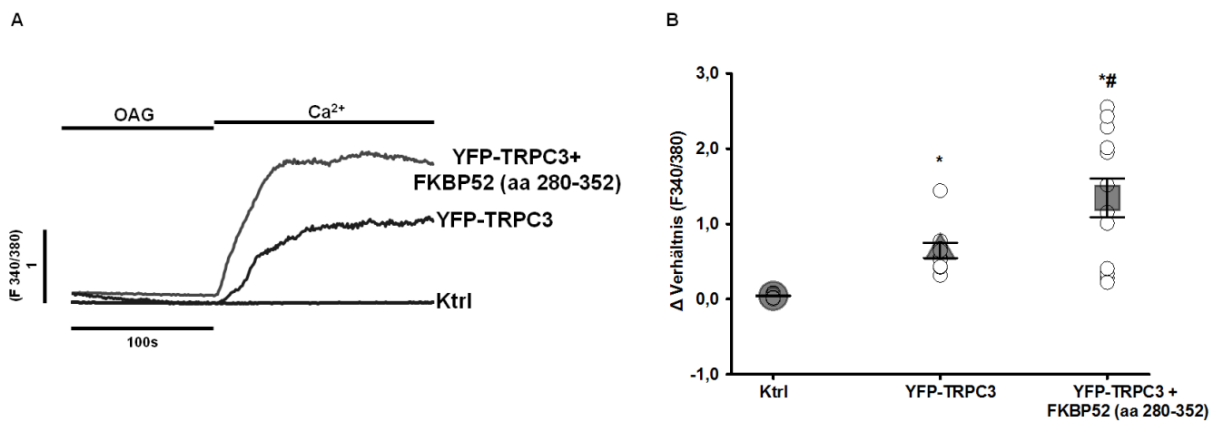


Abbildung 28: Verkürzte FKBP52-Mutanten beeinflussen Ca^{2+} -Signale in HEK 293 Zellen

(A) Repräsentative Ca^{2+} -Signale von HEK 293 Zellen, die mit YFP-TRPC3, YFP-TRPC3 mit FKBP52 (aa 280-352) oder YFP (Ktrl) transfiziert waren. Die Zellen wurden mit 2 μM Fura 2-AM und 0,5 mM Probenecid beladen. Die Zellen wurden anschließend mit 100 μM 1-Oleoyl-2-acetyl-sn-glycerol (OAG) in Ca^{2+} -freier Normaltyrode stimuliert, bevor 2 mM Ca^{2+} zugegeben wurde. (B) Quantifizierung von OAG-induzierten zytosolischen Ca^{2+} -Signalen in HEK 293 Zellen. Die durchschnittlichen Veränderungen der Δ -Verhältnisse wurden bestimmt, indem von dem Peakwert nach Ca^{2+} -Zugabe der Baselinewert subtrahiert wurde. * $P < 0,05$ vs. Ktrl # $P < 0,05$ vs. YFP-TRPC3, (one-way ANOVA mit Holm-Sidak Methode und ungepaartem t-Test), $n = 10-30$, mean \pm s.e.m (geändert nach (Bandleon et al., 2019)).

Es war zu erkennen, dass Zellen, die FKBP52 (aa 280-352) exprimierten, im Vergleich zu Kontrollbedingungen, erhöhte Ca^{2+} -Signale aufwiesen.

Im nächsten Schritt sollten diese Ergebnisse in NRCs bestätigt werden. Die NRCs wurden entweder mit FKBP52 (aa 135-459), FKBP52 (aa 280-352) oder βgal zur Kontrolle

transduziert. Auch hier wurden die Zellen 100 s mit OAG (100 μ M) stimuliert und anschließend mit 2,5 mM Ca^{2+} perfundiert. Ein Teil der Zellen wurde zusätzlich während der kompletten Messzeit mit dem TRPC3 Inhibitor Pyr3 (10 μ M) behandelt (Abbildung 29 A und B).

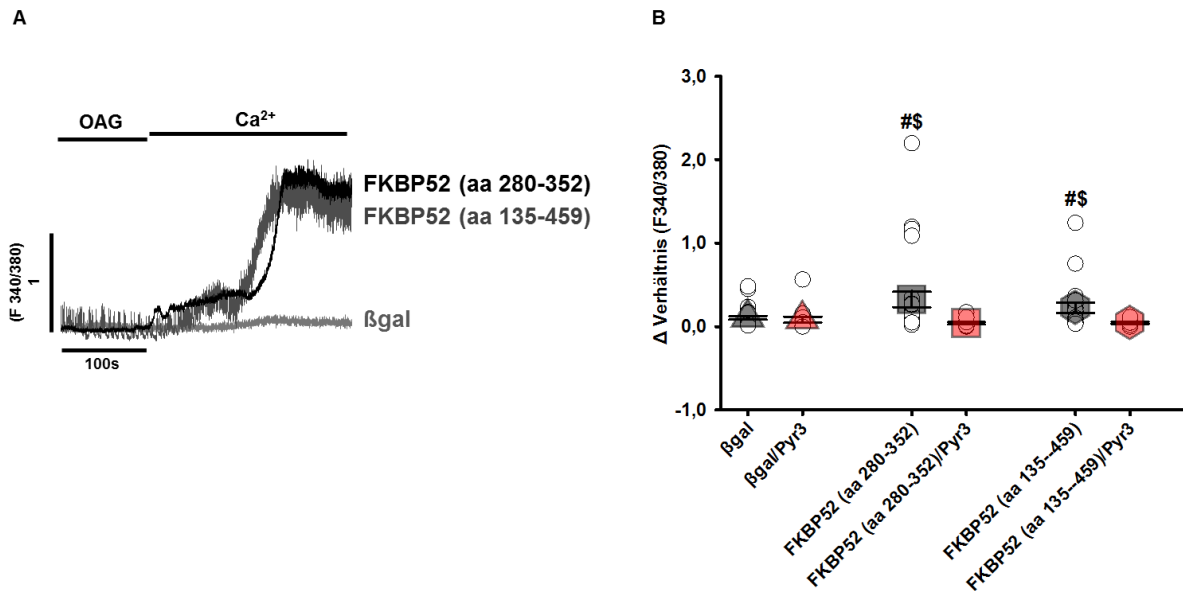


Abbildung 29: Verkürzte FKBP52-Mutanten beeinflussen Ca^{2+} -Signale in NRCs

(A) Repräsentative Ca^{2+} -Signale von NRCs, die FKBP52 (aa 135-459), FKBP52 (aa 280-352) oder β -Galactosidase (β gal) überexprimierten. Die Zellen wurden mit 2 μ M Fura 2-AM und 0,5 mM Probenecid beladen. Die Zellen wurden anschließend mit 100 μ M 1-Oleoyl-2-acetyl-sn-glycerol (OAG) in Ca^{2+} -freier Normaltyrode stimuliert, bevor 2 mM Ca^{2+} zugegeben wurde. (B) Quantifizierung von OAG-induzierten zytosolischen Ca^{2+} -Signalen in NRCs mit und ohne Pyrazol 3 (Pyr3, 10 μ M). Zellen, die FKBP52 (aa 135-459), FKBP52 (aa 208-352) oder β gal überexprimierten, wurden verglichen. Die durchschnittlichen Veränderungen der Δ -Verhältnisse wurden bestimmt indem vom Peakwert nach Ca^{2+} -Zugabe der Baselinewert subtrahiert wurde. # $P < 0,05$ vs. β gal, \$ $P < 0,05$ vs. FKBP52 (aa 135-459)/Pyr3 bzw. FKBP52 (aa 280-352)/Pyr3 (one-way ANOVA mit Holm-Sidak Methode und ungepaartem t-Test), $n = 10-30$, mean \pm s.e.m (geändert nach (Bandleon et al., 2019)).

Wie in Abbildung 29 zu erkennen ist, war zu sehen, dass NRCs, die FKBP52 (aa 280-352) oder FKBP52 (aa 135-459) überexprimierten, einen erhöhten Ca^{2+} -Einstrom in die Zellen erlaubten. Dieser Effekt wurde durch den TRPC3-Inhibitor Pyr3 deutlich reduziert (Abbildung 29 B). Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass es eine funktionelle Beziehung zwischen FKBP52 und TRPC3 gibt, die von der PPIase-Region abhängig ist. Um diese Daten weiter zu festigen, untersuchten wir auch Ca^{2+} -Signale in HEK 293 Zellen, die stabil TRPC3 exprimieren (T3.9 Zellen). Hier wurde nach Stimulation mit dem G_qPCR Agonisten Cch (300 μ M), was an den M₃-Muskarinrezeptor bindet, und der Zugabe von 2,5 mM Ca^{2+} der Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle mit Hilfe von Fura 2-AM bestimmt (Abbildung 30 A und B).

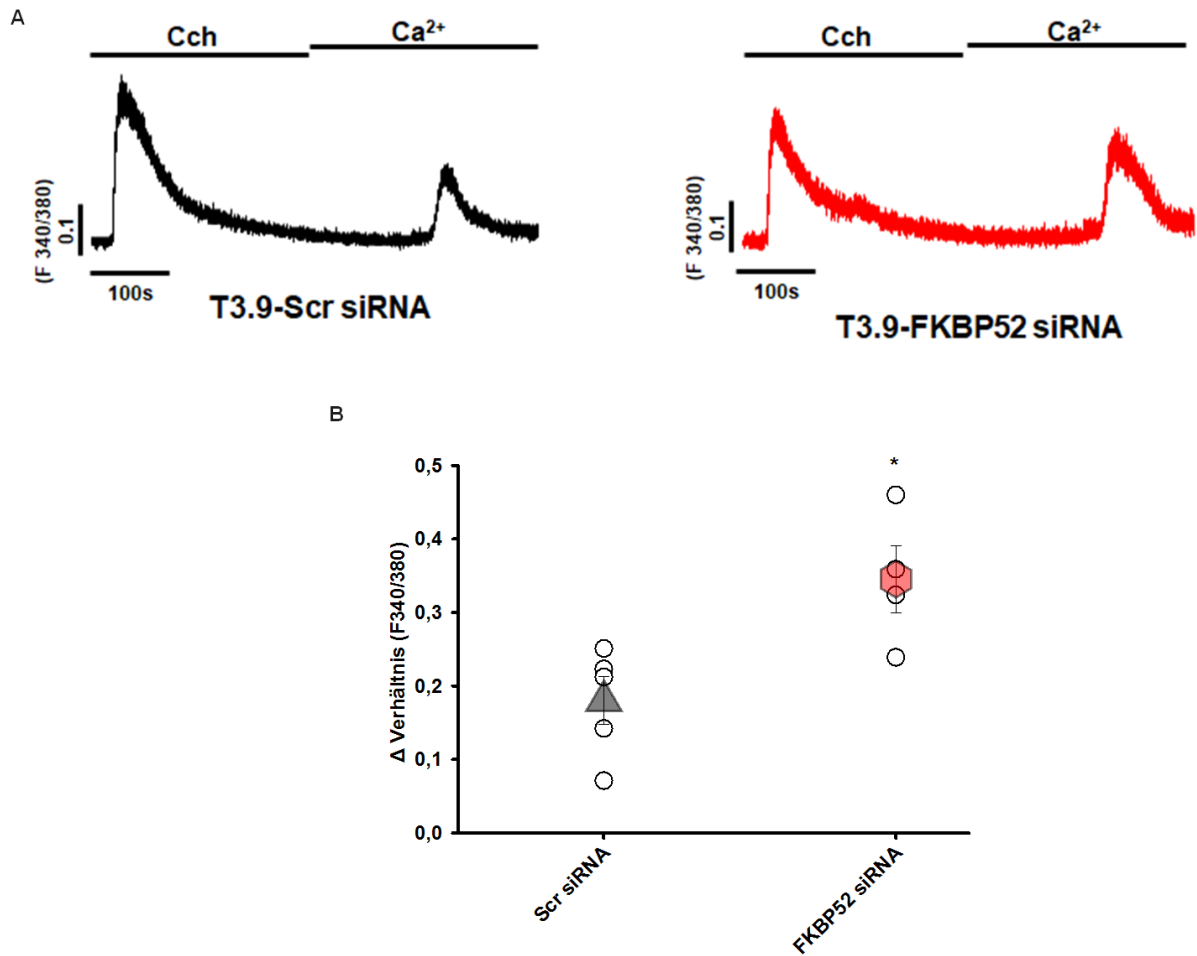


Abbildung 30: TRPC3-abhängige Ca²⁺-Signale in HEK 293 Zellen sind von FKBP52 abhängig

(A) Repräsentative Ca²⁺-Signale von HEK 293 Zellen, die TRPC3 stabil exprimieren (T3.9 Zellen). Die Zellen wurden mit FKBP52 siRNA oder Scramble siRNA (Scr siRNA) transfiziert. Die Zellen wurden mit 2 μM Fura 2-AM und 0,5 mM Probenecid beladen. Der TRPC3-abhängige Ca²⁺-Einstrom wurde nach Stimulation des G_qPCR mit Carbachol (Cch, 300 μM) in Ca²⁺-freier Normaltyrode gemessen und anschließend wurde 2 mM Ca²⁺ hinzugegeben. (B) Die durchschnittlichen Veränderungen der Δ-Verhältnisse wurden bestimmt, indem vom Peakwert nach Ca²⁺ Zugabe der Baselinewert subtrahiert wurde. *P < 0,05 vs. Scr siRNA (ungepaarter t-Test), n = 4-5, mean ± s.e.m (geändert nach (Bandleon et al., 2019)).

Auch in diesen Versuchen zeigte sich ein ähnlicher Trend. Bei HEK 293 Zellen, die TRPC3 stabil exprimieren (T3.9 Zellen), zeigte sich nach Downregulation von FKBP52 und Stimulation des G_qPCR ein erhöhter TRPC3-abhängiger Ca²⁺-Influx im Vergleich zu Scr siRNA transfizierten Zellen.

4.5.2. FKBP52 beeinflusst die TRPC3-Aktivität

Um die funktionelle Interaktion von FKBP52 und TRPC3 noch besser zu charakterisieren, wurden schließlich noch Patch-Clamp Experimente durchgeführt. HEK 293 Zellen wurden mit YFP-TRPC3, YFP-TRPC3 + FKBP52 (aa 280-352) oder YFP-TRPC3 + FKBP52 (aa 280-352) + FKBP52 (Volllänge) transfiziert. Die Messungen wurden nach der „Whole Cell Voltage Patch-Clamp“ – Methode durchgeführt. Die Zellen wurden mit 100 μ M OAG stimuliert und anschließend wurde die Aktivität der TRPC3-Kanäle in Abhängigkeit von FKBP52 gemessen (Abbildung 31).

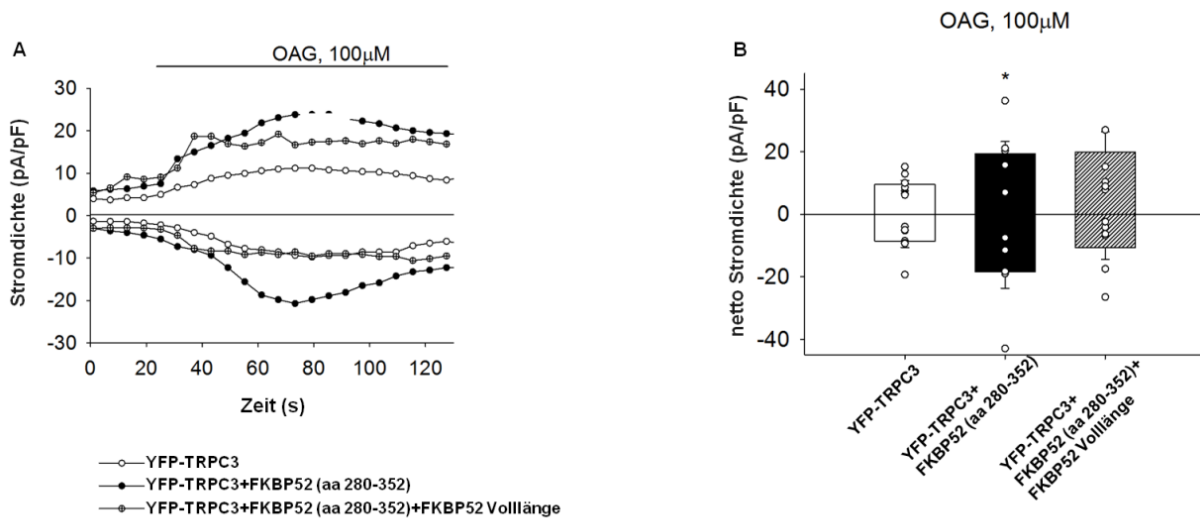


Abbildung 31: Expression von FKBP52 (aa 280-352) verändert die Öffnungswahrscheinlichkeit von TRPC3-Ionenkanälen

(A) Repräsentative Messungen der Stromdichten in HEK 293 Zellen, die mit YFP-TRPC3, YFP-TRPC3 und FKBP52 (aa 280-352) oder YFP-TRPC3, FKBP52 (aa 280-352) und FKBP52 (Volllänge) transfiziert wurden. Die Zellen wurden mit 1-Oleoyl-2-acetyl-sn-glycerol (OAG, 100 μ M) stimuliert. Werte wurden bei -90 mV (nach innen) und bei +70 mV (nach außen) ermittelt. (B) Quantifizierung der durchschnittlichen netto Stromdichten. Die Werte der Stromdichte bei -90 mV (nach innen) und bei +70 mV (nach außen) wurden auf die Zellkapazität normalisiert. *P < 0,05 vs. YFP-TRPC3 (one-way ANOVA mit Holm-Sidak Methode, n = 8-10, mean = s.e.m (geändert nach (Bandleon et al., 2019)).

Wie in Abbildung 31 A und B zu sehen ist, führte die Stimulation mit OAG zu einer erhöhten Stromdichte und daher zu einer gesteigerten Kanalaktivität. Die Überexpression des Fragmentes FKBP52 (aa 280-352) führte zu einer weiteren Erhöhung der TRPC3 Aktivität. Im nächsten Schritt untersuchten wir, ob dieser Effekt durch das Vorhandensein des voll-funktionsfähigen FKBP52 (FKBP52 (Volllänge)) wieder aufgehoben wird. Tatsächlich zeigte sich, dass die Co-Expression von FKBP52 (aa 280-352) und FKBP52 (Volllänge) zu einer verminderten Stromdichte in HEK 293 Zellen führte.

4.6. Calcineurin als Interaktionspartner von FKBP52 und TRPC3

Aus den bisherigen Versuchen ging hervor, dass FKBP52 (aa 135-459) die Aktivität des Calcineurin/NFAT Signalweges beeinflusst. Uns interessierte nun, ob dieser Zusammenhang auf eine physische Interaktion zwischen FKBP52, TRPC3 und Calcineurin zurückzuführen ist. In ersten Versuchen wurde die Bindung von Calcineurin an FKBP52 (aa 135-459) überprüft. Auch die Interaktion zwischen Calcineurin und TRPC3 sollte bestätigt werden. Dafür wurden HEK 293 Zellen entweder mit HA-FKBP52 (aa 135-459) sowie YFP-Calcineurin bzw. zur Kontrolle YFP-Calcineurin allein (Abbildung 32 A) transfiziert. In einem weiteren Experiment wurden HEK 293 Zellen mit YFP-Calcineurin und TRPC3 bzw. zur Kontrolle TRPC3 allein (Abbildung 32 B) transfiziert. Die Proteine wurden isoliert und Co-IP Experimente mit HA- bzw. YFP-Antikörper durchgeführt und nach einem Western Blot YFP-Calcineurin, HA-FKBP52 und TRPC3 detektiert.

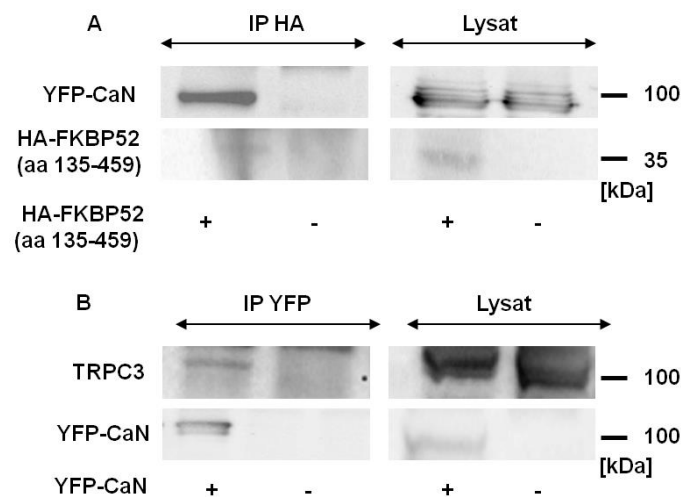


Abbildung 32: HA-FKBP52 und TRPC3 interagiert mit Calcineurin

(A) Repräsentativer Blot zum Nachweis der Interaktion zwischen Calcineurin (CaN) und HA-FKBP52 (aa 135-459). HEK 293 Zellen wurden mit YFP-CaN oder YFP-CaN und HA-FKBP52 (aa 135-459) transfiziert. Co-IP wurde mit einem HA-Antikörper durchgeführt, um HA-FKBP52 (aa 135-459) zu präzipitieren. Nach einem Western Blot wurde YFP-CaN und HA-FKBP52 (aa 135-459) detektiert. (B) Repräsentativer Blot zum Nachweis der Interaktion zwischen TRPC3 und CaN. HEK 293 Zellen wurden mit TRPC3 oder TRPC3 und YFP-CaN transfiziert. Co-IP wurde mit einem YFP-Antikörper durchgeführt, um YFP-CaN zu präzipitieren. Nach einem Western Blot wurden YFP-CaN und TRPC3 detektiert.

Wie in Abbildung 32 zu sehen ist, konnte sowohl eine Interaktion zwischen Calcineurin und FKBP52 (aa 135-459) als auch eine Interaktion zwischen TRPC3 und Calcineurin nachgewiesen werden.

Um die Beeinflussung der Interaktion von TRPC3 und Calcineurin durch FKBP52 (aa 135-459) zu untersuchen, wurden HEK 293 Zellen mit TRPC3, YFP-Calcineurin und FKBP52 (aa

135-459); TRPC3 und YFP-Calcineurin oder TRPC3 und HA-FKBP52 (aa 135-459) transfiziert. Nach der Proteinisolation wurde mit YFP in Co-IP Experimenten präzipitiert. Im Western Blot wurde anschließend TRPC3, YFP-Calcineurin oder HA-FKBP52 (aa 135-459) detektiert (Abbildung 33).

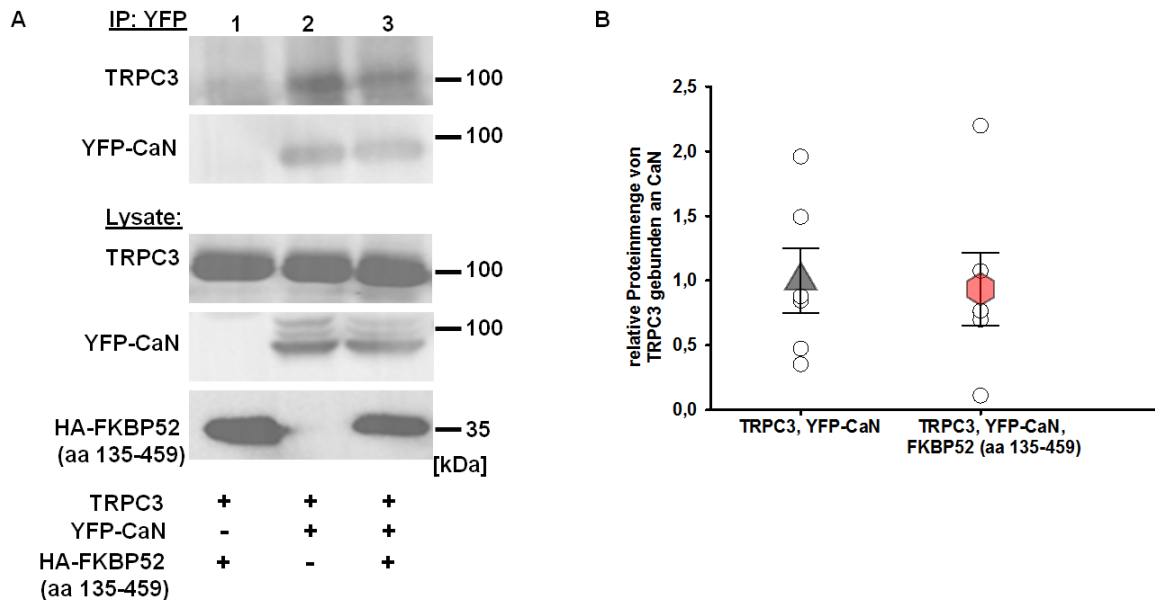


Abbildung 33: Bindung von TRPC3 an Calcineurin wird nicht durch FKBP52 (aa 135-459) beeinflusst

(A) Repräsentativer Blot zum Nachweis der Interaktion zwischen Calcineurin (CaN), TRPC3 und HA-FKBP52 (aa 135-459). HEK 293 Zellen wurden mit TRPC3, YFP-CaN zusammen mit HA-FKBP52 (aa 135-459) oder einer HA-Vektorkontrolle transfiziert. Eine Co-IP wurde mit einem YFP-Antikörper durchgeführt, um YFP-CaN zu präzipitieren. Nach einem Western Blot wurde YFP-CaN, TRPC3 und HA-FKBP52 (aa 135-459) detektiert. (B) Quantifizierung der TRPC3-Proteinmengen, die an CaN gebunden sind. Die Werte sind in Relation zu den Lysaten aufgetragen. Es konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden ($P = 0,86$; one-way ANOVA mit Holm-Sidak Methode), $n = 6$, mean = s.e.m (geändert nach (Bandleon et al., 2019)).

Wie in Abbildung 33 A und B zu erkennen ist, beeinflusste FKBP52 (aa 135-459) die Interaktion zwischen TRPC3 und Calcineurin nicht.

Es gibt Hinweise darauf, dass FKBP-Bindedomänen in den C- und N-terminalen Bereichen von TRPC Kanälen mit Interaktionsstellen für sogenannte Homerproteine überlappen (Shim et al., 2009). Es wurde zum Beispiel gezeigt, dass Homer1 für den geschlossenen Zustand von TRPC1 Kanälen verantwortlich ist. FKBP52 hingegen ist an der Aktivierung von TRPC1 beteiligt (Yuan et al., 2003). Aufgrund dieser beschriebenen Zusammenhänge wurde im nächsten Schritt analysiert, ob eine Interaktion zwischen TRPC3 und FKBP52 (aa 135-459) bzw. FKBP52 (aa 280-352) zu einer erhöhten Homer1 Bindung führt, welche einer erhöhten

TRPC3-Aktivität entgegenwirken könnte. Dafür wurden HEK 293 Zellen mit YFP-TRPC3 und FKBP52 (aa 135-459); YFP-TRPC3 und FKBP52 (aa 280-352) oder YFP-TRPC3 transfiziert. Proteine wurden isoliert und anschließend eine Co-IP mit YFP-durchgeführt. Homer1, FKBP12 und YFP-TRPC3 wurden im Western Blot detektiert (Abbildung 34).

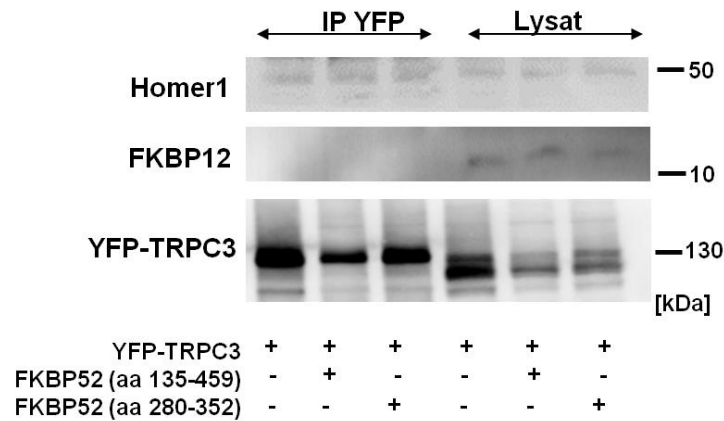


Abbildung 34: Bindung von TRPC3 an Homer1 und FKBP12 wird nicht durch verkürzte FKBP52 Mutanten beeinflusst

(A) Repräsentativer Blot zum Nachweis der Interaktion zwischen Homer1 bzw. FKBP12, TRPC3 und HA-FKBP52 (aa 135-459) bzw. FKBP52 (aa 280-352). HEK 293 Zellen wurden mit TRPC3 zusammen mit HA-FKBP52 (aa 135-459) bzw. FKBP52 (aa 280-352) oder einer HA-Vektorkontrolle transfiziert. Co-IP wurde mit einem YFP-Antikörper durchgeführt, um YFP-TRPC3 zu präzipitieren. Im Western Blot wurde endogen exprimiertes Homer1 bzw. FKBP12 detektiert. Es konnten hierbei keine Unterschiede festgestellt werden (geändert nach (Bandleon et al., 2019)).

Es war zu erkennen, dass zwar eine Interaktion zwischen TRPC3 und Homer1 vorhanden war, jedoch wurde diese Interaktion durch keines der beiden FKBP52-Fragmente beeinflusst (Abbildung 34).

Nachdem in früheren Studien gezeigt wurde, dass das Immunophilin FKBP12 mit TRPC3 über C-terminale prolinreiche Domäne reagiert (Sinkins et al., 2004), analysierten wir abschließend, ob FKBP52-Fragmente die Bindung zwischen TRPC3 und FKBP12 beeinflussen. Interessanterweise konnten wir keine Interaktion zwischen TRPC3 und FKBP12 feststellen. Nach Präzipitation von YFP-TRPC3 konnte in keinem Ansatz FKBP12 detektiert werden (Abbildung 34). Den Einfluss von FKBP52 auf die Wechselwirkung zwischen FKBP12 und TRPC3 haben wir daher nicht weiterverfolgt.

Zusammenfassend lässt sich behaupten, dass die Expression einer PPIase-defizienten Mutante von FKBP52 oder die Downregulation von FKBP52 zu erhöhten Ca^{2+} Spiegel, einer gesteigerten Calcineurin Aktivität und zu kardialer Hypertrophie führt. Daraus lässt sich schließen, dass FKBP52, als intaktes funktionsfähiges Protein, einen hemmenden Effekt auf TRPC3-Kanäle ausübt.

5. DISKUSSION

5.1. FKBP52 als neuer Interaktionspartner von TRPC3

In dieser Arbeit konnten neue Erkenntnisse über die Interaktion von Immunophilinen mit TRPC-Kanälen und über die Regulation von TRPC3 durch FKBP52 gewonnen werden. TRPC3 spielt eine Schlüsselrolle in der Entwicklung einer kardialen Hypertrophie und kann somit ein neuartiges Arzneimittel-Target in der Therapie kardialer Erkrankungen darstellen. Um dies jedoch erreichen zu können, ist es erforderlich die Funktionsweise und Regulation eingehender zu erforschen.

Es war bereits bekannt, dass Kanäle der TRP-Familie mit Immunophilinen interagieren. In vorherigen Studien wurden Interaktionen zwischen FKBP5s und TRPC-Kanälen gezeigt, wobei FKBP5s in der Lage sind TRPC-Kanäle zu regulieren. Eine erste Interaktion wurde von Goel *et al.* in der *Drosophila* gesehen. Sie konnten dFKBP59, was dem humanen FKBP52 entspricht, als direkten Interaktionspartner und Regulator von TRPL-Kanälen ausmachen. Die Interaktion mit dFKBP59 findet dabei über eine prolinreiche C-terminale Region von TRPL (⁷⁰¹LPPPFNVLP⁷⁰⁹) statt (Goel *et al.*, 2001). Diese Region ist auch nahezu identisch in TRPC-Ionenkanälen und ist ebenfalls in TRPC3 zu finden. Die erste LP-Dipeptidbindung ist in allen TRPC-Kanälen vorhanden. In TRPC3, wie auch in TRPC6 und TRPC7 ist die zweite LP-Dipeptidbindung zu einer VP-Dipeptidbindung verändert. Dagegen ist in TRPC1, TRPC4 und TRPC5 an dieser Stelle ein IP-Dipeptid vorhanden (Sinkins *et al.*, 2004). So lässt sich anhand dieser Ergebnisse vermuten, dass auch TRPC-Kanäle mit FKBP52 interagieren können. Sinkins *et al.* konnten tatsächlich über Co-IP Experimente feststellen, dass TRPC1, TRPC4 und TRPC5 an FKBP52 binden, wohingegen TRPC3, TRPC6 und TRPC7 mit FKBP12 interagieren. Diese Ergebnisse wurden in Rattenhirnlysaten bestätigt. Auch konnte demonstriert werden, dass die erste hochkonservierte LP-Bindung in TRPC-Kanälen für die Interaktion mit den FKBP5s verantwortlich ist. Eine Mutation dieser Bindung verhindert die Interaktion der Immunophilinen mit den TRPC-Kanälen. Es konnte bisher noch keine Erklärung für dieses Phänomen gefunden werden (Sinkins *et al.*, 2004). Etwas Ähnliches zeigte sich auch bei der Interaktion zwischen RyRs und FKBP5s. FKBP12 interagiert mit RyR1 über eine VP-Bindung, wohingegen diese Stelle beim RyR2 durch eine IP-Bindung ersetzt ist, wodurch der RyR2 mit FKBP12.6 interagiert. FKBP12.6 ist mit einer Aminosäuresequenzidentität von 85 % am engsten mit FKBP12 verwandt. Wird die VP- durch eine IP-Bindung im RyR1 ersetzt, findet keine Interaktion mehr mit FKBP12, jedoch mit FKBP12.6 statt (Gaburjakova *et al.*, 2001; Sewell *et al.*, 1994; Sinkins *et al.*, 2004). Dies lässt vermuten, dass diese Prolin-Verbindung auch für die spezifische Interaktion zwischen FKBP5s und TRPC-Kanälen verantwortlich sein könnte. Sinkins *et al.* konnten dies jedoch

nicht bestätigen. Durch einen Tausch der Prolin-Verbindungen in TRPC3 und TRPC5 ist die Selektivität für FKBP's im Vergleich zu den Wildtyp-Kanälen nicht verändert. Diese Tatsache lässt vermuten, dass es außer der prolinreichen Domäne noch andere Sequenzen in TRPC-Kanälen gibt, die eine Interaktion mit FKBP's vermitteln können. Auch die Vorversuche und Experimente durch unsere Arbeitsgruppe lassen darauf schließen. Mit unseren Daten des Yeast Two-Hybrid Screens und den Co-IPs konnte ebenfalls eine Interaktion *in vivo* und *in vitro* in Herzlysaten zwischen TRPC-Kanälen und Immunophilinen gezeigt werden. Diese gefundene C-terminale Bindungsstelle (aa 742-848) liegt jedoch außerhalb der bereits bekannten prolinreichen Domäne, was die Vermutung bekräftigt, dass es außer der bisher beschriebenen Bindungsregion noch weitere bislang unbekannte Regionen gibt. Außerdem wurde mit diesen Ergebnissen den Thesen von Sinkins *et al.* widersprochen, die eine selektive Bindung von TRPC3 an FKBP12 ausmachten. Wir konnten eine Bindung von TRPC3 an FKBP52 sehen. Die gefundene FKBP52-Bindungsstelle in TRPC3 (aa 742-848) zeigt außerdem keine bisher bekannten FKBP-Bindemotive. Es sind keine Prolin-Bindungen vorhanden, die die FKBP-abhängige cis-trans Isomerisierung vermitteln. In Hsp90 wurde das TPR-Bindemotiv (MEEVD) als erforderliche Sequenz für eine FKBP-Bindung festgestellt (Erlejan et al., 2014). In TRPC3 ist allerdings auch dieses Motiv nicht vorhanden. Interessanterweise ergab der Yeast Two-Hybrid Screen eine direkte Interaktion zwischen TRPC3 und einem FKBP52-Fragment, dem die PPIase-Domäne fehlt (FKBP52 (aa 135-459)). Durch die genauere Untersuchung der möglichen TRPC3-Binderegionen in FKBP52 konnte festgestellt werden, dass mehrere FKBP52-Regionen an TRPC3 binden. Dieses Phänomen konnten Chambrud *et al.* schon bei der Interaktion zwischen FKBP52 und Tubulin sehen. Auch hier interagieren verschiedene FKBP52-Domänen mit Tubulin, wobei bei der FKBP52-Tubulin-Interaktion, die Interaktionsstellen in FKBP52 C-terminal bei den TPR-Domänen (TPR1, TPR2 und TPR3) zu finden ist (Chambrud et al., 2007). Im Gegensatz dazu zeigten unsere Ergebnisse, dass die letzte TPR-Domäne (TPR3) und der C-Terminus von FKBP52 (aa 352-459) nicht an TRPC3 binden. Dies war überraschend, da auch in dieser Region Binderegionen, z.B für Hsp90 (Cheung-Flynn, Roberts, Riggs, & Smith, 2003) vorhanden sind. Dass das C-terminale FKBP52-Fragment nicht mit TRPC3 interagiert, war unabhängig von der Mutation (R358Q) in FKBP52 (aa 352-459). Dies lässt den Schluss zu, dass diese Region keine Rolle bei der Bindung spielt und womöglich die Region um TPR1 und TPR2 für die Interaktion verantwortlich ist.

5.2. FKBP52 schützt Kardiomyozyten vor pathologischer Hypertrophie

Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen darauf schließen, dass funktionsfähiges FKBP52 den TRPC3-abhängigen Ca^{2+} -Einstrom beeinflusst und Kardiomyozyten vor Hypertrophie schützt. So waren die Ca^{2+} -Signale nach Downregulation von FKBP52 erhöht und die NRCs wiesen ein erhöhtes hypertrophes Wachstum auf. Auch zeigte sich nach Expression der beiden PPlase-defizienten Mutanten der gleiche Effekt in den Ca^{2+} -Signalen. Es ist davon auszugehen, dass die Expression der beiden Mutanten das endogen exprimierte FKBP52 verdrängt und dadurch die verstärkte Kanalaktivität bewirkt, was einen erhöhten Ca^{2+} -Einstrom und ein pro-hypertrophes Wachstum bedingt. Unsere Ergebnisse, die auf einen anti-hypertrophen Effekt von FKBP52 auf TRPC3 schließen lassen, stimmen mit den Ergebnissen überein, dass *Drosophila* dFKBP59 einen inhibitorischen Effekt auf TRPL-Kanäle hat (Goel et al., 2001). Ähnliches wurde auch bereits bei der Interaktion zwischen FKBP5s und RyRs gesehen. Durch die Interaktion mit FKBP12 oder FKBP12.6 sind RyRs in Kardiomyozyten bzw. im Skelettmuskel gehemmt. Ist die Interaktion zwischen den Immunophilinen und den RyRs unterbrochen, sind die Rezeptoren durchlässiger für Ca^{2+} , was in der Folge zu verstärkter Hypertrophie führen kann (Lehnart, Huang, Marx, & Marks, 2003). In dieser Arbeit konnte zusätzlich ein hemmender Effekt von FKBP52 auf TRPC6 festgestellt werden. Jedoch zeigten Shim *et al.* eine FKBP-abhängige Regulation von TRPC1-Kanälen, bei der FKBP5s einen aktivierenden Einfluss auf TRPC1-Kanäle haben. Die Co-Expression von FKBP52 bzw. FKBP12 und TRPC1 führt zu einer erhöhten TRPC1-Aktivität. Sie stellten fest, dass durch eine Punktmutation in der PPlase-Domäne von FKBP52 bzw. FKBP12 die Isomerisierung von N- und C-terminalen Strukturen beeinträchtigt ist und dadurch die Aktivität von TRPC1 blockiert ist (Shim et al., 2009).

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten eine erhöhte TRPC3-Stromdichte und gesteigerte Ca^{2+} -Signale nach Expression von PPlase defizienten FKBP52 Mutanten. Daraus lässt sich schließen, dass die Aktivität von TRPC3 über die Isomerase gesteuert wird, darauf deuten auch die Ergebnisse von Shim *et al.* hin. Außerdem zeigten wir, dass FKBP52 inhibierend auf TRPC3 wirkt, was einen Unterschied zu dem oben beschriebenen Beispiel darstellt, bei welchem FKBP12 und FKBP52 aktivierend auf TRPC1 wirken.

In den Experimenten konnte ebenfalls gezeigt werden, dass TRPC3 ohne ein funktionsfähiges FKBP52 sensitiver gegenüber der Stimulation des G_q PCR ist, wodurch ein erhöhter Ca^{2+} -Einstrom zustande kommt. Die Interaktion zwischen FKBP12 und TRPC3 wäre ein Mechanismus, der in diesem Fall zu einer Erhöhung der Ca^{2+} Spiegel führen könnte. Durch diese Wechselwirkung wäre eine cis-trans Isomerisierung von TRPC3 denkbar, wodurch es in Folge dessen zu einer gesteigerten TRPC3-Aktivität kommen könnte. FKBP12 wurde früher schon als Interaktionspartner von TRPC3 ausgemacht, wobei

das Immunophilin an eine C-terminale Prolin-Region von TRPC3 bindet (Sinkins et al., 2004). Es wäre möglich, dass durch die gestörte FKBP52-TRPC3-Interaktion die Beziehung zwischen TRPC3 und FKBP12 gestärkt wird und dies zu einer erhöhten TRPC3-Aktivität während der Stimulation beiträgt. Überraschenderweise konnten wir jedoch kein endogen exprimiertes FKBP12 in TRPC3-Präzipitaten nachweisen. Dies legt den Schluss nahe, dass die erhöhte Aktivität nach Expression einer nicht funktionsfähigen FKBP52-Mutante, zumindest in HEK 293 Zellen, unabhängig von FKBP12 ist. Auch ein Einfluss des Scaffold Proteins Homer1 wurde ausgeschlossen. Es konnte zwar festgestellt werden, dass TRPC3 mit Homer1 interagiert, jedoch war die Interaktion auch nach Expression eines der FKBP52-Fragmente unverändert. Dementsprechend scheint Homer1 nicht als Teil eines negativen Feedback-Mechanismus rekrutiert zu werden, der eine verstärkte Aktivierung von TRPC3 verhindert. Die FKBP12 und Homer1-Experimente wurden allerdings nur in HEK 293 Zellen durchgeführt und besitzen somit eine limitierende Aussagekraft. Daher sind weitere Experimente indiziert, die aber in Kardiomyozyten und in Zellen mit reduzierter Homer1- bzw. FKBP12 Expression erfolgen müssen. Hierdurch wäre eine genauere Charakterisierung der FKBP52 Interaktion möglich.

Die Ergebnisse dieser Arbeit machen deutlich, dass die Verbindung zwischen FKBP52 und TRPC3 in Kardiomyozyten eine wichtige physiologische Rolle in der agonisten-abhängigen Hypertrophie spielt. Es ist bereits bekannt, dass TRPC3-Kanäle einen zentralen Punkt in der Entwicklung der Hypertrophie darstellen. Sie verbinden die Stimulation des G_q PCR mit den Ca^{2+} -abhängigen hypertrophen Signalproteinen (Eder, 2017; Eder & Molkentin, 2011). Aufgrund der Interaktion von FKBP52 und TRPC3 wurde die Hypertrophie in Abhängigkeit von FKBP52 untersucht. Die Hypertrophie wurde entweder durch Stimulation des G_q PCR mit Ang II (Angiotensin II Typ1-Rezeptoren) und PE (α 1-adrenerge Rezeptoren) oder durch Stimulation mit OAG induziert (Forrester et al., 2018; O'Connell, Jensen, Baker, & Simpson, 2013; Onohara et al., 2006). Der Einfluss von TRPC3 auf die G_q PCR-abhängige Hypertrophie konnte durch Applikation von Pyr3 gezeigt werden. Pyr3 ist ein spezifischer Inhibitor von TRPC3 (Kiyonaka et al., 2009). Die Behandlung der NRCs mit Pyr3 führte zu einem verminderten hypertrophen Wachstum in Kardiomyozyten mit downregulierten FKBP52-Levels. Unsere Ergebnisse zeigten damit, dass die TRPC3 Aktivität in die G_q PCR-abhängige Hypertrophie involviert ist. Diese ist verstärkt, wenn FKBP52 downreguliert ist.

Unabhängig von der G_q PCR gekoppelten TRPC3-Aktivität, konnte auch schon eine basale TRPC3-Aktivität ohne G_q PCR-Stimulation gemessen werden (Dietrich et al., 2003). Auch in vorliegender Arbeit konnten diese Eigenschaften nachgewiesen werden. So bewirkte Pyr3 bereits ohne Stimulation ein vermindertes hypertrophes Zellwachstum, was auf eine hypertrophe Aktivität in Abhängigkeit von TRPC3 schließen lässt. Die Expression der PPlase-defizienten Fragmente zeigte nach Stimulation des G_q PCR-Rezeptors ähnliche

Effekte. Es kam zu einem verstärkten hypertrophen Wachstum und zu leicht erhöhten ANP-Levels, was darauf schließen lässt, dass die PPIase-Domäne dabei eine wichtige Rolle spielt. Allerdings konnte unter Basalbedingungen ohne Stimulation des G_q PCR unterschiedliche Ergebnisse beobachtet werden. Nach Downregulation von FKBP52 und Behandlung der Zellen mit Pyr3 war das Zellwachstum im Vergleich zu Zellen ohne Pyr3-Behandlung vermindert. Diesen Effekt konnte man nach Expression der PPIase defizienten Mutanten erstaunlicherweise nicht sehen. Mit und ohne Pyr3-Behandlung zeigten die Kardiomyozyten unter basalen Bedingungen eine ähnliche Zellgröße. Die unterschiedlichen Ergebnisse in Zellen mit downregulierten FKBP52-Levels bzw. exprimierten PPIase-defizienten FKBP52-Fragmenten lassen sich nur schwer erklären. Es könnte an der Bindung der PPIase defizienten Mutanten an TRPC3 liegen, was zum Beispiel zu einer erhöhten basalen TRPC3-Aktivität, zu einer verstärkten Interaktion mit Calcineurin oder vielleicht auch zu einer erhöhten Bindung von FKBP12 führen könnte. Dies würde dazu führen, dass Pyr3 basal nicht zu einem verringerten hypertrophen Wachstum nach Expression der PPIase defizienten Mutante führt. Ein Effekt von FKBP12 auf TRPC Kanäle konnte schon gezeigt werden. In Neuronen vermittelt FKBP12 das sponante Öffnen von TRPC1 (Shim et al., 2009).

Calcineurin ist ein zentraler Punkt im TRPC3-nachgeschalteten Signaling. Das durch TRPC3 einströmende Ca^{2+} aktiviert Calcineurin, wodurch NFAT dephosphoryliert wird, in den Nucleus wandert und dort Hypertrophie-induzierende Gene aktiviert. Wir konnten zeigen, dass Calcineurin sowohl an TRPC3 als auch an FKBP52 bindet. Im Gegensatz zum Zellwachstum konnte bei den FKBP52-Fragmenten bereits basal eine erhöhte NFATc1-Translokation in den Nucleus und damit Calcineurin-Aktivität festgestellt werden. Diese Aktivität konnte, wie in den oben bereits erwähnten Versuchen, durch die Pyr3-vermittelte Inhibition von TRPC3 verringert werden. Zusätzlich konnten nach Expression der PPIase defizienten Mutanten veränderte Expressionsprofile für NFATc3 und HDAC4 festgestellt werden. Es zeigten sich erhöhte NFATc3 Levels im Nucleus und erhöhte HDAC4 Levels im Cytosol nach Expression der Mutanten. Diese Expressionsprofile sind für ein hypertrophes Wachstum während G_q PCR-Stimulation charakteristisch. Hypertrophes Wachstum konnte auch nach Stimulation des G_q PCR mit Ang II, PE oder OAG nachgewiesen werden, wenn in NRCs oder ARCs die FKBP52-Fragmente exprimiert wurden. Daraus lässt sich schließen, dass während der Stimulation des G_q PCR die FKBP52-Fragmente einen TRPC3-abhängigen Ca^{2+} -Einstrom induzieren. Durch diesen Ca^{2+} -Einstrom werden in Folge dessen verschiedene Signalwege aktiviert, darunter Calcineurin/NFAT- und der CamKII-Signalweg, die wiederum für die hypertrophe Wirkung verantwortlich sind.

Es ist jedoch verwunderlich, dass, obwohl FKBP52 den Calcineurin/NFAT-Signalweg unter Basalbedingungen beeinflusst, es keine Auswirkungen auf das basale hypertrophe

Wachstum hat. Daraus lässt sich schließen, dass die FKBP52-abhängige Calcineurin-Aktivität nicht allein ausreicht, um Hypertrophie zu induzieren. Vermutlich werden andere Transkriptionsfaktoren benötigt, die durch Stimulation des G_qPCR aktiviert werden und ein hypertrophes Wachstum auslösen. In diesem Zusammenhang interessierte uns der Transkriptionsfaktor HDAC4. Jedoch konnten wir in HEK-Zellen, die PPIase defiziente FKBP52-Mutanten exprimierten, keine signifikanten Unterschiede in HDAC4-Expressionslevels sehen.

Sinkins *et al.* konnten zeigen, dass FK506 in der Lage war die Verbindung von FKBP52 bzw. FKBP12 zu dem jeweiligen TRPC-Kanal zu verhindern. Nach Behandlung der Zellen mit FK506 war aus diesem Grund ebenfalls ein pro-hypertropher Effekt, wie bei einer FKBP52 Downregulation, zu erwarten, da davon ausgegangen wurde, dass FK506 die Interaktion zwischen FKBP52 und TRPC3 stört.

Es konnte jedoch kein pro-hypertropher Effekt gesehen werden. Das Gegenteil war hingegen der Fall. Man konnte nach Behandlung der Zellen mit FK506 eine verringerte ANP-Expression im Vergleich zur Kontrolle sehen. Da FK506 mit mehreren intrazellulären Rezeptoren innerhalb der FKBP-Familie interagiert, könnte seine potenzielle Rolle, FKBP52 von TRPC3 zu verdrängen, durch andere Mechanismen überdeckt werden.

So ist bereits bekannt, dass FK506 mit FKBP12 einen Komplex bildet und dadurch Calcineurin hemmt (Li et al., 2011), das könnte der dominante Mechanismus sein, der anti-hypertrophe Effekte in Kardiomyozyten verursacht.

Die Ergebnisse von Gao *et al.* zeigen Ähnliches: FK506 konnte interessanterweise in NRCs eine TRPC3 induzierte hypertrophe Reaktion reduzieren und den Calcineurin/NFAT-Signalweg blockieren (Gao et al., 2012). Dieser anti-hypertrophe Effekt könnte dadurch zu Stande kommen, dass stimulierende Effekte die auf einer FKBP12 cis/trans Isomerisierung von TRPC3 basieren, verhindert werden. Im Falle eines solchen Szenarios müsste die Verwendung von FK506 als Calcineurinhemmer in der Therapie von Hypertrophie (Wilkins & Molkentin, 2004) noch genauer untersucht werden. Die funktionelle Beziehung zwischen FKBP52 und TRPC3 und die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse, zeigen, dass FKBP52 bei der Verhinderung von Calcineurin/NFAT-Aktivierung und Hypertrophie eine Rolle spielt. Aufgrund dieser Tatsache würde die Hemmung von FKBP52 möglicherweise Nebenwirkungen verursachen. Infolge dieser Ergebnisse ist es sinnvoll den Mechanismus in weiteren Studien im intakten Herzen zu untersuchen.

5.3. Fazit und Ausblick

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Ergebnisse dieses Projektes zum ersten Mal eine Interaktion zwischen FKBP52 und TRPC3 über eine noch nicht beschriebene

FKBP-Bindestelle (aa 742-848) zeigen. Bisher wurde die Interaktion zwischen Ionenkanälen und Immunophilinen über die prolinreiche Sequenz des Ionenkanals gezeigt. Die in diesem Projekt gefundene Bindestelle liegt außerhalb der prolinreichen Domäne (Abbildung 35).

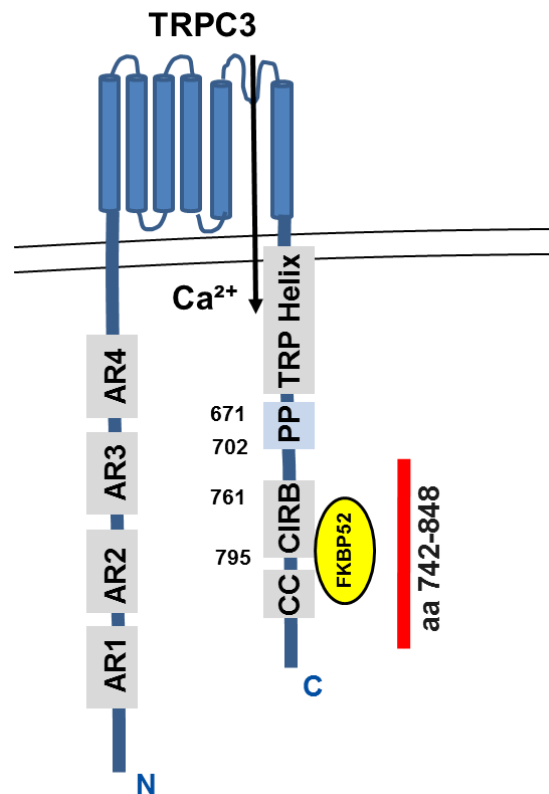


Abbildung 35: Schema der Bindung zwischen TRPC3 und FKBP52

Die Interaktion von TRPC3 und FKBP52 wurde über das C-terminale TRPC3-Fragment (aa 742-848) gefunden. Die prolinreiche Sequenz (PP) war die bisher bekannte Bindestelle von TRPC-Kanälen an FKBP52. Diese Sequenz liegt außerhalb der in dieser Arbeit gefundenen Bindestelle.

Die Ergebnisse stellen auch eine funktionelle Interaktion zwischen TRPC3 und FKBP52 dar, welche sich auf das hypertrophe Wachstum von Kardiomyozyten auswirkt. So kam es nach Downregulation von FKBP52 zu einem verstärkten hypertrophen Wachstum in NRCs, was mit einem erhöhten TRPC3-abhängigen Ca^{2+} -Einstrom einherging. Nach Expression von PPIase-defizienten FKBP52-Mutanten konnte ebenfalls ein erhöhter TRPC3-abhängiger Ca^{2+} -Einstrom festgestellt werden, sowohl in HEK 293 Zellen als auch in NRCs. Damit verbunden war auch eine erhöhte TRPC3-Aktivität in HEK 293 Zellen. Ähnlich wie bei einer Downregulierung von FKBP52, konnte ebenfalls ein verstärktes hypertrophes Wachstum in NRCs und in ARCs, sowie eine erhöhte Calcineurin-Aktivität festgestellt werden (Abbildung 36).

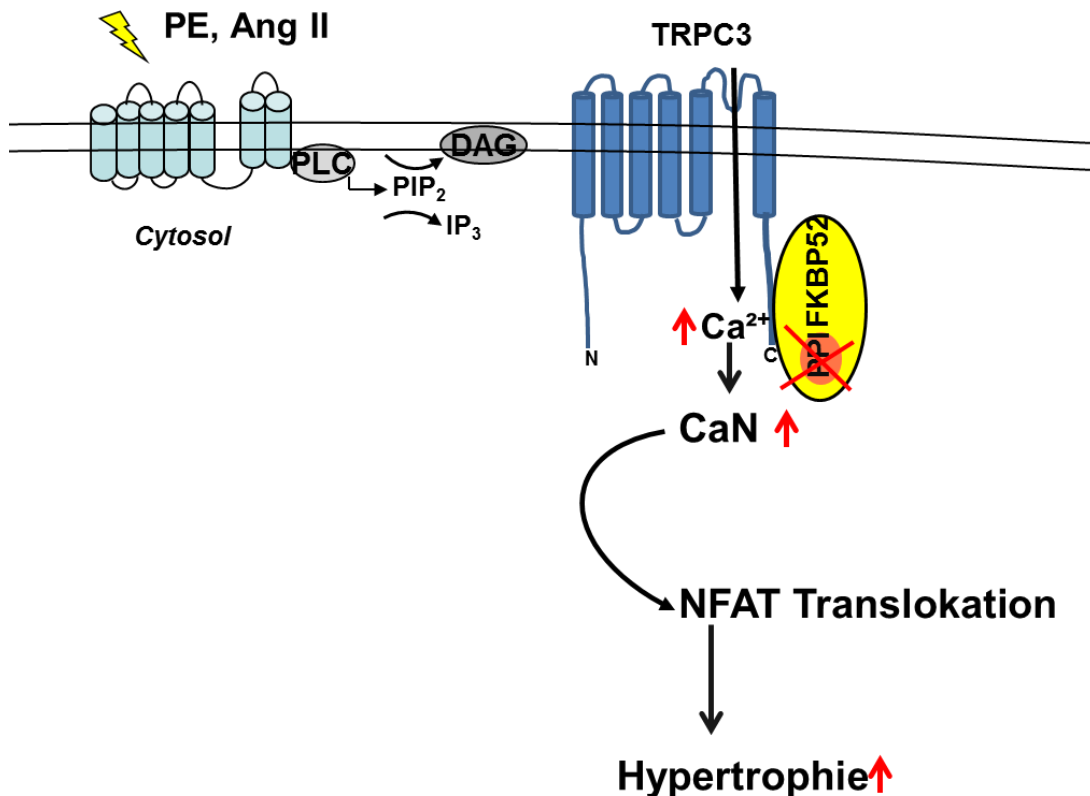


Abbildung 36: Die Interaktion zwischen TRPC3 und FKBP52 beeinflusst das hypertrophe Wachstum, Ca^{2+} -Signale und Ca^{2+} -abhängige Signalwege

Ca^{2+} -Signale, Calcineurin-Aktivität und Hypertrophie sind nach Downregulation von FKBP52 und nach Expression von PPIase-defizienten FKBP52-Mutanten erhöht.

Daraus lässt sich schließen, dass FKBP52 an der Regulation von TRPC3-Kanälen beteiligt ist.

Die Downregulation von FKBP52 und die Überexpression der Mutanten erzielen einen prohypertrophen Effekt, daher scheint ein voll-funktionsfähiges FKBP52 eine schützende Rolle bei der Entwicklung einer Agonisten-vermittelten Hypertrophie in Kardiomyozyten zu spielen.

Um die Interaktion weiter zu untersuchen und die vorhandenen Ergebnisse im Tiermodell zu bestätigen, wären nun im nächsten Schritt *in vivo* Versuche von Interesse. Dafür wären transgene Tiermodelle wichtig, die ein voll funktionsfähiges FKBP52 verstärkt exprimieren oder eine PPIase defiziente FKBP52 Mutante exprimieren. Nach Induktion der Hypertrophie über G_q PCR-Agonisten, welche über Minipumpen verabreicht werden können, könnten verschiedene kardiale Parameter, wie das Herzgewicht, die Kardiomyozytengröße oder der Durchmesser der Ventrikel und die Wanddicke des Herzens untersucht werden. Des Weiteren wäre es auch hier von Interesse Kardiomyozyten zu isolieren und TRPC3-abhängige Ca^{2+} -Signale, sowie die Aktivität von TRPC3 Kanälen zu analysieren.

Zusätzlich könnte auch der CaMKII-Signalweg näher untersucht werden. CaMKII ist eine Serin/Threonin Kinase. Diese wird, wie Calcineurin, über Ca^{2+} und Calmodulin aktiviert

(Schulman & Anderson, 2010). So gibt es vergleichbar zu Calcineurin auch bei der CaMKII einen Zusammenhang mit pathologischem Herzstress und daraus folgender kardialer Hypertrophie. Zum Beispiel erhöht TAC CaMKII-Levels in den Ventrikeln (Colomer, Mao, Rockman, & Means, 2003). Es konnte auch gezeigt werden, dass die Überexpression von Calmodulin in ventrikulären Kardiomyozyten von transgenen Mäusen zu einer Zunahme der endogenen CaMKII Aktivität führt (Colomer & Means, 2000).

Auch die spezifische transgene Überexpression der CamKII im Herzen führt zu Hypertrophie der Kardiomyozyten, was sich durch eine Vergrößerung der Kardiomyozytengröße und der Induktion des fetalen Genprogramms feststellen lässt (Zhang et al., 2002).

Es ist bereits bekannt, dass HDAC4 durch die CamKII phosphoryliert wird, wodurch es aus dem Nucleus ins Cytosol exportiert wird. Nach dem Export von HDAC4 und der damit zusammenhängenden Dissoziation aus dem Komplex mit dem Transkriptionsfaktor *myocyte enhancer factor 2* (MEF2) wird dieser aktiviert (Ginnan, Sun, Schwarz, & Singer, 2012).

Da in dieser Arbeit festgestellt wurde, dass FKBP52 den Calcineurin/NFAT-Signalweg ohne Stimulation des G_qPCR beeinflusst, die Hypertrophie jedoch ohne Stimulation nicht beeinflusst war, wurde untersucht, ob zusätzlich zu dem Calcineurin/NFAT-Signalweg ein anderer Signalweg aktiviert wird, um ein hypertrophes Wachstum beobachten zu können. Bei der Expression von HDAC4 konnten zwar Unterschiede gesehen werden, diese waren jedoch nicht signifikant. Dennoch wäre es von Interesse diesen Weg genauer zu untersuchen. Die Expression von HDAC4 wurde in dieser Arbeit in HEK 293 Zellen analysiert. So wären zum Beispiel die HDAC4 Expression in den zuvor schon erwähnten transgenen Tiermodellen, bei welchen über osmotische Minipumpen mit Ang II Hypertrophie induziert wird, interessant. Ein weiterer Ansatzpunkt wäre zum Beispiel die Aktivität von MEF2 zu untersuchen.

Insgesamt liefert dieses Projekt neue Erkenntnisse über die TRPC3-abhängige Hypertrophie, die durch Stimulation des G_qPCR induziert wird und gibt neue Hinweise auf die Regulation von TRPC3-Kanälen. Desweiteren gibt es Hinweise auf die Rolle von FKBP52 bei der Entwicklung der pathologischen Hypertrophie, die von klinischer Relevanz sein könnten.

Literaturverzeichnis

- Ambudkar, I. S., Brazer, S. C., Liu, X., Lockwich, T., & Singh, B. (2004). Plasma membrane localization of TRPC channels: role of caveolar lipid rafts. *Novartis Found Symp*, 258, 63-70; discussion 70-64, 98-102, 263-106.
- Backs, J., Song, K., Bezprozvannaya, S., Chang, S., & Olson, E. N. (2006). CaM kinase II selectively signals to histone deacetylase 4 during cardiomyocyte hypertrophy. *J Clin Invest*, 116(7), 1853-1864. doi:10.1172/jci27438
- Baer, A., & Kehn-Hall, K. (2014). Viral concentration determination through plaque assays: using traditional and novel overlay systems. *J Vis Exp*(93), e52065. doi:10.3791/52065
- Bandleon, S., Strunz, P. P., Pickel, S., Tiapko, O., Cellini, A., Miranda-Laferte, E., & Eder-Negrin, P. (2019). FKBP52 regulates TRPC3-dependent Ca(2+) signals and the hypertrophic growth of cardiomyocyte cultures. *J Cell Sci*. doi:10.1242/jcs.231506
- Bernardo, B. C., Weeks, K. L., Pretorius, L., & McMullen, J. R. (2010). Molecular distinction between physiological and pathological cardiac hypertrophy: experimental findings and therapeutic strategies. *Pharmacol Ther*, 128(1), 191-227. doi:10.1016/j.pharmthera.2010.04.005
- Berridge, M. J., Bootman, M. D., & Roderick, H. L. (2003). Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 4(7), 517-529. doi:10.1038/nrm1155
- Bers, D. M. (2002). Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature*, 415(6868), 198-205. doi:10.1038/415198a
- Brenner, J. S., & Dolmetsch, R. E. (2007). TrpC3 regulates hypertrophy-associated gene expression without affecting myocyte beating or cell size. *PLoS One*, 2(8), e802. doi:10.1371/journal.pone.0000802
- Brown, D. W., Giles, W. H., & Croft, J. B. (2000). Left ventricular hypertrophy as a predictor of coronary heart disease mortality and the effect of hypertension. *Am Heart J*, 140(6), 848-856. doi:10.1067/mhj.2000.111112
- Bush, E. W., Hood, D. B., Papst, P. J., Chapo, J. A., Minobe, W., Bristow, M. R., . . . McKinsey, T. A. (2006). Canonical transient receptor potential channels promote cardiomyocyte hypertrophy through activation of calcineurin signaling. *J Biol Chem*, 281(44), 33487-33496. doi:10.1074/jbc.M605536200
- Bytyçi, I., & Bajraktari, G. (2015). Mortality in heart failure patients. *Anatolian journal of cardiology*, 15(1), 63-68. doi:10.5152/akd.2014.5731
- Callebaut, I., Renoir, J. M., Lebeau, M. C., Massol, N., Burny, A., Baulieu, E. E., & Mornon, J. P. (1992). An immunophilin that binds M(r) 90,000 heat shock protein: main structural features of a mammalian p59 protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89(14), 6270-6274. doi:10.1073/pnas.89.14.6270
- Chambrud, B., Belabes, H., Fontaine-Lenoir, V., Fellous, A., & Baulieu, E. E. (2007). The immunophilin FKBP52 specifically binds to tubulin and prevents microtubule formation. *Faseb j*, 21(11), 2787-2797. doi:10.1096/fj.06-7667com
- Cheung-Flynn, J., Roberts, P. J., Riggs, D. L., & Smith, D. F. (2003). C-terminal sequences outside the tetratricopeptide repeat domain of FKBP51 and FKBP52 cause differential binding to Hsp90. *J Biol Chem*, 278(19), 17388-17394. doi:10.1074/jbc.M300955200
- Chung, E., & Leinwand, L. A. (2014). Pregnancy as a cardiac stress model. *Cardiovasc Res*, 101(4), 561-570. doi:10.1093/cvr/cvu013
- Colomer, J. M., Mao, L., Rockman, H. A., & Means, A. R. (2003). Pressure overload selectively up-regulates Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase II in vivo. *Mol Endocrinol*, 17(2), 183-192. doi:10.1210/me.2002-0350
- Colomer, J. M., & Means, A. R. (2000). Chronic elevation of calmodulin in the ventricles of transgenic mice increases the autonomous activity of calmodulin-dependent protein kinase II, which regulates atrial natriuretic factor gene expression. *Mol Endocrinol*, 14(8), 1125-1136. doi:10.1210/mend.14.8.0496

- Cosens, D. J., & Manning, A. (1969). Abnormal electroretinogram from a *Drosophila* mutant. *Nature*, 224(5216), 285-287. doi:10.1038/224285a0
- Dagenais, G. R., Leong, D. P., Rangarajan, S., Lanus, F., Lopez-Jaramillo, P., Gupta, R., . . . Yusuf, S. (2019). Variations in common diseases, hospital admissions, and deaths in middle-aged adults in 21 countries from five continents (PURE): a prospective cohort study. *The Lancet*. doi:https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)32007-0
- Davies, T. H., & Sanchez, E. R. (2005). FKBP52. *Int J Biochem Cell Biol*, 37(1), 42-47. doi:10.1016/j.biocel.2004.03.013
- Dewenter, M., von der Lieth, A., Katus, H. A., & Backs, J. (2017). Calcium Signaling and Transcriptional Regulation in Cardiomyocytes. *Circ Res*, 121(8), 1000-1020. doi:10.1161/circresaha.117.310355
- Dietrich, A., Mederos y Schnitzler, M., Emmel, J., Kalwa, H., Hofmann, T., & Gudermann, T. (2003). N-linked protein glycosylation is a major determinant for basal TRPC3 and TRPC6 channel activity. *J Biol Chem*, 278(48), 47842-47852. doi:10.1074/jbc.M302983200
- Dominguez-Rodriguez, A., Ruiz-Hurtado, G., Benitah, J. P., & Gomez, A. M. (2012). The other side of cardiac Ca(2+) signaling: transcriptional control. *Frontiers in physiology*, 3, 452. doi:10.3389/fphys.2012.00452
- Dornquast, C., Kroll, L. E., Neuhauser, H. K., Willich, S. N., Reinhold, T., & Busch, M. A. (2016). Regional Differences in the Prevalence of Cardiovascular Disease. *Deutsches Arzteblatt international*, 113(42), 704-711. doi:10.3238/arztebl.2016.0704
- Dragun, M., Gazova, A., Kyselovic, J., Hulman, M., & Matus, M. (2019). TRP Channels Expression Profile in Human End-Stage Heart Failure. *Medicina (Kaunas)*, 55(7). doi:10.3390/medicina55070380
- Eder, P. (2017). Cardiac Remodeling and Disease: SOCE and TRPC Signaling in Cardiac Pathology. *Adv Exp Med Biol*, 993, 505-521. doi:10.1007/978-3-319-57732-6_25
- Eder, P., & Molkentin, J. D. (2011). TRPC channels as effectors of cardiac hypertrophy. *Circ Res*, 108(2), 265-272. doi:10.1161/circresaha.110.225888
- Eder, P., Schindl, R., Romanin, C., & Groschner, K. (2007). Frontiers in Neuroscience Protein-Protein Interactions in TRPC Channel Complexes. In W. B. Liedtke & S. Heller (Eds.), *TRP Ion Channel Function in Sensory Transduction and Cellular Signaling Cascades*. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis Taylor & Francis Group, LLC.
- Erlejtman, A. G., Lagadari, M., Harris, D. C., Cox, M. B., & Galigniana, M. D. (2014). Molecular chaperone activity and biological regulatory actions of the TPR-domain immunophilins FKBP51 and FKBP52. *Curr Protein Pept Sci*, 15(3), 205-215.
- Fassett, J. T., Xu, X., Hu, X., Zhu, G., French, J., Chen, Y., & Bache, R. J. (2009). Adenosine regulation of microtubule dynamics in cardiac hypertrophy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 297(2), H523-532. doi:10.1152/ajpheart.00462.2009
- Forrester, S. J., Booz, G. W., Sigmund, C. D., Coffman, T. M., Kawai, T., Rizzo, V., . . . Eguchi, S. (2018). Angiotensin II Signal Transduction: An Update on Mechanisms of Physiology and Pathophysiology. *Physiol Rev*, 98(3), 1627-1738. doi:10.1152/physrev.00038.2017
- Frey, N., Katus, H. A., Olson, E. N., & Hill, J. A. (2004). Hypertrophy of the heart: a new therapeutic target? *Circulation*, 109(13), 1580-1589. doi:10.1161/01.Cir.0000120390.68287.Bb
- Frey, N., & Olson, E. N. (2003). Cardiac hypertrophy: the good, the bad, and the ugly. *Annu Rev Physiol*, 65, 45-79. doi:10.1146/annurev.physiol.65.092101.142243
- Gaburjakova, M., Gaburjakova, J., Reiken, S., Huang, F., Marx, S. O., Rosemblyt, N., & Marks, A. R. (2001). FKBP12 binding modulates ryanodine receptor channel gating. *J Biol Chem*, 276(20), 16931-16935. doi:10.1074/jbc.M100856200
- Gao, H., Wang, F., Wang, W., Makarewich, C. A., Zhang, H., Kubo, H., . . . Houser, S. R. (2012). Ca(2+) influx through L-type Ca(2+) channels and transient receptor potential channels activates pathological hypertrophy signaling. *J Mol Cell Cardiol*, 53(5), 657-667. doi:10.1016/j.yjmcc.2012.08.005

- Ghartey-Kwansah, G., Li, Z., Feng, R., Wang, L., Zhou, X., Chen, F. Z., . . . Xu, X. (2018). Comparative analysis of FKBP family protein: evaluation, structure, and function in mammals and *Drosophila melanogaster*. *BMC Developmental Biology*, *18*, 7. doi:10.1186/s12861-018-0167-3
- Ginnan, R., Sun, L. Y., Schwarz, J. J., & Singer, H. A. (2012). MEF2 is regulated by CaMKII δ 2 and a HDAC4-HDAC5 heterodimer in vascular smooth muscle cells. *Biochem J*, *444*(1), 105-114. doi:10.1042/bj20120152
- Goel, M., Garcia, R., Estacion, M., & Schilling, W. P. (2001). Regulation of *Drosophila* TRPL channels by immunophilin FKBP59. *J Biol Chem*, *276*(42), 38762-38773. doi:10.1074/jbc.M104125200
- Gradman, A. H., & Alfayoumi, F. (2006). From left ventricular hypertrophy to congestive heart failure: management of hypertensive heart disease. *Prog Cardiovasc Dis*, *48*(5), 326-341. doi:10.1016/j.pcad.2006.02.001
- Grossman, W., Jones, D., & McLaurin, L. P. (1975). Wall stress and patterns of hypertrophy in the human left ventricle. *J Clin Invest*, *56*(1), 56-64. doi:10.1172/jci108079
- Hardie, R. C., & Minke, B. (1992). The *trp* gene is essential for a light-activated Ca²⁺ channel in *Drosophila* photoreceptors. *Neuron*, *8*(4), 643-651. doi:10.1016/0896-6273(92)90086-s
- Hardie, R. C., & Minke, B. (1993). Novel Ca²⁺ channels underlying transduction in *Drosophila* photoreceptors: implications for phosphoinositide-mediated Ca²⁺ mobilization. *Trends Neurosci*, *16*(9), 371-376. doi:10.1016/0166-2236(93)90095-4
- Harding, M. W., Galat, A., Uehling, D. E., & Schreiber, S. L. (1989). A receptor for the immunosuppressant FK506 is a cis-trans peptidyl-prolyl isomerase. *Nature*, *341*(6244), 758-760. doi:10.1038/341758a0
- He, X., Li, S., Liu, B., Susperreguy, S., Formoso, K., Yao, J., . . . Liao, Y. (2017). Major contribution of the 3/6/7 class of TRPC channels to myocardial ischemia/reperfusion and cellular hypoxia/reoxygenation injuries. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *114*(23), E4582-e4591. doi:10.1073/pnas.1621384114
- Heineke, J., & Molkentin, J. D. (2006). Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *7*(8), 589-600. doi:10.1038/nrm1983
- Kang, C. B., Hong, Y., Dhe-Paganon, S., & Yoon, H. S. (2008). FKBP family proteins: immunophilins with versatile biological functions. *Neurosignals*, *16*(4), 318-325. doi:10.1159/000123041
- Kiyonaka, S., Kato, K., Nishida, M., Mio, K., Numaga, T., Sawaguchi, Y., . . . Mori, Y. (2009). Selective and direct inhibition of TRPC3 channels underlies biological activities of a pyrazole compound. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *106*(13), 5400-5405. doi:10.1073/pnas.0808793106
- Kawahara, K., Wang, Y., McAnally, J., Richardson, J. A., Bassel-Duby, R., Hill, J. A., & Olson, E. N. (2006). TRPC6 fulfills a calcineurin signaling circuit during pathologic cardiac remodeling. *J Clin Invest*, *116*(12), 3114-3126. doi:10.1172/jci27702
- Lehnart, S. E., Huang, F., Marx, S. O., & Marks, A. R. (2003). Immunophilins and coupled gating of ryanodine receptors. *Curr Top Med Chem*, *3*(12), 1383-1391. doi:10.2174/1568026033451907
- Li, H., Rao, A., & Hogan, P. G. (2011). Interaction of calcineurin with substrates and targeting proteins. *Trends Cell Biol*, *21*(2), 91-103. doi:10.1016/j.tcb.2010.09.011
- Lichtenegger, M., Stockner, T., Poteser, M., Schleifer, H., Platzer, D., Romanin, C., & Groschner, K. (2013). A novel homology model of TRPC3 reveals allosteric coupling between gate and selectivity filter. *Cell Calcium*, *54*(3), 175-185. doi:10.1016/j.ceca.2013.05.010
- Liu, J., Farmer, J. D., Jr., Lane, W. S., Friedman, J., Weissman, I., & Schreiber, S. L. (1991). Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell*, *66*(4), 807-815. doi:10.1016/0092-8674(91)90124-h
- MacMillan, D. (2013). FK506 binding proteins: cellular regulators of intracellular Ca²⁺ signalling. *Eur J Pharmacol*, *700*(1-3), 181-193. doi:10.1016/j.ejphar.2012.12.029

- Maillet, M., van Berlo, J. H., & Molkentin, J. D. (2013). Molecular basis of physiological heart growth: fundamental concepts and new players. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *14*(1), 38-48. doi:10.1038/nrm3495
- Minke, B. (1977). Drosophila mutant with a transducer defect. *Biophys Struct Mech*, *3*(1), 59-64. doi:10.1007/bf00536455
- Molkentin, J. D., Lu, J. R., Antos, C. L., Markham, B., Richardson, J., Robbins, J., . . . Olson, E. N. (1998). A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy. *Cell*, *93*(2), 215-228. doi:10.1016/s0092-8674(00)81573-1
- Montell, C. (2005). The TRP superfamily of cation channels. *Sci STKE*, *2005*(272), re3. doi:10.1126/stke.2722005re3
- Montell, C., & Rubin, G. M. (1989). Molecular characterization of the Drosophila trp locus: a putative integral membrane protein required for phototransduction. *Neuron*, *2*(4), 1313-1323. doi:10.1016/0896-6273(89)90069-x
- Mudd, J. O., & Kass, D. A. (2008). Tackling heart failure in the twenty-first century. *Nature*, *451*(7181), 919-928. doi:10.1038/nature06798
- Nakayama, H., Wilkin, B. J., Bodi, I., & Molkentin, J. D. (2006). Calcineurin-dependent cardiomyopathy is activated by TRPC in the adult mouse heart. *Faseb j*, *20*(10), 1660-1670. doi:10.1096/fj.05-5560com
- Niizeki, T., Takeishi, Y., Kitahara, T., Arimoto, T., Ishino, M., Bilim, O., . . . Kubota, I. (2008). Diacylglycerol kinase-epsilon restores cardiac dysfunction under chronic pressure overload: a new specific regulator of G α (q) signaling cascade. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, *295*(1), H245-255. doi:10.1152/ajpheart.00066.2008
- Nilius, B., & Owsianik, G. (2011). The transient receptor potential family of ion channels. *Genome Biol*, *12*(3), 218. doi:10.1186/gb-2011-12-3-218
- O'Connell, T. D., Jensen, B. C., Baker, A. J., & Simpson, P. C. (2013). Cardiac alpha1-adrenergic receptors: novel aspects of expression, signaling mechanisms, physiologic function, and clinical importance. *Pharmacological reviews*, *66*(1), 308-333. doi:10.1124/pr.112.007203
- Ohba, T., Watanabe, H., Murakami, M., Takahashi, Y., Iino, K., Kuromitsu, S., . . . Ito, H. (2007). Upregulation of TRPC1 in the development of cardiac hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol*, *42*(3), 498-507. doi:10.1016/j.yjmcc.2006.10.020
- Olivares-Florez, S., Czolbe, M., Riediger, F., Seidlmayer, L., Williams, T., Nordbeck, P., . . . Ritter, O. (2018). Nuclear calcineurin is a sensor for detecting Ca(2+) release from the nuclear envelope via IP3R. *J Mol Med (Berl)*, *96*(11), 1239-1249. doi:10.1007/s00109-018-1701-2
- Onohara, N., Nishida, M., Inoue, R., Kobayashi, H., Sumimoto, H., Sato, Y., . . . Kurose, H. (2006). TRPC3 and TRPC6 are essential for angiotensin II-induced cardiac hypertrophy. *Embo j*, *25*(22), 5305-5316. doi:10.1038/sj.emboj.7601417
- Parra, V., & Rothermel, B. A. (2017). Calcineurin signaling in the heart: The importance of time and place. *J Mol Cell Cardiol*, *103*, 121-136. doi:10.1016/j.yjmcc.2016.12.006
- Phillips, A. M., Bull, A., & Kelly, L. E. (1992). Identification of a Drosophila gene encoding a calmodulin-binding protein with homology to the trp phototransduction gene. *Neuron*, *8*(4), 631-642. doi:10.1016/0896-6273(92)90085-r
- Poteser, M., Graziani, A., Rosker, C., Eder, P., Derler, I., Kahr, H., . . . Groschner, K. (2006). TRPC3 and TRPC4 associate to form a redox-sensitive cation channel. Evidence for expression of native TRPC3-TRPC4 heteromeric channels in endothelial cells. *J Biol Chem*, *281*(19), 13588-13595. doi:10.1074/jbc.M512205200
- Ramsey, I. S., Delling, M., & Clapham, D. E. (2006). An introduction to TRP channels. *Annu Rev Physiol*, *68*, 619-647. doi:10.1146/annurev.physiol.68.040204.100431
- Renoir, J. M., Radanyi, C., Faber, L. E., & Baulieu, E. E. (1990). The non-DNA-binding heterooligomeric form of mammalian steroid hormone receptors contains a hsp90-bound 59-kilodalton protein. *J Biol Chem*, *265*(18), 10740-10745.
- Riggs, D. L., Roberts, P. J., Chirillo, S. C., Cheung-Flynn, J., Prapapanich, V., Ratajczak, T., . . . Smith, D. F. (2003). The Hsp90-binding peptidylprolyl isomerase FKBP52 potentiates glucocorticoid signaling in vivo. *Embo j*, *22*(5), 1158-1167. doi:10.1093/emboj/cdg108

- Rosker, C., Graziani, A., Lukas, M., Eder, P., Zhu, M. X., Romanin, C., & Groschner, K. (2004). Ca²⁺ signaling by TRPC3 involves Na⁺ entry and local coupling to the Na⁺/Ca²⁺ exchanger. *J Biol Chem*, 279(14), 13696-13704. doi:10.1074/jbc.M308108200
- Samak, M., Fatullayev, J., Sabashnikov, A., Zeriouh, M., Schmack, B., Farag, M., . . . Weymann, A. (2016). Cardiac Hypertrophy: An Introduction to Molecular and Cellular Basis. *Med Sci Monit Basic Res*, 22, 75-79. doi:10.12659/msmbr.900437
- Schiattarella, G. G., & Hill, J. A. (2015). Inhibition of hypertrophy is a good therapeutic strategy in ventricular pressure overload. *Circulation*, 131(16), 1435-1447. doi:10.1161/circulationaha.115.013894
- Schulman, H., & Anderson, M. E. (2010). Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II in heart failure. *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms*, 7(2), e117-e122. doi:https://doi.org/10.1016/j.ddmec.2010.07.005
- Sewell, T. J., Lam, E., Martin, M. M., Leszyk, J., Weidner, J., Calaycay, J., . . . et al. (1994). Inhibition of calcineurin by a novel FK-506-binding protein. *J Biol Chem*, 269(33), 21094-21102.
- Shim, S., Yuan, J. P., Kim, J. Y., Zeng, W., Huang, G., Milshteyn, A., . . . Worley, P. F. (2009). Peptidyl-prolyl isomerase FKBP52 controls chemotropic guidance of neuronal growth cones via regulation of TRPC1 channel opening. *Neuron*, 64(4), 471-483. doi:10.1016/j.neuron.2009.09.025
- Shimizu, I., & Minamino, T. (2016). Physiological and pathological cardiac hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol*, 97, 245-262. doi:10.1016/j.yjmcc.2016.06.001
- Siekierka, J. J., Hung, S. H., Poe, M., Lin, C. S., & Sigal, N. H. (1989). A cytosolic binding protein for the immunosuppressant FK506 has peptidyl-prolyl isomerase activity but is distinct from cyclophilin. *Nature*, 341(6244), 755-757. doi:10.1038/341755a0
- Siekierka, J. J., Wiederrecht, G., Greulich, H., Boulton, D., Hung, S. H., Cryan, J., . . . Sigal, N. H. (1990). The cytosolic-binding protein for the immunosuppressant FK-506 is both a ubiquitous and highly conserved peptidyl-prolyl cis-trans isomerase. *J Biol Chem*, 265(34), 21011-21015.
- Singh, B. B., Lockwich, T. P., Bandyopadhyay, B. C., Liu, X., Bollimuntha, S., Brazer, S. C., . . . Ambudkar, I. S. (2004). VAMP2-dependent exocytosis regulates plasma membrane insertion of TRPC3 channels and contributes to agonist-stimulated Ca²⁺ influx. *Mol Cell*, 15(4), 635-646. doi:10.1016/j.molcel.2004.07.010
- Sinkins, W. G., Goel, M., Estacion, M., & Schilling, W. P. (2004). Association of immunophilins with mammalian TRPC channels. *J Biol Chem*, 279(33), 34521-34529. doi:10.1074/jbc.M401156200
- Sivils, J. C., Storer, C. L., Galigniana, M. D., & Cox, M. B. (2011). Regulation of steroid hormone receptor function by the 52-kDa FK506-binding protein (FKBP52). *Curr Opin Pharmacol*, 11(4), 314-319. doi:10.1016/j.coph.2011.03.010
- Tai, P. K., Maeda, Y., Nakao, K., Wakim, N. G., Duhring, J. L., & Faber, L. E. (1986). A 59-kilodalton protein associated with progestin, estrogen, androgen, and glucocorticoid receptors. *Biochemistry*, 25(18), 5269-5275. doi:10.1021/bi00366a043
- Taigen, T., De Windt, L. J., Lim, H. W., & Molkentin, J. D. (2000). Targeted inhibition of calcineurin prevents agonist-induced cardiomyocyte hypertrophy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(3), 1196-1201. doi:10.1073/pnas.97.3.1196
- Tang, J., Lin, Y., Zhang, Z., Tikunova, S., Birnbaumer, L., & Zhu, M. X. (2001). Identification of common binding sites for calmodulin and inositol 1,4,5-trisphosphate receptors on the carboxyl termini of trp channels. *J Biol Chem*, 276(24), 21303-21310. doi:10.1074/jbc.M102316200
- Tiapko, O., & Groschner, K. (2018). TRPC3 as a Target of Novel Therapeutic Interventions. *Cells*, 7(7), 83. doi:10.3390/cells7070083
- Treves, S., Franzini-Armstrong, C., Moccagatta, L., Arnoult, C., Grasso, C., Schrum, A., . . . Zorzato, F. (2004). Junctate is a key element in calcium entry induced by activation of InsP₃ receptors and/or calcium store depletion. *J Cell Biol*, 166(4), 537-548. doi:10.1083/jcb.200404079

- van Rossum, D. B., Patterson, R. L., Sharma, S., Barrow, R. K., Kornberg, M., Gill, D. L., & Snyder, S. H. (2005). Phospholipase Cgamma1 controls surface expression of TRPC3 through an intermolecular PH domain. *Nature*, *434*(7029), 99-104. doi:10.1038/nature03340
- Vazquez, G., Wedel, B. J., Aziz, O., Trebak, M., & Putney, J. W. (2004). The mammalian TRPC cation channels. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, *1742*(1), 21-36. doi:https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2004.08.015
- Venkatachalam, K., & Montell, C. (2007). TRP channels. *Annu Rev Biochem*, *76*, 387-417. doi:10.1146/annurev.biochem.75.103004.142819
- Wagner, S., & Cohn, K. (1977). Heart failure. A proposed definition and classification. *Arch Intern Med*, *137*(5), 675-678. doi:10.1001/archinte.137.5.675
- Wilkins, B. J., & Molkentin, J. D. (2004). Calcium-calcineurin signaling in the regulation of cardiac hypertrophy. *Biochem Biophys Res Commun*, *322*(4), 1178-1191. doi:10.1016/j.bbrc.2004.07.121
- Woo, D. H., Jung, S. J., Zhu, M. H., Park, C. K., Kim, Y. H., Oh, S. B., & Lee, C. J. (2008). Direct activation of transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) by diacylglycerol (DAG). *Mol Pain*, *4*, 42. doi:10.1186/1744-8069-4-42
- Wu, X., Eder, P., Chang, B., & Molkentin, J. D. (2010). TRPC channels are necessary mediators of pathologic cardiac hypertrophy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(15), 7000-7005. doi:10.1073/pnas.1001825107
- Yuan, J. P., Kiselyov, K., Shin, D. M., Chen, J., Shcheynikov, N., Kang, S. H., . . . Worley, P. F. (2003). Homer binds TRPC family channels and is required for gating of TRPC1 by IP3 receptors. *Cell*, *114*(6), 777-789. doi:10.1016/s0092-8674(03)00716-5
- Yue, Z., Xie, J., Yu, A. S., Stock, J., Du, J., & Yue, L. (2015). Role of TRP channels in the cardiovascular system. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, *308*(3), H157-182. doi:10.1152/ajpheart.00457.2014
- Zhang, T., Johnson, E. N., Gu, Y., Morissette, M. R., Sah, V. P., Gigena, M. S., . . . Brown, J. H. (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*(2), 1261-1267. doi:10.1074/jbc.M108525200

Lebenslauf

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt die Dissertation „Der Einfluss von FKBP52 auf die Funktion von TRPC3 Kanälen im Herzen“ eigenständig, d.h. insbesondere selbständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

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

Würzburg, den

Sandra Bandleon

Affidavit

I hereby confirm that my thesis entitled “Role of FKBP52 in the regulation of TRPC3 channels in the heart” is the result of my own work. I did not receive any help or support from commercial consultants. All sources and / or materials applied are listed and specified in the thesis.

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

Würzburg, den

Sandra Bandleon