

Vergleichende Charakterisierung der humanen Calcineurin-Isoformen

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der
Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Biowissenschaften
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Susann Kilka

geb. am 27. 07. 1979 in Leipzig

Gutachter: 1.
2.
3.

Halle (Saale),

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Phosphorylierung als Regulationsmechanismus	1
1.2	Einteilung der Proteinphosphatasen	2
1.3	Die Proteinphosphatase Calcineurin	3
1.3.1	Struktur des Calcineurins	4
1.3.1.1	Die katalytische Untereinheit des Calcineurins und ihre Isoformen	4
1.3.1.2	Die regulatorische Untereinheit des Calcineurins und ihre Isoformen	7
1.3.2	Regulation der Calcineurin-Aktivität	9
1.3.3	Physiologische Funktionen der Calcineurin-Isoformen	10
1.3.3.1	Calcineurin im Immunsystem	11
1.3.3.2	Calcineurin in Muskelzellen	13
1.3.3.3	Calcineurin im Nervensystem	14
1.3.3.4	Calcineurin in der Niere	15
1.3.4	Die Inhibition des Calcineurins	17
1.3.4.1	PPlasen und ihre Rolle in der Immunsuppression	18
2	Zielstellung	21
3	Material und Methoden	22
3.1	Material	22
3.1.1	Laborchemikalien	22
3.1.2	Radiochemikalien	24
3.1.3	Enzyme, Proteine, Peptide	24
3.1.4	Antikörper	25
3.1.5	Standards	25
3.1.6	Kits	26
3.1.7	Plasmide	26
3.1.8	Templates für PCR	26
3.1.9	PCR-Primer	27
3.1.10	Humane Zelllinien	28
3.1.11	Bakterienstämme	29
3.1.12	Medien für die Kultivierung von <i>E. coli</i>	29
3.1.13	Chemikalien und Medien für die Zellkultur	29
3.2	Methoden	30
3.2.1	Molekularbiologische Methoden	30
3.2.1.1	PCR	30
3.2.1.2	Mutagenese	32
3.2.1.3	Restriktionsansätze	32
3.2.1.4	Ligation	32
3.2.1.5	Herstellung chemisch-kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	33
3.2.1.6	Kultivierung und Aufbewahrung von <i>E. coli</i> -Zellen	33
3.2.1.7	Transformation	33
3.2.1.8	Isolation von Plasmid-DNA	33
3.2.1.8.1	Minipräparation mit Qiagen Plasmid Mini Kit	33
3.2.1.8.2	Maxipräparation mit Qiagen Plasmid Maxi Kit	34
3.2.1.9	Bestimmung des DNA-Gehaltes	34
3.2.1.10	Agarosegel-Elektrophorese	34
3.2.1.11	Isolation von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	35
3.2.2	Proteinbiochemische Methoden	35
3.2.2.1	Überexpression der rekombinanten Proteine	35
3.2.2.2	Zellaufschluss	35
3.2.2.3	Überexpression und Reinigung der CaN-Isoformen	36
3.2.2.4	Proteinbestimmung	37

3.2.2.4.1	Proteinbestimmung nach Bradford	37
3.2.2.4.2	Spektrophotometrische Proteinbestimmung	38
3.2.2.5	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	38
3.2.2.6	Coomassie-Färbung	38
3.2.2.7	Western Blot	39
3.2.2.8	Co-Präzipitationsexperimente	40
3.2.2.9	CD-Spektroskopie	41
3.2.2.10	Protease-gekoppelter PPlase-Test	42
3.2.2.11	Phosphorylierung der Proteinsubstrate	43
3.2.2.12	Phosphatase-Aktivitätsmessung mittels Proteinsubstraten	43
3.2.2.13	Aktivitätsmessungen mittels pNPP	44
3.2.2.14	Phosphorylierung des RII-Peptids	45
3.2.2.15	Phosphatase-Aktivitätsmessung mittels ³³ P-RII-Peptid	46
3.2.3	Zellbiologische Methoden	46
3.2.3.1	Kultivierung der humanen Zelllinien	46
3.2.3.2	Transfektion der Zellen mittels Elektroporation oder Lipofektion	48
3.2.3.3	RNA Interferenz-Experimente	48
3.2.3.4	Messung der NFAT-Reportergen-Aktivität	49
3.2.3.5	Messung der Elk-1- Reportergen-Aktivität	49
3.2.3.6	Immunfluoreszenz	50
4	Ergebnisse	51
4.1	Klonierung und Reinigung der humanen CaN-Isoformen	51
4.1.1	Klonierung	51
4.1.2	Expression und Reinigung	52
4.2	Charakterisierung der humanen CaN-Isoformen	54
4.2.1	Strukturuntersuchungen mittels CD-Spektroskopie	55
4.2.2	Verteilung der Calcineurin-Isoformen in humanen Zelllinien	57
4.2.3	Enzymkinetischer Vergleich der CaN-Isoformen	60
4.2.3.1	Charakterisierung der CaN-Aktivität mittels pNPP	61
4.2.3.2	Charakterisierung der CaN-Aktivität mittels RII-Peptid	63
4.2.3.3	Charakterisierung der CaN-Aktivität mittels Proteinsubstraten	65
4.3	Charakterisierung der CaN A β ²²⁻⁵²⁴ /CaN B1-Variante	75
4.3.1	Klonierung, Expression und Reinigung	75
4.3.2	Strukturuntersuchungen mittels CD-Spektroskopie	76
4.3.3	Verteilung des CaN A β ²²⁻⁵²⁴ in humanen Zelllinien	78
4.3.4	Charakterisierung der CaN-Aktivität mittels pNPP	79
4.3.5	Charakterisierung des CaN A β ²²⁻⁵²⁴ /CaN B1 mittels Peptid- und Proteinsubstraten	80
4.4	Vergleich der Inhibition der CaN-Isoformen durch FKBP12/FK506 und Cyp18/CsA	85
4.5	Vergleichende Analyse zur Relevanz immunsuppressiver Komplexe	92
4.5.1	Identifizierung von CaN-interagierenden FKBP/FK506-Komplexen	92
4.5.1.1	Einfluss der FKBP/FK506-Komplexe auf die zelluläre CaN-Inhibition	96
4.5.1.2	Identifizierung von Aminosäureresten der FKBP für die CaN-Bindung	101
4.5.2	Beteiligung verschiedener Cyp an der CsA-vermittelten Immunsuppression	104
4.5.2.1	Identifizierung von CaN-interagierenden Cyp/CsA-Komplexen	105
4.5.2.2	Einfluss der Cyp/CsA-Komplexe auf die zelluläre CaN-Inhibition	107
5	Diskussion	111
5.1	Expression und Reinigung der humanen CaN-Isoformen	111
5.2	CaN-Isoformen unterscheiden sich in ihrer Substratspezifität	115
5.3	Die prolinreiche Sequenz des CaN A β beeinflusst die katalytischen Konstanten	125
5.4	Einfluss von FKBP12/FK506 und Cyp18/CsA auf die Aktivität der CaN-Isoformen	128
5.5	Identifizierung an der Immunsuppression beteiligter Immunophiline	132
5.6	Die Aminosäurereste K34 und I90 des FKBP12 vermitteln die differentielle CaN-Inhibition	136
6	Zusammenfassung	138
7	Literaturverzeichnis	142

Abkürzungsverzeichnis:

AKAP79	<i>A-kinase anchoring protein</i>
AP-1	Aktivierendes Protein 1
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
Bcl-2	B-Zell-Leukämie-Onkogen 2
bidest.	2-fach destilliertes Wasser
BSA	bovines Serumalbumin
CaM	Calmodulin
CaN	Calcineurin
CaN A	katalytische Untereinheit des Calcineurins
CaN B	regulatorische Untereinheit des Calcineurins
CRE	<i>cAMP response element</i>
CREB	<i>cAMP response element binding protein</i>
CsA	Cyclosporin A
Cyp	Cyclophilin
Da	Dalton
DAPI	4',6-Diamino-2-phenylindol
DARPP-32	Dopamin- und cAMP-abhängiges Phosphoprotein-32
[Dat-Sar ³] CsA	[Dimethylaminoethylthiosarcosin ³] CsA
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DSCR	<i>Down Syndrome critical region</i>
DTT	Dithiothreitol
EC ₅₀	Konzentration, bei der 50 % der vollständigen Aktivierung erreicht sind
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykol-bis-(2-aminoethyl)-tetraessigsäure
ER	endoplasmatischen Retikulum
FCS	fötales Kälberserum
FKBP	FK506-bindendes Protein
GM-CSF	Granulocyten/Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
GSK-3β	Glykogen-Synthase-Kinase-3β
HAD	Haloacid Dehalogenase
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure
Hsp	Hitzeschutzfaktor
IgG	Immunglobulin G
IC ₅₀	Konzentration, bei der 50 % der Aktivität inhibiert sind
IL	Interleukin
IPTG	Isopropyl-1-thio-β-D-galactosid
JNK1	c-jun-N-terminale Kinase1
k	Anfangsanstieg
k _{cat}	Wechselzahl, Reaktionsgeschwindigkeit
k _{cat} /K _m	katalytische Effizienz
kDa	Kilodalton
K _m	Michaelis Menten Konstante
LB	Luria Broth
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
mRNA	<i>messenger</i> Ribonucleinsäure
mTOR	<i>mammalian target of rapamycin</i>
NES	<i>nuclear export sequence</i>
NFAT	nuklearer Faktor aktivierter T-Zellen
NFκB	nuklearer Faktor κB
NLS	<i>nuclear localization sequence</i>
NOS	NO-Synthase
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese

PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
pH	negativer $\log[H^+]$
pI	isoelektrischer Punkt
PKA	<i>cAMP</i> -abhängige Proteinkinase A
PMA	<i>phorbol myristate acetate</i>
pNPP	para-Nitrophenylphosphat
PP	Proteinphosphatase
PPII	Polyprolin Helix des Typs II
PPIase	Peptidyl-Prolyl- <i>cis/trans</i> -Isomerase
PPM	Mg^{2+} oder Mn^{2+} -abhängige Proteinphosphatasen
PPP	Phospho-Proteinphosphatase
<i>PPP3CA</i>	Gen der α -Isoform des Calcineurin A
<i>PPP3CB</i>	Gen der β -Isoform des Calcineurin A
<i>PPP3CC</i>	Gen der γ -Isoform des Calcineurin A
RII	RII-Untereinheit der bovinen PKA
RFP	rot fluoreszierendes Protein
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SCP	<i>small c-terminal domain phosphatase</i>
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
SH3	<i>src homology 3</i>
siRNA	<i>small interfering dsRNA</i>
SR	sarkoplasmatisches Retikulum
TAE	Tris-Azetat-EDTA-Puffer
TCA	<i>trichlor acid</i>
TCR	T-Zell-Rezeptor
TEMED	<i>N, N, N', N'</i> -Tetramethyl-ethylendiamin
TNF α	Tumornekrosefaktor- α
TPR	Tetratricopeptid-Motiv
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Unit
UV	ultraviolett
v	Reaktionsgeschwindigkeit
V_{max}	maximale Reaktionsgeschwindigkeit
WT	Wildtyp
x g	x-fache der Erdbeschleunigung
% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Masseprozent

1 Einleitung

1.1 Phosphorylierung als Regulationsmechanismus

Eine Zelle muss ständig in der Lage sein, auf Signale aus ihrer Umgebung zu reagieren. Oft werden Informationen durch posttranslationale Modifizierungen von Proteinen übermittelt. Dabei ist die Phosphorylierung einer der wichtigsten Regulationsmechanismen im gesamten Organismenreich. Obwohl bei weitem noch nicht alle Phosphorylierungsstellen *in vivo* in Proteinen entdeckt wurden, wird vermutet, dass mindestens ein Drittel aller Proteine durch diesen Mechanismus reguliert wird (Cohen, 2001).

Der Phosphorylierungszustand eines Proteins wird durch die fein-abgestimmte Aktivität von Proteinkinasen und Proteinphosphatasen beeinflusst. Auf der DNA des Menschen werden 518 Proteinkinasen und im Gegensatz dazu nur 147 katalytische Untereinheiten von Proteinphosphatasen kodiert (Alonso et al., 2004). Während Proteinkinasen den γ -Phosphatrest von einem Phosphatgruppendonator, zum Beispiel ATP, auf eine Akzeptoraminosäure übertragen, katalysieren die Proteinphosphatasen die Hydrolyse der Phosphorsäureester-Bindung (Dodge und Scott, 2003).

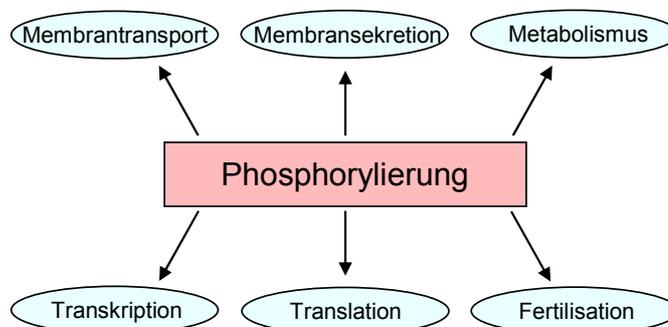


Abb. 1.1: Bedeutung der reversiblen Phosphorylierung in der Zelle

Das Schema zeigt durch Phosphorylierung beeinflusste zelluläre Prozesse.

Durch diese Prozesse wird zum Beispiel die enzymatische Aktivität des Proteins, die Proteinkonformation, die subzelluläre Lokalisierung, die Lebensdauer oder die Bindung an andere Proteine kontrolliert. Die reversible Phosphorylierung koordiniert außerdem eine Vielzahl zellulärer Prozesse, wie zum Beispiel den Membrantransport und die Membransekretion, aber auch die Gentranskription und Gentranslation, den Metabolismus und die Fertilisation (Cohen, 1989) (Abb. 1.1). Außerdem haben RNA Interferenz-Experimente gezeigt, dass eine erstaunlich große Anzahl von Proteinphosphatasen eine entscheidende Rolle bei der Regulation des Zellzyklus spielen (Mukherji et al., 2006). Bei

Krankheiten, wie Alzheimer, Krebs, Diabetes und rheumatischer Arthritis ist das fein regulierte Gleichgewicht zwischen Phosphorylierung und Dephosphorylierung gestört (Cohen, 2000). Aus diesem Grund stellen Proteinkinasen das zweithäufigste Target für Medikamente in der Pharmaindustrie dar (Cohen, 2002). In den letzten Jahren wurde auch begonnen, den Fokus auf Proteinphosphatasen als zukünftige therapeutische Ziele zu lenken (Tonks, 2006; Zhang et al., 2006).

1.2 Einteilung der Proteinphosphatasen

Die Proteinphosphatasen wurden ursprünglich aufgrund ihrer Substratspezifität in Tyrosin-, Serin/Threonin- und in dualspezifische Proteinphosphatasen unterteilt (Ingebritsen und Cohen, 1983).

Eine neuere Klassifizierung der Serin/Threonin-Proteinphosphatasen bezieht sich auf die phylogenetische Verwandtschaft der Enzyme, durch die aber die Einteilung nach der Substratspezifität nicht beeinträchtigt wurde. Demnach werden durch die PPP-Gen-Familie (Phospho-Proteinphosphatasen) die PP1, die PP2A und die PP2B (auch PPP3 oder Calcineurin) kodiert, während die PP2C der PPM-Gen-Familie (Mg^{2+} oder Mn^{2+} -abhängige Proteinphosphatasen) angehört (Barford, 1996).

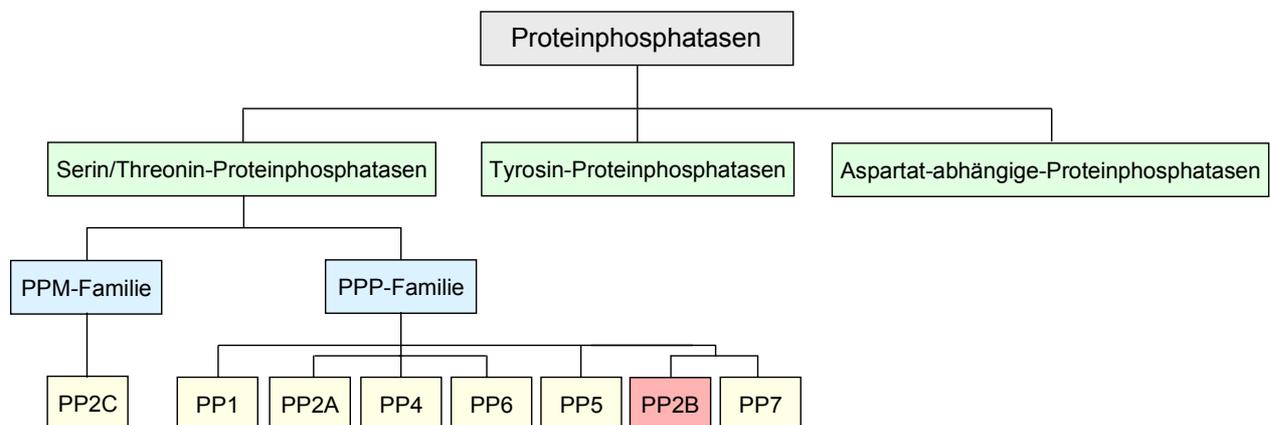


Abb. 1.2: Einteilung der Proteinphosphatasen (Moorhead et al., 2007)

Die Proteinphosphatasen werden in die Serin/Threonin-spezifischen, Tyrosin-spezifischen und Aspartat-abhängige-Proteinphosphatasen unterteilt. Die PP2B (Calcineurin) ist hervorgehoben und ihre Stellung innerhalb der Proteinphosphatasen dargestellt.

Mittlerweile sind 7 Mitglieder der PPP-Familie bekannt. PP2A, PP4 und PP6 sind aufgrund ähnlicher Substrate eng miteinander verwandt, während PP2B und PP7 aufgrund ihrer Ca^{2+} -

Stimulation als Gruppe zusammengefasst werden. PP1 und PP5 haben eine Einzelstellung innerhalb der PPP-Familie.

Die klaren Abgrenzungen der Proteinphosphatase-Gruppen veränderten sich, als herausgefunden wurde, dass einige Serin/Threonin-spezifische Enzyme auch phospho-Tyrosine dephosphorylieren können und dass als dualspezifische Phosphatasen eingestufte Enzyme eigentlich selektiv nur phospho-Tyrosin oder phospho-Serin/Threonin binden (Alonso et al., 2004).

Des Weiteren wurde eine neue Gruppe der Phosphatasen entdeckt, welche Serin/Threonin-Phosphatasen aber auch Serin- oder Tyrosin-Phosphatasen enthält. Sie beinhaltet unter anderem Mitglieder der *Haloacid Dehalogenase* (HAD)-Superfamilie sowie die *small C-terminal domain*-Phosphatase (SCP). Die Phosphatasen dieser Gruppe benötigen im katalytischen Zentrum die Konsensus-Sequenz DxDx(T/V) für die Katalyse. Dabei spielt vor allem der erste Aspartat-Rest als Phosphoryl-Acceptor bei der Dephosphorylierung der Substrate eine wichtige Rolle (Meinhart et al., 2005). Deshalb besteht die neueste Einteilung der Phosphatasen aus Serin/Threonin-, Tyrosin- und Aspartat-abhängigen-Proteinphosphatasen (Abb. 1.2).

1.3 Die Proteinphosphatase Calcineurin

Wang und Desai detektierten 1976 als erste eine zyklische Nukleotidphosphodiesterase-inhibierende Aktivität bei einer chromatographischen Fraktionierung von Hirnproteinen, welche Calmodulin-abhängig war (Wang und Desai, 1976). Klee und Krinks gelang es zwei Jahre später, das dafür verantwortliche Protein rein darzustellen und sahen es als regulatorische Untereinheit der Phosphodiesterase an (Klee und Krinks, 1978). Kurz danach isolierten sie das gleiche Protein aus Rinderhirn, beschrieben dessen Calcium- und Calmodulin-Bindungsvermögen und nannten es daraufhin Calcineurin (CaN) (Klee et al., 1979).

Die Phosphataseaktivität des CaN, welche auch als PP2B bezeichnet wird, identifizierten Stewart et al. 1982 aufgrund der beobachteten Dephosphorylierung der α -Untereinheit der Phosphorylase-Kinase (Stewart et al., 1982).

Bis heute ist CaN die einzige bekannte Serin/Threonin-Proteinphosphatase, welche direkt durch Calmodulin (CaM) und Calcium (Ca^{2+}) reguliert wird.

CaN kommt ausschließlich in Eukaryoten von der Hefe bis zum Menschen vor und ist hochkonserviert. Dort ist es ubiquitär verteilt, weist aber die höchste Konzentration in neuronalen Geweben und dort vor allem im Hippocampus und im Striatum auf (Polli et al., 1991).

1.3.1 Struktur des Calcineurins

Die Serin/Threonin-Proteinphosphatase CaN ist ein heterodimeres Enzym. Es besteht aus einer katalytischen Untereinheit, CaN A, und einer regulatorischen Untereinheit, CaN B (Sharma et al., 1979; Wallace et al., 1979) (Abb. 1.3).

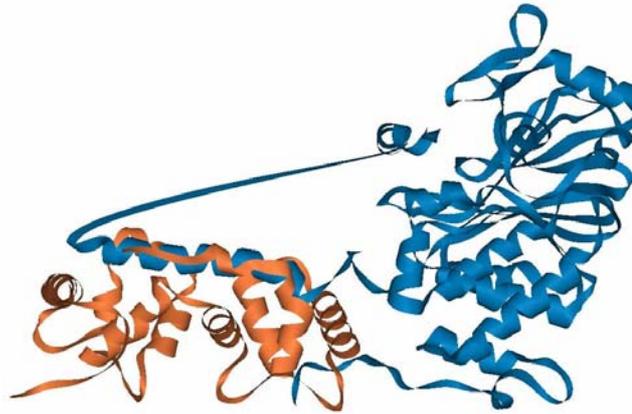


Abb. 1.3: 3D-Struktur des heterodimeren CaN-Komplexes (PDB-Nummer: 1AU1)

Die regulatorische Untereinheit B (orange) bindet nicht-kovalent an die CaN B-Bindungsdomäne der katalytischen Untereinheit A (blau). Von dem CaM-Interaktionsmotiv sind bisher noch keine Strukturinformationen bekannt. An diese Region schließt sich die autoinhibitorische Domäne an, welche das aktive Zentrum bindet und die Zugänglichkeit für Substrate vermindert.

1.3.1.1 Die katalytische Untereinheit des Calcineurins und ihre Isoformen

Die katalytische Untereinheit A weist bei Säugern ein Molekulargewicht von 57-59 kDa auf. Das Protein beinhaltet neben einer *N*-terminalen katalytischen Domäne auch drei regulatorische Domänen beziehungsweise Interaktionsmotive - die CaN B-Bindungsdomäne (Watanabe et al., 1995), das CaM-Interaktionsmotiv (Hubbard und Klee, 1987; Kincaid et al., 1988) sowie eine *C*-terminale autoinhibitorische Domäne (Hashimoto et al., 1990; Hubbard und Klee, 1989) (Abb. 1.5). Watanabe et al. identifizierten die CaN B-Bindungsstelle und lieferten somit wichtige Einblicke in die Wechselwirkungen zwischen beiden Untereinheiten. Sie postulierten, dass es sich bei dieser Bindung um hydrophobe Wechselwirkungen handeln könnte. Außerdem entdeckten sie innerhalb der Aminosäurereste 348-372 vier hydrophobe Reste (Valin 349/Phenylalanin 350 und Phenylalanin 356/Valin 357), welche essentiell für die Interaktion mit der B-Untereinheit sind (Watanabe et al., 1995).

Aufgrund struktureller Ähnlichkeiten mit der CaM-abhängigen Proteinkinase und einer sehr geringen basalen Phosphataseaktivität in Abwesenheit von Ca^{2+} /CaM wurde innerhalb des

CaN gezielt nach einer autoinhibitorischen Domäne gesucht. Durch limitierte Proteolyse wurde eine solche Domäne innerhalb der carboxyterminalen 40-50 Reste des CaN A identifiziert (Hubbard und Klee, 1989). Aufgrund verschiedener analysierter Peptide dieser Region konnten detaillierte Erkenntnisse zur Autoinhibition gewonnen werden. Die Domäne hemmt kompetitiv das katalytische Zentrum indem sie wahrscheinlich als Pseudosubstrat fungiert (Hashimoto et al., 1990; Parsons et al., 1994). Andererseits führt bereits der Austausch eines Aspartatrestes zu Asparagin in Position 477 zu einer bedeutenden Reduktion der Inhibition. Die CaN-Aktivierung durch das Ca^{2+} -Ionophor Ionomycin ist in T-Lymphozyten bei dieser Mutante sehr hoch, so dass dieser Rest eine strukturell wichtige Rolle bei der autoinhibitorischen Funktion spielt (Fruman et al., 1995).

CaN gehört wie die anderen Serin/Threonin-Proteinphosphatasen zu den Metalloenzymen. Im aktiven Zentrum sind die Metallionen Fe^{3+} und Zn^{2+} (Fe-Zn-Cluster) koordinativ an Aspartat- und Histidinreste gebunden (Barford, 1996).

Es sind drei humane Isoformen der katalytischen Untereinheit des CaN bekannt - CaN α , β und γ . Die Aminosäuresequenzen der drei CaN A-Isoformen sind zwischen den verschiedenen Organismen hoch konserviert (Klee et al., 1988). Aber auch die Isoformen untereinander sind zu 70 % identisch (Abb. 1.4). Die größte Variabilität weisen die Isoformen im N- und C-terminalen Bereich sowie in den Regionen zwischen den funktionellen Domänen und Interaktionsmotiven auf.

Im Menschen sind die Gene für die CaN A-Isoformen α , β und γ auf verschiedenen Chromosomen lokalisiert. Das CaN α -Gen (*PPP3CA*) ist auf Chromosom 4, das CaN β -Gen (*PPP3CB*) auf Chromosom 10 und das CaN γ -Gen (*PPP3CC*) auf Chromosom 8 lokalisiert (Gerber et al., 2003; Wang et al., 1996a). Während vom CaN γ bisher nur eine Proteinsequenz bekannt ist, existieren vom CaN α und β mehrere Spliceformen. Neben der ursprünglichen CaN β -Form (CaN β 2) mit 524 Aminosäureresten, welche sowohl im Menschen als auch in Ratte und Maus bekannt ist, gibt es noch mindestens zwei weitere Spliceformen. CaN β 1 wurde bisher nur für den Menschen beschrieben und hat 514 Aminosäuren. Diese Form besitzt eine Insertion von 19 Aminosäuren innerhalb der katalytischen Domäne und einen sehr kurzen C-terminalen Bereich nach der autoinhibitorischen Domäne (Guerini und Klee, 1989). Die dritte Spliceform, das CaN β 3, existiert im Kaninchen und im Menschen und weist im Vergleich zu CaN β 2 eine Deletion von 30 Basenpaaren zwischen dem CaM-Bindungsmotiv und der autoinhibitorischen Domäne auf (McPartlin et al., 1991). Ebenfalls eine 30 Basenpaar-Deletion an der gleichen Stelle unterscheiden die beiden CaN α -Spliceformen. CaN α 1 wurde bisher in Maus, Ratte, Mensch und Kaninchen entdeckt, während die kürzere Variante, CaN α 2, bisher nur in Maus und Mensch beschrieben worden ist (Kincaid et al., 1990). Unterschiedliche Funktionen der einzelnen Spliceformen wurden bisher noch nicht untersucht.

Die strukturellen Besonderheiten der drei Isoformen der katalytischen Untereinheit des CaN A sind in Abb. 1.5 schematisch dargestellt. Demnach ist CaN A γ das kürzeste Enzym. Weiterhin auffällig ist die verhältnismäßig lange N-terminale Erweiterung des CaN A β . Sie verfügt über ein Motiv aus 11 aufeinander folgenden Prolinen. Die Funktion des Polyprolin-Motives innerhalb des CaN A β ist bisher noch nicht untersucht worden.

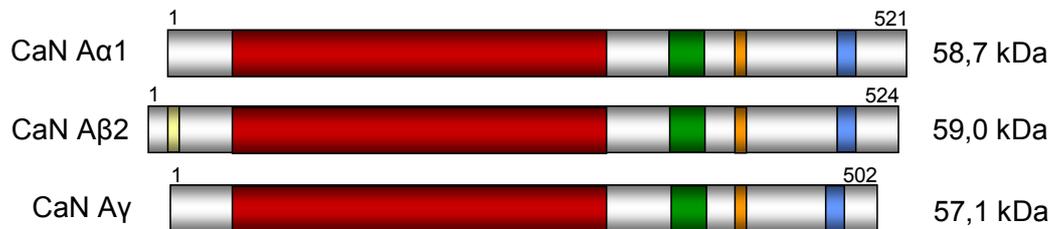


Abb. 1.5: Schematische Darstellung der Struktur der humanen CaN A-Isoformen mit allen funktionellen Domänen, Interaktionsmotiven sowie den variablen Regionen

■ variable Regionen ■ katalytische Domäne ■ CaN B-Bindungsdomäne ■ CaM-Interaktionsmotiv
 ■ autoinhibitorische Domäne ■ Polyprolin-Motiv

Polyproline stellen ein Motiv in vielen globulären Proteinen dar und bilden das sekundäre Strukturelement der Polyprolin Helix II (PPII) aus (Cubellis et al., 2005). Die PPII ist aus zahlreichen anderen Proteinen bekannt und spielt eine Rolle bei der Signaltransduktion, Transkription, Zellmigration, der humanen Immunantwort, der Bildung von amyloiden Filamenten sowie als DNA-Bindungsmotiv (Cohen et al., 1995; Hicks und Hsu, 2004; Pawson, 1995; Ren et al., 1993). Weiterhin sind prolinreiche Sequenzen Erkennungsstellen für Protein-Protein-Interaktionen, wie zum Beispiel für Proteine mit *Src homology 3* (SH3)- und WW-Domänen (Kay et al., 2000).

1.3.1.2 Die regulatorische Untereinheit des Calcineurins und ihre Isoformen

Die 19 kDa große regulatorische Untereinheit B des CaN ist ebenfalls hoch konserviert (Rusnak und Mertz, 2000). In Säugern sind zwei Isoformen bekannt, welche unterschiedliche Komplexe mit der katalytischen Untereinheit bilden (Abb. 1.6). In Ratten und Mäusen konnte gezeigt werden, dass CaN B Isoform 1 mit der α - oder β -Isoform des CaN A assoziiert ist, während CaN B Isoform 2 nur an die γ -Isoform bindet (Ueki et al., 1992).

Klee et al. wiesen 1979 als erste nach, dass CaN B in der Lage ist, Ca^{2+} zu binden (Klee et al., 1979). Fünf Jahre später klärte die gleiche Arbeitsgruppe die gesamte Struktur der regulatorischen Untereinheit auf (Abb. 1.7). Humanes CaN B mit seinen 170 Aminosäuren

hat zwei Ca^{2+} -bindende Domänen des EF-Hand-Typs (Aitken et al., 1984) und ist damit dem Helix-Loop-Helix-Motiv des CaM sehr ähnlich. Im Gegensatz zu CaM gibt es für die B-Untereinheit allerdings Hinweise auf die Existenz einer hoch-affinen ($K_d \approx 2,4 \times 10^{-8} \text{ M}$) und drei schwach-affiner ($K_d \approx 1,5 \times 10^{-5} \text{ M}$) Calciumbindestellen *in vitro*. Es wird jedoch vermutet, dass *in vivo* die Affinität für Ca^{2+} -Ionen auch durch die Interaktion mit CaN A beeinflusst wird (Kakalis et al., 1995). CaN B ist in der Lage mit einem $K_d < 10^{-13} \text{ M}$ in An- und Abwesenheit von Ca^{2+} -Ionen an die katalytische Untereinheit zu binden (Aramburu et al., 2000; Perrino et al., 1995).

CaN B1	GNEASYPLEMCSHFDADEIKRLGKRFKKLDDNSGSLSVVEEFMSLPELQQNPLVQRVID	59
CaN B2	GNEASYPAEMCSHFDNDEIKRLGRRFKKLDDKSGSLSVVEEFMSLPELRHNPLVRRVID	59
	***** ***** *****:*****:*****:*****:*****:*****	
CaN B1	IFDTDGNGEVDFKEFIEGVSQFSVKGDEEQKLRFAFRIYDMDKDGYSNGELFQVLKMM	118
CaN B2	VFDTDGDGEVDFKEFILGTSQFSVKGDEEQKLRFAFSIYDMDKDGYSNGELFQVLKMM	118
	:*****:***** * .*****:***** ***** *****	
CaN B1	VGNNLKDTQLQQIVDKTIIINADKDGDRISFEEFCAVVGGLDIHKKMVVDV	169
CaN B2	VGNNLTDWQLQQLVDKTIIILDKDGDGKISFEEFSAVVRDLEIHKKLVLIIV	169
	***** * *****:***** *****:***** .*** .*:*****:*. *	

Abb. 1.6: Aminosäure-Sequenzalignment der 2 humanen CaN B-Isoformen

Die zwei Aminosäure-Sequenzen sind zu 85 % identisch (rot). Insgesamt 89 % der Sequenzen sind positiv, das heißt, dass 4 % durch biochemisch ähnliche Aminosäuren ausgetauscht sind.

Eine weitere Besonderheit des CaN B ist die Myristylierung des aminoterminalen Glycins (Aitken et al., 1982). Diese Modifizierung von Proteinen bewirkt häufig eine Membranassoziation oder die Vermittlung von Protein-Protein-Interaktionen. Jedoch wird nach heutigem Kenntnisstand die *N*-Myristylierung von CaN B weder als Membrananker noch für die Bindung an CaN A benötigt (Zhu et al., 1995). Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass die Myristylierung der regulatorischen Untereinheit auch keinen Einfluss auf die biologische Aktivität des CaN besitzt. Durch Kennedy et al. wurde jedoch gezeigt, dass die nicht-myristylierte Form eine geringere thermische Stabilität aufweist (Kennedy et al., 1996).

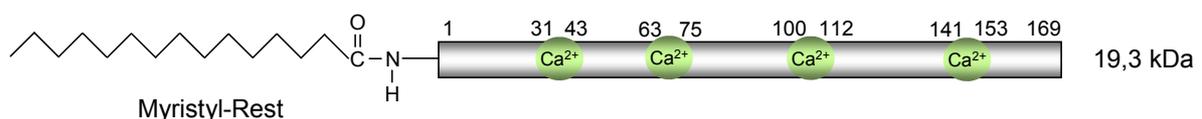


Abb. 1.7: Struktur des humanen CaN B1

In der Abbildung sind die Positionen der EF-Hand Calcium-Bindestellen dargestellt. Der Aminoterminus von CaN B wird myristyliert.

Mittels *in vitro* Tests konnte außerdem ein Cluster aus basischen Aminosäureresten im CaN B gefunden werden, welches in der Lage ist, negativ geladene Phosphatidylserin-Vesikel zu

binden (Martin et al., 2001). Bis heute ist jedoch unbekannt, ob der Myristylrest, welcher im CaN B von der Hefe bis zum Menschen konserviert ist, lediglich zu höherer Stabilität des Proteins führt, auch *in vivo* an Membranen binden kann, oder ob der Fettrest noch andere Funktionen besitzt.

1.3.2 Regulation der Calcineurin-Aktivität

Die CaN-Aktivität wird in erster Linie über Veränderungen der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration reguliert. In einer ruhenden Zelle ist der Calciumgehalt mit 100 nM niedrig und das CaN liegt damit weitgehend inaktiv vor. Aber zum Beispiel durch Membran-Depolarisation, mechanische Deformierung oder hormonelle Aktivierung der Zelle kann es aufgrund der Öffnung von Calciumkanälen in der Plasmamembran, im endoplasmatischen Retikulum (ER) und im sarkoplasmatischen Retikulum (SR) zum Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration im Cytosol auf 1 μM kommen (Bootman et al., 2001). CaM und CaN B binden nun jeweils vier Calciumionen und sind dadurch in der Lage, mit der katalytischen Untereinheit Wechselwirkungen einzugehen. Die Bindung von Ca^{2+} an beide Proteine wird benötigt, um die autoinhibitorische Domäne vollständig aber reversibel vom aktiven Zentrum zu verdrängen (Perrino et al., 1995).

CaN A hat ohne Bindungspartner selbst eine sehr geringe Proteinphosphatase-Aktivität. Nach der Bindung der B-Untereinheit und des CaM ($K_d < 10^{-9}$ M) wird die katalytische Aktivität des Enzyms um das 50-fache erhöht (Perrino et al., 1992). Der *knock-out* des CaN B in mesenchymalen Zellen führt zu komplettem Aktivitätsverlust des CaN. Diese Zellen weisen drastische Veränderungen im Zellzyklus auf und besitzen dadurch nicht mehr die Fähigkeit, sich zu teilen (Chang et al., 2004).

Der Effekt von CaM auf die katalytische Aktivität des Enzyms beläuft sich auf eine Erhöhung des V_{\max} -Wertes, während CaN B vor allem den K_m -Wert verringert und nur in geringer Weise V_{\max} beeinflusst.

Es gibt Hinweise, dass die CaN-Aktivität auch durch Oxidantien, wie Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und Superoxidanionen (O_2^-), beeinflusst werden kann. Die Behandlung von Zellen mit mikromolaren Konzentrationen an H_2O_2 führte zur Inhibition von NFAT- (nuklearer Faktor aktivierter T-Zellen) und NF κ B- (nuklearer Faktor κ B) Signalwegen und scheint durch CaN vermittelt zu werden (Reiter et al., 1999). Wang et al. konnten zeigen, dass die Superoxiddismutase CaN vor der Inaktivierung schützt. Wahrscheinlich wird durch das Enzym einer Oxidation der Metallkofaktoren im aktiven Zentrum und damit einer Inaktivierung des CaN vorgebeugt (Wang et al., 1996b). Diese Ergebnisse implizieren, dass das Fe-Zn-Cluster möglicherweise als Redox-Sensor in der Zelle fungieren kann.

1.3.3 Physiologische Funktionen der Calcineurin-Isoformen

Aufgrund der ubiquitären Verteilung von CaN im Organismus besitzt das Enzym eine entscheidende Rolle in vielen zellulären Prozessen, wie zum Beispiel in der Immunantwort und der Differenzierung von Muskelgewebe und Neuronen (Shibasaki et al., 2002). Die Funktionen des CaN werden durch die Interaktion mit einer Vielzahl zellulärer Proteine vermittelt (Tab. 1.1).

Der Primärstruktur-Vergleich der CaN-Interaktionspartner weist darauf hin, dass die Interaktion nicht durch eine spezifische CaN-Bindungssequenz vermittelt wird, sondern durch die Sekundär- und Tertiärstruktur der Bindeproteine determiniert ist (Shibasaki et al., 2002). Die drei CaN A-Isoformen könnten die vielfältigen Funktionen von CaN in zahlreichen Geweben präzisieren. Bisher gibt es allerdings nur einige Belege für Isoform-spezifische Funktionen.

Tab. 1.1: Übersicht wichtiger CaN-Substrate und Interaktionspartner

CaN-Substrat bzw. Interaktionspartner	Bedeutung	Referenz
BAD	Beteiligung an Apoptose	(Wang et al., 1999)
Bcl-2	Beteiligung an Apoptose	(Shibasaki et al., 1997)
DARPP-32	Inhibition der PP1 im Hirn	(King und Huang, 1984)
Dynamin	GTPase-Aktivität	(Herskovits et al., 1993)
Elk-1	Transkriptionsfaktor	(Sugimoto et al., 1997)
Hsp25	Hitzeschockprotein	(Gaestel et al., 1992)
NFAT1-4	Transkriptionsfaktoren	(Jain et al., 1993) (Shibasaki et al., 1996)
NMDA-Rezeptor	postsynaptischer Rezeptor gekoppelt mit Ca ²⁺ -Kanälen	(Lieberman und Mody, 1994)
neuronale NO-Synthase	Generierung von Stickstoffmonoxid	(Dawson et al., 1993)
Phosphorylase Kinase	Glykogenstoffwechsel	(Stewart et al., 1982)
RII-Untereinheit der cAMP-abhängigen Proteinkinase	Regulation der PKA-Aktivität	(Blumenthal et al., 1986)
Tau	Mikrotubuli-assoziiertes Protein	(Goto et al., 1985)

CaN α und β sind in fast allen Geweben weit verbreitet, jedoch ließen sich über Isoform-spezifische Antikörper und durch *knock-out*-Experimente an Mäusen Unterschiede in der Lokalisierung feststellen. So konnte nachgewiesen werden, dass CaN α weitaus häufiger im Hirn und CaN β vermehrt in der Milz, im Thymus und in Lymphozyten vorkommt (Jiang et al., 1997). Mäuse, denen sowohl CaN α als auch CaN β fehlen, sterben noch vor der Geburt im Uterus. Das beweist, dass unter bestimmten Umständen eine Kompensation zwischen den Isoformen auftreten kann (Gooch et al., 2004b). Ohne CaN α sind die Mäuse kleiner, unfruchtbar und nur für wenige Wochen lebensfähig. Im Gegensatz zu dazu sind die CaN β -defizienten Mäuse allerdings lebensfähig und fruchtbar (Bueno et al., 2002b).

1.3.3.1 Calcineurin im Immunsystem

Keine Funktion innerhalb der CaN-Forschung ist bisher besser untersucht und verstanden als die CaN-vermittelte Regulation der Transkription des T-Zell-Wachstumsfaktors Interleukin-2 (IL-2) (Schreiber und Crabtree, 1992). Experimente, bei denen CaN in Mäusen inhibiert, deletiert oder überexprimiert wurde, gaben Aufschluss über die Rolle des CaN im Immunsystem.

Ein Durchbruch bei der Erforschung der Funktionen war die Entdeckung des T-Zell-Transkriptionsfaktors NFAT als direktes CaN-Substrat (Jain et al., 1993).

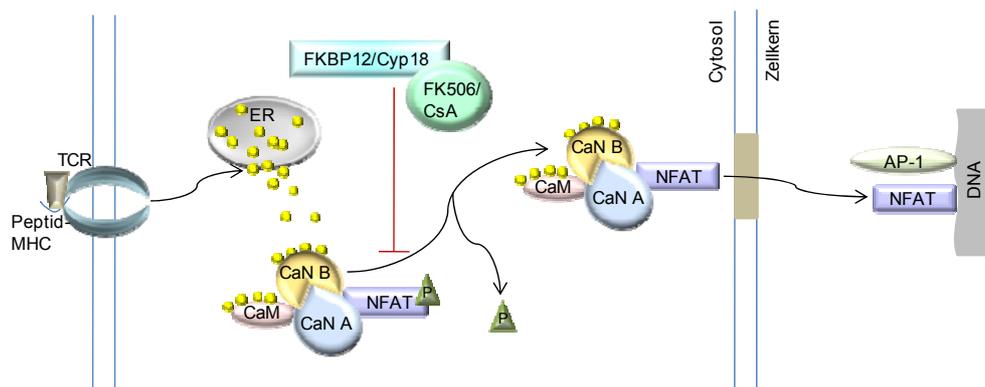


Abb. 1.8: Der CaN/NFAT-Signalweg in T-Lymphozyten (nach Rao, 1997)

In T-Lymphozyten erfolgt die NFAT-Aktivierung über die Bindung eines Peptid/MHC- (*major histocompatibility complex*) Komplexes an den T-Zellrezeptor (TCR). Dadurch wird die intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration erhöht, wodurch CaN aktiviert wird. CaN dephosphoryliert NFAT, welches in den Zellkern transloziert und dort zusammen mit AP-1 als Transkriptionsfaktor fungiert.

In ruhenden T-Zellen liegt NFAT in der phosphorylierten Form überwiegend im Cytosol vor (Ruff und Leach, 1995). Der Kontakt des T-Zell-Rezeptors mit einem Antigen/MHC-Komplex führt zur Öffnung der Calciumspeicher, die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration steigt und NFAT wird vom Ca^{2+} /CaM-aktivierten CaN dephosphoryliert (Bootman et al., 2001; Rao et al., 1997). Aufgrund des nun zugänglichen Kernimport-Signals (NLS) wird NFAT im Komplex mit CaN in den Zellkern transportiert (Scott et al., 1997), bindet an spezifische Sequenzen innerhalb der Promotorregion verschiedener Zielgene und aktiviert damit unter anderem die Transkription von IL-2 (Jain et al., 1995), aber auch IL-3 (Tocci et al., 1989), IL-4 (Casolaro et al., 1996), GM-CSF (Granulozyten/Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor) (Tsuboi et al., 1994), Fas-Ligand (Brunner et al., 1996), NF κ B (McCaffrey et al., 1994) und TNF- α (Tumornekrosefaktor- α) (Goldfeld et al., 1994). Die Induktion dieser Gene erfolgt synergistisch durch die Bindung des NFAT an den AP-1-Komplex (Aktivierendes Protein-1) (Castigli et al., 1993) (Abb. 1.8).

Fällt der intrazelluläre Calciumspiegel unter 150 nM, wird NFAT rephosphoryliert und innerhalb von 12 min zurück in das Cytosol transportiert (Shibasaki et al., 1996). Dieser Prozess erfolgt aktiv nach Phosphorylierung unter Einbeziehung eines Kernexport-Signals (NES). Bei den NFAT-Kinasen handelt es sich wahrscheinlich um die Proteinkinase A (PKA), die c-jun-N-terminale Kinase 1 (JNK1) (Chow et al., 1997), die Glykogen-Synthase-Kinase-3 (GSK-3) (Beals et al., 1997) und p38 (Gomez del Arco et al., 2000).

Die Proteine der NFAT-Familie sind im Körper ubiquitär verteilt, so dass der Ca^{2+} /CaN/NFAT-Signalweg nicht nur auf das Immunsystem beschränkt ist. Er kontrolliert unter anderem die Myogenese, Wachstum und Funktion der β -Zellen des Pankreas, die perinatale Lungen-Reifung und -Funktion sowie die Entwicklung des kardiovaskulären Systems (Bueno et al., 2002b; Dave et al., 2006; Heit et al., 2006). Aufgrund ihrer zahlreichen Zielgene sowie der vielen zellulären Prozesse, die sie kontrollieren, spielen die NFAT-Proteine auch eine Rolle bei der Entstehung von bestimmten Krebsarten und anderen Erkrankungen (Buchholz und Ellenrieder, 2007). So ist das CaN-regulierte NFATc2 im Herzen für Hypertrophie und Herzinsuffizienz verantwortlich und der CaN/NFAT-Signalweg wurde als pro-oncogen beschrieben (Bourajjaj et al., 2008; Medyouf und Ghysdael, 2008).

In T-Zellen ist die β -Isoform von CaN A dominierend. Durch Deletion des CaN A β -Gens in Mäusen wird die Anzahl der CD3⁺, CD4⁺ und CD8⁺-Zellen aufgrund von Defekten in der T-Zell-Proliferation verringert. Zusätzlich sterben die bereits vorhandenen einfach positiven Zellen durch Apoptose (Manicassamy et al., 2008). CaN A α -defiziente Mäuse produzieren normale reife T- und B-Zellen, weisen aber in der T-Zellantwort Defekte auf. Die proliferierenden T-Zellen produzieren normale Mengen an IL-2 und IL-4. Ebenso kann die Proliferation und Cytokin-Produktion durch Cyclosporin A und FK506 inhibiert werden. Diese

Tatsache beweist, dass CaN A β den Verlust der α -Isoform kompensiert, beziehungsweise allein für diese Vorgänge verantwortlich ist (Feske et al., 2003).

Neuere Studien zeigen, dass täglich injiziertes CaN B in Mäusen signifikant das Immunsystem stimuliert und damit auch einen anti-Krebs-Effekt aufweist (Jin et al., 2005). Andererseits führt die Überexpression von CaN B zur erhöhten Proliferation der Krebszelllinie HEK 293 (Wang et al., 2008b). Mäuse ohne CaN B sind nicht lebensfähig und sterben noch im Uterus (Graef et al., 2001). Deletion des *CaN B1* spezifisch in Thymocyten zeigt, dass die regulatorische Untereinheit des CaN an der positiven Selektion während der Entwicklung der Thymocyten von entscheidender Bedeutung ist (Neilson et al., 2004).

1.3.3.2 Calcineurin in Muskelzellen

Die Funktionen der Skelettmuskel- und Herzmuskel-Zellen werden durch die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration reguliert. Deshalb ist es nicht überraschend, dass CaN als Ca^{2+} /CaM-abhängige Serin/Threonin-Proteinphosphatase auch an physiologischen und pathologischen Prozessen dieser Gewebe beteiligt ist.

CaN und NFAT sind unter anderem verantwortlich für die normale Entwicklung des Herzens, können aber unter bestimmten Bedingungen auch an der Entstehung einer kardialen Hypertrophie beteiligt sein (Lim und Molkentin, 1999). Die Deletion des NFAT-Gens im kardiovaskulären System von Mäusen beeinträchtigt die Ausbildung der Herzklappen und des Septums, wodurch die Embryonen noch im Uterus sterben (de la Pompa et al., 1998; Ranger et al., 1998). Außerdem wurde gezeigt, dass eine Überexpression von CaN sowohl in den Herzmuskelzellen als auch in den Skelettmuskeln eine Hypertrophie induziert, welche aber durch die immunsuppressiven Medikamente Cyclosporin A und FK506 blockiert werden kann (Dunn et al., 1999; Molkentin et al., 1998).

Im Herzen spielt CaN A β eine große Rolle. Bei der Untersuchung von CaN A β *knock-out*-Mäusen konnte gezeigt werden, dass die CaN-Aktivität im Herzen um 80 % vermindert ist, die Herzgröße verringert ist und eine kardiale Hypertrophie auftritt (Bueno et al., 2002a).

Sowohl CaN A α als auch CaN A β sind für das Umwandeln der Muskelfasertypen in Skelettmuskelzellen verantwortlich (Parsons et al., 2003). In glatten Muskelzellen der Lungenarterie von Kaninchen wurde eine wichtige Rolle von CaN A α bei der Regulation Ca^{2+} -abhängiger Chlorid-Kanäle beschrieben (Greenwood et al., 2004). Des Weiteren führt die Deletion des CaN A α -Gens zu Osteoporose bei Mäusen sowie zur Reduktion des Knochenaufbaus (Sun et al., 2007). Untersuchungen mit Mäusen, denen CaN B in den

Osteoblasten fehlt, zeigten, dass diese Mäuse eine erhöhte Knochenmasse besitzen, da die Osteoblasten-Differenzierung gesteigert ist (Yeo et al., 2007).

Neben NFAT werden auch weitere Transkriptionsfaktoren durch CaN beeinflusst, wie zum Beispiel Elk-1, welcher allerdings durch CaN negativ reguliert wird und somit nach Dephosphorylierung am Serin 383 die Expression seiner Zielgene, wie viele Wachstumsfaktor-induzierte Gene, nicht mehr einleitet (Sugimoto et al., 1997).

1.3.3.3 Calcineurin im Nervensystem

Die CaN-Konzentration in neuronalem Gewebe ist 10-20 mal größer als in anderen Organen (Klee et al., 1988). Deshalb ist es von besonderem Interesse, die Funktionen dieser Phosphatase im Hirn zu untersuchen. CaN ist involviert in die Ausbildung des Langzeitgedächtnisses (Mansuy et al., 1998), die Freisetzung von Neurotransmittern (Nichols et al., 1994) und die Axonentwicklung (Lautermilch und Spitzer, 2000). Es wird aber auch mit neurologischen Krankheitsbildern wie Morbus Parkinson (Wera und Neyts, 1994), Morbus Alzheimer (Lian et al., 2001), Schizophrenie (Gerber et al., 2003) oder für die Folgeerscheinungen von Schlaganfällen (Mittal und Jadhav, 1994) verantwortlich gemacht.

Die Formierung des Langzeitgedächtnisses setzt eine veränderte Genexpression in Zellkernen sowie Neusynthesen von Proteinen voraus (Davis und Squire, 1984). Der Transkriptionsfaktor *cAMP response element binding protein* (CREB) und das Dopamin- und cAMP-regulierte Phosphoprotein-32 (DARPP-32) agieren synergetisch, um das Langzeitgedächtnis auszubilden (Hotte et al., 2007). Erst aufgrund der Phosphorylierung durch die PKA transloziert CREB in den Zellkern, interagiert mit dem *cAMP response Element* (CRE) verschiedener Gene und erhöht somit deren Expressionsniveau. Die Dephosphorylierung des CREB erfolgt durch die PP1 (Alberts et al., 1994). CaN greift indirekt in die Regulation von CREB ein, indem die Phosphatase den Inhibitor-1 durch Dephosphorylierung inaktiviert, wodurch die nun aktive PP1 mit der Dephosphorylierung von CREB dessen Kernimport verhindert (Miyata et al., 2001).

Dopamin stimuliert die Erhöhung des cAMP-Spiegels in den Zellen, was zur Phosphorylierung des DARPP-32 am Threonin 34-Rest durch die PKA führt. Das aktivierte DARPP-32 agiert in diesem Zustand als potenter PP1 Inhibitor (Hemmings et al., 1984). Dieser Zustand erhöht somit indirekt die CREB-Phosphorylierung.

Im Gegensatz zum Dopamin bewirkt Glutamat einen Calcium Einstrom und damit die Aktivierung von CaN, welches das DARPP-32 durch die Dephosphorylierung des Threonin 34 inaktiviert.

Im Hippocampus von Ratten konnte CaN während des Alterns in erhöhter Konzentration gefunden werden (Foster et al., 2001). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass reversibel inhibiertes CaN in Mäusen die Lern- und Gedächtniskapazität erhöht (Malleret et al., 2001). Im Zusammenhang mit neueren Erkenntnissen, wonach physiologisch inhibiertes CaN mit der gesteigerten Expression des Transkriptionsfaktors Zif268 die emotionale Gedächtnisbildung fördert (Baumgartel et al., 2008), könnten diese Studien beweisen, dass ein zunehmender CaN-Gehalt im Gehirn mit Gedächtnisdefiziten korreliert.

Auch das Mikrotubuli-assoziierte Protein Tau im Hirn ist ein CaN-Substrat (Goto et al., 1985). Im „normal“ phosphorylierten Zustand stabilisiert Tau das Cytoskelett in Neuronen sowie die Axonentwicklung (Lautermilch und Spitzer, 2000). Hyperphosphoryliertes Tau hat im Gegensatz dazu eine geringe Affinität zu den Mikrotubuli und aggregiert im Hirn, ein Fakt der für die Ausbildung der Alzheimer Krankheit verantwortlich gemacht wird. Im Hirn von Alzheimer Patienten wurde, im Vergleich zu gleichaltrigen gesunden Personen, eine bedeutend geringere CaN-Aktivität nachgewiesen (Lian et al., 2001).

Während CaN α und β innerhalb des Säugerorganismus ubiquitär verbreitet sind, wurde lange geglaubt, dass die γ -Isoform im Mensch nur in den Hoden zu finden ist und dort wahrscheinlich eine Rolle bei der Signaltransduktion der Spermatogenese spielt (Muramatsu und Kincaid, 1992). Neuere Forschungsergebnisse belegen jedoch, dass die mRNA von CaN γ unter anderem auch in vielen Hirnregionen vorhanden ist. Dort ist es wahrscheinlich an der Entstehung der Krankheitsbilder der Schizophrenie und der manischen Depression involviert. Das PPP3CC-Gen ist auf Chromosom 8 lokalisiert und damit innerhalb einer Region mit Kandidatengen, welche für die Entstehung der Schizophrenie verantwortlich gemacht werden (Gerber et al., 2003; Mathieu et al., 2008). Weiterhin konnte eine verringerte Expression von CaN γ und den anderen CaN-Isoformen bei Schizophrenie-Patienten festgestellt werden (Eastwood et al., 2005).

CaN α *knock-out*-Mäuse weisen beträchtliche Veränderungen im Hirn auf. Sie entwickeln Hirnverletzungen, häufen außerdem hyperphosphoryliertes Tau-Protein im Gehirn an, zeigen Gedächtnisschwächen sowie Veränderungen im Hippocampus hinsichtlich des Cytoskeletts und verhindern die Ausbildung der synaptischen Plastizität (Kayyali et al., 1997; Zhang et al., 1996; Zhuo et al., 1999)

1.3.3.4 Calcineurin in der Niere

Erst die beträchtlichen Nebenwirkungen der Immunsuppressiva FK506 und Cyclosporin A (CsA) (siehe 1.3.5) beim Menschen nach Organtransplantationen, wie zum Beispiel Bluthochdruck und Niereninsuffizienz gaben Hinweise, dass CaN auch bei der Funktion der

Nieren eine entscheidende Rolle spielt. Bis heute sind jedoch die spezifischen zellulären Aufgaben von CaN in der Niere weitgehend unbekannt.

Es gibt aber Studien, welche belegen, dass die terminale Differenzierung der Nieren durch ein spezifisches genetisches Programm kontrolliert wird, welches die initiale Aktivität von CaN voraussetzt. Dafür wurde schwangeren Kaninchen zu verschiedenen Zeitperioden CsA injiziert, was zu signifikanten Veränderungen der Nieren der Jungtiere führte. Die Neugeborenen wiesen eine reduzierte Anzahl von Nephronen auf sowie Veränderungen in der postnatalen Reifung der Nieren (Tendron et al., 2003). Hierbei spielt wahrscheinlich vor allem CaN α eine entscheidende Rolle. CaN α -defiziente Mäuse sind in ihrer Nierenfunktion beeinträchtigt, die Nieren entwickeln sich nicht vollständig und die Creatinin-Werte sind erhöht (Gooch et al., 2004b).

Auch andere CaN *knock-out*-Experimente an Mäusen zeigten Veränderungen des Zellzyklus während der Nierenreifung, Anomalien des Nierenkortex, eine reduzierte Anzahl funktionsfähiger Nephrone und insgesamt kleinere Nieren (Gooch et al., 2004b). Innerhalb dieser Studie wurde außerdem festgestellt, dass ohne CaN der Inhibitor der Cyclin-abhängigen Kinase p27 überexprimiert wird. Vermutlich ist deshalb CaN ein Regulator des p27, dessen Expressionszeitpunkt sehr wichtig für die Wachstumsregulation der Nieren über die Zellzykluskontrolle ist.

Des Weiteren spielt CaN eine große Rolle bei Diabetes. Während des Krankheitsverlaufes konnten alle drei CaN A-Isoformen in der Niere in erhöhten Konzentrationen gefunden werden, allerdings in teilweise unterschiedlichen Geweben. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Isoformen in der Niere während einer Diabetes wahrscheinlich verschiedenartig reguliert werden (Gooch et al., 2004a). Zusammen mit der gesteigerten Expression des *transforming growth factor β* (TGF β) und des *insulin growth factor - I* (IGF-I) führt die erhöhte CaN-Aktivität zu Hypertrophie und der Anhäufung von extrazellulärer Matrix in den Glomeruli (Gooch et al., 2003). Außerdem konnte die Expression von CaN γ in der Niere belegt werden, jedoch noch keine Verbindung zu einer spezifischen Funktion dieser Isoform hergeleitet werden (Gooch et al., 2004a).

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass CaN B spezifisch und Ca^{2+} -abhängig an bovines α -Tubulin aus Hirnextrakten sowie an das bovine Hitzeschock-Protein 60 (Hsp60) aus Nierenextrakten bindet.

Zusätzlich zu seiner Interaktion mit CaN A spielt CaN B demnach wahrscheinlich ebenfalls eine regulatorische Rolle in anderen Ca^{2+} -abhängigen Prozessen (Li und Handschumacher, 2002).

1.3.4 Die Inhibition des Calcineurins

Eine Vielzahl natürlicher und synthetischer Inhibitoren des CaN und anderer Serin/Threonin-spezifischer Proteinphosphatasen wurden aufgrund von Substanz-Screenings isoliert (siehe Tab. 1.2 und 1.3). Aus medizinischer Sicht sind alle physiologischen CaN-Inhibitoren weniger interessant, da sie unter anderem proteolytisch instabil sind und die Zellmembran nicht passieren können. Im Organismus regulieren sie allerdings die Funktion des CaN und damit viele Ca^{2+} -abhängige Signalwege, wie zum Beispiel die T-Zellaktivierung. Trotz der guten Selbstregulation des CaN über die autoinhibitorische Domäne wurde bereits eine Vielzahl zellulärer CaN-Bindeproteine entdeckt, von denen die meisten die Phosphatase-Aktivität inhibieren können (Liu, 2003) (Tab. 1.2).

Tab. 1.2: Übersicht einiger physiologischer CaN-Inhibitoren

physiologische Inhibitoren	K_i oder IC_{50}	Referenz
DSCR1	70 nM	(Kingsbury und Cunningham, 2000)
DSCR2	nicht untersucht	(Rothermel et al., 2000)
DSCR3	nicht untersucht	(Miyazaki et al., 1996)
Cabin1/Cain	440 nM	(Lai et al., 1998)
CaN Homologous Protein (CHP)	3 μM	(Lin und Barber, 1996)
A-Kinase anchoring protein (AKAP79)	4,2 μM	(Coghlan et al., 1995)
autoinhibitorische Domäne des CaN A	10 μM	(Hashimoto et al., 1990)

Auf der Suche nach CaN-Inhibitoren wurden zahlreiche exogene beziehungsweise synthetische Substanzen entdeckt. Dabei sind Inhibitoren, die neben CaN auch andere Serin/Threonin-Proteinphosphatasen blockieren, therapeutisch nicht von Relevanz. So hemmen Okadasäure, Endothall und Microcystin LR die PP2A und PP1 deutlich effizienter als das CaN (Bialojan und Takai, 1988; Enz et al., 1997; MacKintosh et al., 1990).

Jedoch konnten auch PP2B-Inhibitoren entdeckt werden, welche andere Proteinphosphatasen in den getesteten Konzentrationen nicht beeinflussen. Das betrifft das PD 144795 (Gualberto et al., 1998), das Kaempferol (Wang et al., 2008a) und das in unserer Arbeitsgruppe charakterisierte Gossypol (Baumgrass et al., 2001).

Tab. 1.3: Übersicht der exogenen bzw. synthetischen CaN-Inhibitoren

unphysiologische Inhibitoren	Spezifität für CaN	Vorkommen	K _i oder IC ₅₀	Referenz
FKBP/FK506	Ja	Komplexe aus endogenem Protein / Makrolidverbindung aus Pilz	50 nM	(Liu et al., 1991)
Cyp/CsA	Ja	Komplexe aus endogenem Protein / zyklischem Undekapeptid aus Pilz	100 nM	(Liu et al., 1991)
Microcystin LR	Nein	Cyanobakterien	200 nM	(MacKintosh et al., 1990)
A238L	nicht untersucht	afrikanisches Schweinefieber-Virus	500 nM	(Miskin et al., 1998)
Endothall	Nein	Derivat von Cantharidin	500 nM	(Enz et al., 1997)
[Dat-Sar³] CsA	Ja	synthetisches Derivat von CsA	1 µM	(Baumgrass et al., 2004)
Okadasäure	Nein	mariner Schwamm	4 µM	(Bialojan und Takai, 1988)
PD 144795	nicht untersucht	Bezothiophen-Derivate	4 µM	(Gualberto et al., 1998)
Gossypol	Ja	polyphenolisches Aldehyd aus Baumwollsamensamen	15 µM	(Baumgrass et al., 2001)
Dibefurin	nicht untersucht	Pilz	46 µM	(Brill et al., 1996)
Kaempferol	Ja	natürliches Flavonoid	54 µM	(Wang et al., 2008a)

1.3.4.1 PPlasen und ihre Rolle in der Immunsuppression

Die CaN-Aktivität wird *in vivo* durch die immunsuppressiven Medikamente CsA und FK506 spezifisch inhibiert. Diese Inhibitoren wirken allerdings erst im Komplex mit ihren jeweiligen cytoplasmatischen Bindeproteinen. Die Cyclophiline (Cyp) binden ausschließlich an das zyklische Undekapeptid CsA, während die FK506-bindenden Proteine (FKBP) Komplexe mit dem Makrolid FK506 bilden (Harding et al., 1989; Liu et al., 1991; Takahashi et al., 1989). Die Cyp und FKBP, auch als Immunophiline bezeichnet, gehören neben den Parvulinen und dem Triggerfaktor zu den Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerasen (PPlasen, EC 5.2.1.8). Sie sind im Organismenreich ubiquitär verbreitete Enzyme, welche die *cis-trans* Isomerisierung der Peptidbindung N-terminal zu einem Prolinrest katalysieren (Fischer et al., 1984) (Abb. 1.9). Die Aktivität der PPlasen kann durch die Immunsuppressiva FK506 oder CsA inhibiert

werden, ein Fakt der allerdings keine Rolle bei der Bindung an CaN spielt (Zydowsky et al., 1992).

Bisher sind jeweils 16 humane FKBP und Cyp sowie zwei humane Mitglieder der Parvuline beschrieben (Fischer und Aumuller, 2003). Die zellulären Funktionen konnten bisher nur für einige Vertreter aufgeklärt werden, da viele *knock-out*-Experimente mit PPlasen meist keine phänotypischen Veränderungen zeigten. Der prototypische Vertreter der FKBP, das FKBP12, ist ein cytosolisches Protein bestehend aus einer PPIase Domäne. FKBP12 *knock-out*-Mäuse sterben frühzeitig an Kardiomyopathien. Zusammen mit FKBP12 wird das zu 85 % identische FKBP12.6 für die Regulation der Calciumfreisetzung aus intrazellulären Depots verantwortlich gemacht, da sie an die Ryanodin-Rezeptoren der Skelett- und Herzmuskelzellen binden (Shou et al., 1998; Xin et al., 2002).

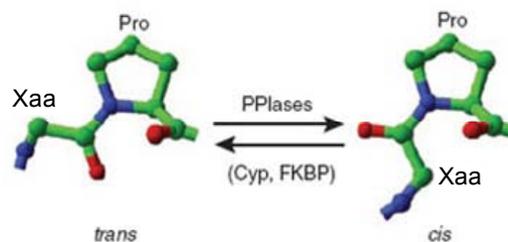


Abb. 1.9: Das Prinzip der Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerisierung

Prolinreste in Proteinen existieren sowohl in *cis*- als auch in *trans*-Konformation. Die relativ langsame intrinsische *cis/trans*-Umwandlung der Peptidbindung zwischen der beliebigen Aminosäure Xaa und einem Prolin, welche durch die hohe Energiebarriere zustande kommt, kann durch PPlasen, wie Cyp und FKBP, beschleunigt werden.

Die komplexeren FKBP bestehen aus bis zu zwei PPIase-Domänen und beinhalten zusätzlich weitere Domänen wie Tetratricopeptid-Motive (TPR) für die Bindung des Hitzeschockproteins 90 (Hsp90), EF-Hand-Motive sowie CaM-Bindestellen. Dazu gehören unter anderem FKBP51 und 52, welche assoziiert mit Hsp90 in inaktivierten Steroidhormon-Komplexen vorkommen (Peattie et al., 1992; Pratt und Toft, 1997).

Die Cyp bestehen jeweils aus einer PPIase-Domäne und können, wie das Cyp40 ebenfalls TPR-Motive beinhalten. Für Cyp sind unter anderem Funktionen in nicht-aktivierten Steroidhormon-Komplexen (Cyp40), im Spliceosom (Cyp19.2), bei der HIV-1-Infektion und bei der Neuroprotektion in familiärer amyotropher lateraler Sklerose (Cyp18) beschrieben (Duina et al., 1996; Lee et al., 1999; Luban et al., 1993; Teigelkamp et al., 1998).

Die strukturell unterschiedlichen Komplexe FKBP/FK506 und Cyp/CsA binden in der Nähe der katalytische Domäne des CaN A und verhindern dadurch die Zugänglichkeit für Substrate (Griffith et al., 1995; Jin und Harrison, 2002). Durch Mutationsstudien in *Saccharomyces cerevisiae* wurden CsA A- und FK506-resistente CaN-Mutanten identifiziert. Die Charakterisierung dieser Mutanten zeigt, dass die Interaktionen der Cyp18/CsA- und der FKBP12/FK506-Komplexe mit der Phosphatase durch mehrere hochkonservierte Regionen

des CaN A vermittelt werden, die teilweise mit der Bindungsdomäne für die regulatorische B-Untereinheit überlappen (Cardenas et al., 1995).

Als einzige CaN-Inhibitoren, die inhibitorische Potenz mit Spezifität verbinden, haben beide Komplexe heute therapeutische Relevanz für die Immunsuppression nach Organtransplantationen (Ochiai et al., 1987; Offner et al., 1987). So wird durch die CaN-Inhibitoren die Aktivierung alloreaktiver T-Zellen und damit die komplette Immunantwort verhindert, indem kein aktives NFAT entsteht und vor allem IL-2 nicht mehr transkribiert wird (Rosen und Schreiber, 1992) (Abb. 1.8). Die Transplantatabstoßung kann durch gezielte Gabe geringer Konzentrationen der Immunsuppressiva gehemmt werden, wobei die Immunabwehr weitgehend intakt bleibt. Da CaN und auch die Immunosuppressiva nicht nur in T-Zellen vorkommen, wird CaN auch in anderen Geweben inhibiert und es treten zahlreiche Nebenwirkungen wie Nierenschäden durch Inhibition der Na⁺/K⁺-ATPasen (Berg et al., 1986), Muskelschäden (Hong et al., 2002) und Knochenabbau (Cvetkovic et al., 1994) auf.

Auf der Suche nach weniger toxischen Immunsuppressiva konnte erstmals auch ein CsA-Derivat hergestellt werden, welches ohne Komplexbildung mit Cyp18 CaN hemmt. Das [Dimethylaminoethylthiosarcosin³] CsA ([Dat-Sar³] CsA) wurde in Position 3 modifiziert. Es wurde eine nicht-kompetitive Hemmung mit einem IC₅₀-Wert von 1 µM des [Dat-Sar³] CsA gegenüber CaN ermittelt. Außerdem wird die enzymatische Aktivität der PP1, PP2A und PP2C nicht beeinflusst (Baumgrass et al., 2004).

2 Zielstellung

CaN, eine Ca^{2+} /CaM-abhängige Serin/Threonin-Proteinphosphatase, ist in wichtige Signalübertragungswege involviert, welche die Entwicklung und Funktion von Immun-, Nerven-, Kardiovaskular- und Muskelskelettsystemen steuern. Im humanen Genom sind drei Isoformen der katalytischen Untereinheit des CaN kodiert, welche mit der regulatorischen Untereinheit CaN B Heterodimere bilden. Obwohl die physiologische Rolle von CaN bereits intensiv untersucht wurde, ist bisher wenig über die spezifischen Funktionen der einzelnen Isoformen von CaN A bekannt. So existieren bis jetzt nur wenige Daten hinsichtlich ihrer proteinchemischen Eigenschaften, Lokalisierung und physiologischen Funktionen.

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war deshalb die erstmalige vergleichende Charakterisierung der CaN-Isoformen, welche neue Einblicke in die spezifischen Funktionen der Isoformen ermöglichen sollte. Dazu sollte die DNA aller drei humanen Calcineurin A-Isoformen zusammen mit der DNA der regulatorischen Untereinheit CaN B durch PCR amplifiziert und in einen prokaryotischen Expressionsvektor kloniert werden. Die Proteine sollten in *E. coli* überexprimiert, chromatographisch gereinigt und anschließend mittels spezifischer CaN-Substrate enzymatisch charakterisiert werden. Dabei sollten mögliche Unterschiede in der Substratspezifität, CaM-Abhängigkeit sowie Inhibierbarkeit herausgestellt werden. Außerdem sollte bei der Charakterisierung besonderes Augenmerk auf die prolinreiche Sequenz im N-terminalen Bereich des CaN A β gelegt werden, welche eine strukturelle Besonderheit unter den drei Isoformen darstellt. Polyprolin-Sequenzen sind als DNA- sowie Protein-Protein-Interaktionsmotive beschrieben worden und könnten CaN A β spezifische Eigenschaften verleihen. Biochemische Untersuchungen zur Funktion dieser Sequenz im CaN A β liegen jedoch bis heute nicht vor. Des Weiteren sollte in dieser Arbeit die subzelluläre Lokalisierung sowie die Expressionsmuster der verschiedenen Isoformen untersucht werden. Diese Experimente könnten ebenfalls Hinweise auf distinkte physiologische Funktionen der CaN-Isoformen liefern.

Ein weiterer wichtiger Aspekt ist die Inhibition des CaN und die damit verbundene Immunsuppression durch die Medikamente FK506 und CsA, welche durch Vertreter der PPlase-Familien der FKBP und Cyp vermittelt wird. Neben einer Beteiligung des FKBP12 und des Cyp18 gibt es allerdings bisher keine Hinweise, ob auch noch andere PPlasen zur Immunsuppression beitragen können. Ziel war es deshalb weitere FKBP und Cyp hinsichtlich ihres Beitrags an der FK506- beziehungsweise CsA-vermittelten CaN-Inhibition zu untersuchen und zu vergleichen.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Laborchemikalien

<u>Chemikalie</u>	<u>Firma</u>
Acetonitril	Merck (Darmstadt)
Aceton	Merck (Darmstadt)
Agar	AppliChem (Darmstadt)
Agarose	GIBCO BRL (Eggenstein)
Ammoniumhydrogencarbonat	Sigma (Deisenhofen)
Ammoniumsulfat	Merck (Darmstadt)
Ampicillin	Sigma (Deisenhofen)
APS	Roth (Karlsruhe)
ATP	Merck (Darmstadt)
BisTris	Merck (Darmstadt)
Bromphenolblau	Serva (Heidelberg)
BSA	AppliChem (Darmstadt)
Calciumchlorid	Fluka (Neu-Ulm)
Carbenicillin	Sigma (Deisenhofen)
Chloramphenicol	Sigma (Deisenhofen)
Chymotrypsin	Merck (Darmstadt)
Coomassie Brilliant Blue G 250	Serva (Heidelberg)
Coomassie Brilliant Blue R 250	Serva (Heidelberg)
Cyclosporin A	Calbiochem (Darmstadt)
dNTP	Fermentas (St. Leon-Rot)
DTT	AppliChem (Darmstadt)
EDTA	AppliChem (Darmstadt)
EGTA	Böhringer (Mannheim)
Essigsäure	Merck (Darmstadt)
Ethanol	Fluka (Neu-Ulm)
Ethidiumbromid	Roth (Karlsruhe)

FK506	Calbiochem (Darmstadt)
Glycerin	Sigma (Deisenhofen)
Glycin	Fluka (Neu-Ulm)
Hefeextrakt	Roth (Karlsruhe)
HEPES	Fluka (Neu-Ulm)
Imidazol	Merck (Darmstadt)
IPTG	AppliChem (Darmstadt)
Isopropanol	Merck (Darmstadt)
Kaliumchlorid	Merck (Darmstadt)
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck (Darmstadt)
Kanamycin	AppliChem (Darmstadt)
Lithiumchlorid (wasserfrei)	Fluka (Neu-Ulm)
Magnesiumchlorid	Merck (Darmstadt)
Magnesiumsulfat	Merck (Darmstadt)
β -Mercaptoethanol	Serva (Heidelberg)
Methanol	Merck (Darmstadt)
Natriumchlorid	Calbiochem (Darmstadt)
Natriumdihydrogenphosphat	Merck (Darmstadt)
Natriumhydroxid	Merck (Darmstadt)
Nickelsulfat	Merck (Darmstadt)
NP-40	Fluka (Neu-Ulm)
Paraformaldehyd	Sigma (Deisenhofen)
Pepton	Roth (Karlsruhe)
PIPES	Serva (Heidelberg)
pNPP	Sigma (Deisenhofen)
Ponceau S	Serva (Heidelberg)
Protaminsulfat	Sigma (Deisenhofen)
Salzsäure	Merck (Darmstadt)
SDS	Serva (Heidelberg)
TCA	Roth (Karlsruhe)
TFE	Fluka (Neu-Ulm)
Tricin	Merck (Darmstadt)
Tris	Serva (Heidelberg)
Trockenmilch	Sigma (Deisenhofen)
Trypsin	Merck (Darmstadt)
Tween20	Sigma (Deisenhofen)
Xylenocyanol FF	Sigma (Deisenhofen)

3.1.2 Radiochemikalien

ATP [γ - ^{33}P] (3000 Ci/mmol, 10 mCi/ml, Isoblu stabil.) Hartmann Analytik (Braunschweig)

3.1.3 Enzyme, Proteine, Peptide

biotinyliertes RII-Peptid	MPF (Halle)
RII-Peptid	Bachem (Weil am Rhein)
Restriktionsendonukleasen	NEB (Beverly, USA)/ Roche (Mannheim)
Deep Vent DNA-Polymerase	NEB (Beverly, USA)
Taq DNA-Polymerase	NEB (Beverly, USA)
T4 DNA Ligase	Fermentas (St. Leon-Rot)
PKA (katalytische Untereinheit)	NEB (Beverly, USA)
Erk-2	NEB (Beverly, USA)
GSK-3 β	NEB (Beverly, USA)
bovines Casein	Sigma (Deisenhofen)
humanes Calmodulin	MPF (Halle)
DARPP-32 der Ratte	Calbiochem (Darmstadt)
humanes GST-Elk-1	Cell Signaling (Danvers, USA)
Tau A der Maus	E. Mandelkow (MPG Hamburg)
humanes His ₆ - NFATc1 ²⁻²⁹⁸	cell sciences (Canton, USA)
humanes Cyp18	MPF (Halle)
humanes Cyp18.2a	MPF (Halle)
humanes Cyp22	MPF (Halle)
humanes Cyp23	MPF (Halle)
humanes Cyp23a	MPF (Halle)
humanes Cyp33	MPF (Halle)
bovines Cyp40	MPF (Halle)
humanes FKBP12	MPF (Halle)
humanes FKBP12 K34T	MPF (Halle)
humanes FKBP12 H87R	MPF (Halle)
humanes FKBP12 I90Y	MPF (Halle)
humanes FKBP12 I90K	MPF (Halle)
humanes FKBP12.6	MPF (Halle)

humanes FKBP13	MPF (Halle)
humanes FKBP38	MPF (Halle)
humanes FKBP51	MPF (Halle)
humanes FKBP52	MPF (Halle)

3.1.4 Antikörper

primäre Antikörper:

anti-CaN-monoklonaler AK	Sigma (Deisenhofen)
anti-CaN-polyklonaler Ak	pab (Hebertshausen)
anti-CaN α -polyklonaler Ak	Epitomics (Burlingame, USA)
anti-CaN β -polyklonaler Ak	Millipore (Billerica, USA)
anti-CaN γ -polyklonaler Ak (C17)	Santa Cruz (Santa Cruz, USA)
anti- β -Actin-monoklonaler AK	Dianova (Hamburg)
anti-FKBP12-polyklonaler Ak	Dianova (Hamburg)
anti-FKBP13-polyklonaler Ak	pab (Hebertshausen)
anti-FKBP51-polyklonaler Ak	Dianova (Hamburg)
anti-FKBP52-polyklonaler Ak	Biomol (Hamburg)
anti-Cyclophilin 18-polyklonaler Ak	pab (Hebertshausen)
anti-Cyclophilin 23-polyklonaler Ak	pab (Hebertshausen)
anti-Cyclophilin 33-monoklonaler AK	Abnova (Taipei, Taiwan)

sekundäre Antikörper:

Esel Anti-Maus-Ab(Peroxidase-Konjugat)	Dianova (Hamburg)
Maus Anti-Kaninchen-Ab (Peroxidase-Konjugat)	Dianova (Hamburg)
Esel Anti-Ziege-Ab (Peroxidase-Konjugat)	Dianova (Hamburg)

3.1.5 Standards

GeneRuler 1 kb-DNA-Standard	Fermentas (St. Leon-Rot)
Prestained Protein Leiter 10 - 180 kDa	Fermentas (St. Leon-Rot)
PageRuler Protein Leiter 10 - 200 kDa	Fermentas (St. Leon-Rot)

3.1.6 Kits

QIAGEN Plasmid Mini Kit	Qiagen (Hilden)
QIAGEN Plasmid Maxi Kit	Qiagen (Hilden)
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen (Hilden)
QIAquick PCR-Purification Kit	Qiagen (Hilden)
Luciferase Assay System	Promega (Madison, USA)
PathDetect Elk-1 <i>trans</i> -Reporting System	Stratagene (La Jolla, USA)
ECL western blotting analysis system	Amersham-Pharmacia (Uppsala, Schweden)
QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene (La Jolla, USA)
Mini Quick Spin DNA Columns	Roche (Mannheim)

3.1.7 Plasmide

pET15b	Novagen (Darmstadt)
pmaxFP-Red-C	Amaya (Köln)
pBB131 (<i>N</i> -Myristyltransferase aus <i>S. cerevisiae</i>)	J. I. Gordon (Washington University School of Medicine, USA)

3.1.8 Templates für PCR

pETC α (CaN A α 1 und CaN B1)	Jun Liu (Universität Baltimore, USA)
humanes CaN A β 2	IMAGENES (Berlin) (IRAKp961CO262Q2)
humanes CaN A γ	IMAGENES (Berlin) (IRALp962GO114Q2)
humanes CaN B2	IMAGENES (Berlin) (IRAKp961A1534Q2)
humanes Cyp23	IMAGENES (Berlin) (IRAU ρ 969A0336D6)

humanes Cyp23a	IMAGENES (Berlin) (IRAU969A0921D6)
humanes Cyp33	IMAGENES (Berlin) (IRAU969C0355D6)

3.1.9 PCR-Primer

Die Oligonukleotide wurden von der Firma MWG Biotech (Ebersberg) synthetisiert.

Mutagenese: *Nde*I-Schnittstelle in CaN $\text{A}\gamma$:

5'-GGT AAA TGT GCT CAA CAT CTG CTC TGA TGA CGA AC-3'

5'-GTT CGT CAT CAG AGC AGA TGT TGA GCA CAT TTA CC-3'

Mutagenese: *Nde*I-Schnittstelle in pET15b-Vektor:

5'-CTC GAG GAG ATA TAC TTA TGG GAA ATG AGG C-3'

5'-GCC TCA TTT CCC ATA AGT ATA TCT CCT CGA G-3'

Klonierung: CaN $\text{A}\beta$ in pET15b:

5'-GAT CGA CAT ATG GCC GCC CCG GAG CCG GCC-3'

5'-GAT CGA CTC GAG TCA CTG GGC AGT ATG GTT-3'

Klonierung: CaN $\text{A}\beta^{22-524}$ in pET15b:

5'-GAT CGA CAT ATG GGG GCT GAC CGC GTC GTC-3'

5'-GAT CGA CTC GAG TCA CTG GGC AGT ATG GTT-3'

Klonierung: CaN $\text{A}\gamma$ in pET15b:

5'-GAT CGA CAT ATG TCC GGG AGG CGC TTC CAC CTC-3'

5'-AGC TAG CTC GAG GAT TCA TGA ATG GGC TTT CTT CCC-3'

Klonierung: CaN B2 in pET15b:

5'-GAT CGA CTC GAG GAG ATA TAC ATA TGG GAA ACG AGG CC-3'

5'-AGC TAG GGA TCC TGA TAC GAT GAG GAC CAG C-3'

Klonierung: CaN α in pmaxFP-Red-C:

5'-GAT CGA CTC GAG CAA TGT CCG AGC CCA AGG CA-3'

5'-GAT CGA GGA TCC TCA CTG AAT ATT GCT GCT-3'

Klonierung: CaN β in pmaxFP-Red-C:

5'-GAT CGA CTC GAG CAA TGG CCG CCC CGG AGC CG-3'

5'-GAT CGA GGA TCC TCA CTG GGC AGT ATG GTT-3'

Klonierung: CaN γ in pmaxFP-Red-C:

5'-GAT CGA CTC GAG CAA TGT CCG GGA GGC GCT TC-3'

5'-GAT CGA GGA TCC TCA TGA ATG GGC TTT CTT-3'

Klonierung: CaN β^{22-524} in pmaxFP-Red-C:

5'-GAT CGA CTC GAG CAG GGG CTG ACC GCG TCG TC-3'

5'-GAT CGA GGA TCC TCA CTG GGC AGT ATG GTT-3'

siRNA: FKBP51

5'-GAA GAC ACU UCA CGU AUU C-3';

siRNA: FKBP12

5'-GCA CAA GUG GUA GGU UAA C-3';

siRNA: FKBP12.6

5'-GAA CAC AGA UCU CUU GUU C-3'.

3.1.10 Humane Zelllinien

Cyp18 defiziente Jurkat-Zellen

J. Luban (Columbia University,
New York, USA)

Alle anderen humanen Zelllinien wurden von DSMZ (Braunschweig) bezogen.

3.1.11 Bakterienstämme

DH5 α	supE44 DlacU169 (f80 lacZDM 15) hsdR17 recA1 end A1 gyrA96 thi relA1
BL21(DE3)	F ⁻ omp T hsdS _B (r _B ⁻ m _B ⁻) gal dcm (DE3)
BL21(DE3)pLysE	F ⁻ omp T hsdS _B (r _B ⁻ m _B ⁻) gal dcm (DE3) pLysE (Cam ^R)

Alle Bakterienstämme wurden von der Firma Novagen (Darmstadt) bezogen.

3.1.12 Medien für die Kultivierung von *E. coli*

<u>LB-Medium:</u>	10 g/l Pepton
(pH 7,5)	5 g/l Hefeextrakt
	5 g/l NaCl

<u>2YT-Medium:</u>	16 g/l Pepton
(pH 7,5)	10 g/l Hefeextrakt
	5 g/l NaCl

Für Kulturplatten wurden zu dem LB-Medium zusätzlich 15 g/l Agar hinzugefügt. Je nach Bedarf konnte dem auf 50 °C abgekühlten Medium 100 µg/ml Ampicillin, 100 µg/ml Carbenicillin, 34 µg/ml Chloramphenicol und/oder 25 µg/ml Kanamycin als steril filtrierte Lösungen hinzugegeben werden.

3.1.13 Chemikalien und Medien für die Zellkultur

fötales Kälberserum	Biochrom (Cambridge, UK)
Glutamin	GIBCO BRL (Eggenstein)
RPMI 1640	GIBCO BRL (Eggenstein)
DMEM	GIBCO BRL (Eggenstein)
Trypsin EDTA 1:250 (10 x Konzentrat)	PAA (Pasching, Österreich)
Vectashield Hard Set Mounting Medium	Vector Laboratories (Burlingame, USA)
Lipofectamine 2000	Invitrogen (Karlsruhe)

PMA	Sigma (Deisenhofen)
Ionomycin	Sigma (Deisenhofen)
DAPI	Sigma (Deisenhofen)

3.2 Methoden

3.2.1 Molekularbiologische Methoden

3.2.1.1 PCR

In den letzten zwei Jahrzehnten hat sich die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) als Methode etabliert, um definierte DNA-Fragmente innerhalb kurzer Zeit zu amplifizieren. Durch die Nutzung spezifischer Primer, ist es möglich neue Restriktionsschnittstellen an das 3'-Ende beziehungsweise an das 5'-Ende einzufügen (Mullis und Faloona, 1987).

Bei der so genannten „Kolonie-PCR“ werden Bakterien auf die Existenz einer spezifischen DNA-Sequenz untersucht. So können zum Beispiel Einzelkolonien nach einer Transformation schnell als positiv identifiziert werden.

Eine weitere Anwendung findet die Methode der PCR bei der Mutagenese von DNA-Fragmenten, wodurch einzelne Basen oder ganze Triplets in den Primern verändert werden und dadurch in die DNA eingefügt werden können.

typischer PCR-Ansatz:

0,5 µl	Template DNA (50 bis 100 ng)
1 µl	10 mM dNTP-Mix
1 µl	Oligodesoxyribonukleotid 1 (100 nmol/ml)
1 µl	Oligodesoxyribonukleotid 2 (100 nmol/ml)
3 µl	Deep Vent-DNA-Polymerasepuffer
1 µl	Deep Vent-DNA-Polymerase
22,5 µl	H ₂ O

Die folgende Tabelle zeigt das üblicherweise verwendete PCR-Programm zur Amplifizierung der Klone:

Schritt	Zweck	Temperatur	Dauer
1	initiale Denaturierung der Template-DNA	96 °C	5 min
2	Denaturierung der Template-DNA	96 °C	1 min
3	Primerannealing	50 - 65 °C	1,5 min
4	Elongation	72 °C	1 min
5	Beenden der Elongation	72 °C	5 min
6	Schutz vor Degradation	4 °C	Halt

Die Schritte 2-4 wiederholten sich 35-mal. Die Amplifizierung erfolgte in einem Thermocycler mit beheizbarem Deckel (Perkin Elmer).

Zur Erleichterung der Amplifikation GC-reicher Regionen wurde bei der PCR von Calcineuin A β 2,5 % (v/v) DMSO hinzugefügt (Varadaraj und Skinner, 1994). Des Weiteren wurde für diese PCR ein leicht abgewandeltes PCR-Programm verwendet:

Schritt	Zweck	Temperatur	Dauer
1	initiale Denaturierung der Template-DNA	96°C	5 min
2	Denaturierung der Template-DNA	96°C	1 min
3	Primerannealing	70°C	1,5 min
4	Elongation	76°C	1 min
5	Beenden der Elongation	76°C	5 min
6	Schutz vor Degradation	4°C	Halt

Die Isolierung der synthetisierten DNA aus dem Ansatz erfolgte mit Hilfe des PCR-Purification Kits oder die Banden wurde aus dem Agarosegel mittels des QIAquick Gel Extraction Kit erhalten.

3.2.1.2 Mutagenese

Die Deletion, die Insertion oder der Austausch von Basen eines DNA-Fragmentes mittels PCR wird als Mutagenese bezeichnet. Dabei können neben einzelnen Basen, sogenannten Punktmutationen, auch ganze Triplets bis hin zu mehreren Aminosäuren verändert werden. Die Mutagenesen wurden nach den Angaben des Herstellers mit Hilfe des QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit durchgeführt. Danach wurden die Ansätze in *E. coli* DH5 α -Zellen transformiert (siehe 3.2.1.7)

3.2.1.3 Restriktionsansätze

Mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen können Plasmid-DNA, aber auch PCR-Produkte spezifisch geschnitten werden. Dabei entstehen je nach Restriktionsenzym glatte oder überhängende Enden, welche für eine Ligation genutzt werden können.

Für einen Restriktionsverdau wurden 0,5 bis 10 μ g DNA mit bis zu 10 U Restriktionsenzym, 1 x Restriktionspuffer und, je nach Enzym, mit 1 x BSA für 3 h bei 37 °C inkubiert.

Anschließend wurde der Ansatz im Agarosegel aufgetrennt und das gewünschte DNA-Fragment gegebenenfalls aus dem Gel extrahiert. Manche Restriktionsendonucleasen können auch nach den Angaben des Herstellers hitzeinaktiviert und die DNA mittels des QIAquick PCR Purification Kits gereinigt werden.

3.2.1.4 Ligation

Vektor und Insert wurden vorher separat mit den jeweiligen Restriktionsendonukleasen verdaut. Für die Ligation wurden mindestens 100 ng des Plasmids und die dreifache Menge an Insert verwendet. Ein 20 μ l Ansatz beinhaltete außerdem 2 μ l Ligationspuffer (NEB) und 400 U T4-Ligase. Nach einer Inkubation für 1 h bei 22°C und einer Inaktivierung der Ligase für 10 min bei 65°C wurden die *E. coli*-Zellen (DH5 α) mit dem Ligationsansatz transformiert.

3.2.1.5 Herstellung chemisch-kompetenter *E. coli*-Zellen

50 ml LB-Medium wurden mit 5 ml einer Übernachtskultur des jeweiligen Bakterienstammes angeimpft und bei 37 °C geschüttelt, bis eine OD_{600nm} von 0,4 - 0,6 erreicht war. Anschließend folgte ein Zentrifugationsschritt für 10 min bei 4300 x g und 4 °C. Das Bakterienpellet wurde in 25 ml 0,1 M steril filtriertem $CaCl_2$ resuspendiert, für 30 min auf Eis inkubiert und danach erneut zentrifugiert. Die Aufnahme der Bakterien erfolgte in 5 ml 0,1 M $CaCl_2$ und 15 % (v/v) Glycerin. Aliquote von 100 µl wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C aufbewahrt.

3.2.1.6 Kultivierung und Aufbewahrung von *E. coli*-Zellen

Bakterien wurden in sterilen Medien bei 37 °C und 200 rpm geschüttelt. Die Kultivierung auf Agarplatten erfolgte im Brutschrank bei 37 °C über Nacht. Für Dauerkulturen wurden 800 µl einer Übernachtskultur mit 200 µl 87 % (v/v) Glycerin versetzt und bei -80 °C gelagert.

3.2.1.7 Transformation

Um DNA in Bakterien einschleusen zu können, wurden 100 µl chemisch-kompetente Bakterien mit 100 - 500 ng Plasmid-DNA 1 h auf Eis inkubiert, gefolgt von einem Hitzeschock (45 sek., 42 °C). Danach schloss sich eine einminütige Inkubation auf Eis und das Schütteln bei 37 °C und 650 rpm für 45 min mit 400 µl 2YT an. Nachfolgend wurden 200 µl des Transformationsansatzes auf selektivem Agarmedium ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

3.2.1.8 Isolation von Plasmid-DNA

3.2.1.8.1 Minipräparation mit Qiagen Plasmid Mini Kit

5 ml einer Übernachtskultur von *E. coli* in LB-Medium wurden abzentrifugiert und mit dem Pellet wurde, wie im QIAprep Spin Miniprep Kit Protocol beschrieben, weitergearbeitet.

3.2.1.8.2 Maxipräparation mit Qiagen Plasmid Maxi Kit

Die Präparationen wurden nach den Angaben des Herstellers im QIAGEN Plasmid Maxi Protokoll durchgeführt.

3.2.1.9 Bestimmung des DNA-Gehaltes

DNA-Lösungen wurden bei 260 nm mit einem UV/VIS-Spektrophotometer gemessen. Dabei sind nur OD-Werte zwischen 0,1 und 1,0 aussagekräftig. Eine OD_{260nm} von 1,0 entspricht 50 µg doppelsträngiger DNA/ml.

3.2.1.10 Agarosegel-Elektrophorese

<u>50 x TAE-Puffer:</u>	242 g	Tris/HCl (pH 8,0)
	57,1 ml	Essigsäure
	100 ml	0,5 M EDTA
	H ₂ O ad 1 l	

<u>6 x Probenpuffer:</u>	0,25 % (w/v)	Bromphenolblau
	0,25 % (w/v)	Xylenocyanol FF
	30 % (v/v)	Glycerol in H ₂ O

Zur Trennung von DNA-Fragmenten wurden 1 %ige (w/v) Agarosegele versetzt mit 5 µl Ethidiumbromid im TAE-Puffer-System verwendet. Die Proben konnten dann mit Probenpuffer versetzt und mit dem Standard auf das Agarosegel aufgetragen werden. Die Auftrennung erfolgte bei 5-8 V/cm. Die Bromphenolblau-Front migriert bei 1 %iger (w/v) Agarose ähnlich einem 300 bp-Fragment im Gel. Wenn die Lauffront dreiviertel der Laufstrecke zurückgelegt hat, wurde die Elektrophorese beendet.

Die DNA-Banden konnten bei UV-Licht von 312 nm sichtbar gemacht und fotografiert werden.

3.2.1.11 Isolation von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die gewünschte DNA-Bande wurde unter UV-Licht aus dem Gel geschnitten. Die Isolation der DNA aus dem Agarstück erfolgte mittels des QIAquick Gel Extraktion Kit nach Angaben des Herstellers.

3.2.2 Proteinbiochemische Methoden

3.2.2.1 Überexpression der rekombinanten Proteine

Üblicherweise wurden positive *E. coli* BL21-Kolonien in 5 ml LB-Medium inokuliert, welches zum Animpfen von 150 ml Vorkulturen verwendet wurde. Diese LB-Vorkulturen enthielten das jeweilige Antibiotikum zur Selektion. Nach einer Inkubation über Nacht bei 37°C wurden jeweils 50 ml zum Animpfen von 1 l Kultur benutzt. Nach Erreichen einer OD_{600nm} von mindestens 0,6 wurde die Proteinexpression induziert. Zur Induktion wurde 1 mM IPTG zugesetzt und für 4 h bei 37 °C inkubiert. Zur Optimierung der Überexpression wurden verschiedene Bakterienstämme verwendet sowie die IPTG-Konzentrationen, die Temperatur und die Induktionszeit variiert. Anschließend wurden die Zellen bei 7000 x g für 10 min zentrifugiert und das Pellet bei -80°C gelagert.

3.2.2.2 Zellaufschluss

Das resuspendierte Bakterienpellet wurde durch dreimaliges Passieren einer French Press[®] mit einem Druck von 1000 bar aufgeschlossen. Die lösliche Fraktion wurde durch Ultrazentrifugation bei 100000 x g für 45 min, bei 4 °C von den Zelltrümmern und anderen unlöslichen Bestandteilen getrennt.

Zum Schutz vor proteolytischem Verdau wurde kurz vor jedem Zellaufschluß eine EDTA-freie Protease Inhibitor Cocktail Tablette (Roche; Mannheim) zur Bakteriensuspension hinzugefügt.

3.2.2.3 Überexpression und Reinigung der CaN-Isoformen

Puffer A: 25 mM Tris/HCl (pH 7,5)
 3 mM MgCl₂
 2 mM EGTA
 2 mM EDTA
 20 mM β-Mercaptoethanol

Puffer B: Puffer A + Proteaseinhibitoren-Mix (complete EDTA-free; Roche)

Puffer C: 20 mM Tris/HCl (pH 7,5)
 100 mM NaCl
 3 mM MgCl₂

Puffer D: 25 mM Tris/HCl (pH 7,4)
 3 mM MgSO₄
 1 mM EGTA
 0,5 mM DTT

Puffer E: 25 mM Tris/HCl (pH7,4)
 3 mM CaCl₂
 0,1 mM EDTA
 0,2 mM DTT

Puffer F: Puffer E + 1 M NaCl

Puffer G1: 20 mM Pipes/NaOH (pH 7,0)
 100 mM NaCl

Puffer G2: Puffer G1 (pH 5,6)

Alle CaN A-Isoformen wurden als Tandemexpressionkonstrukte zusammen mit CaN B1 hergestellt. CaN A_γ wurde sowohl mit CaN B1 als auch mit CaN B2 exprimiert. Für die Produktion von myristyliertem CaN B wurden die CaN-Isoformen mit der Myristyltransferase, im Fall des CaN A_α, in *E. coli* BL21(DE3) ansonsten in *E. coli* BL21(DE3)pLysE co-exprimiert. Die Überexpression der CaN-Isoformen erfolgte im Wesentlichen wie unter 3.2.2.1 beschrieben. Zusammen mit 1 mM IPTG wurden die sechs 1 l Kulturen mit 0,2 mM

Myristinsäure bei 37 °C (CaN α /CaN B1), 30 °C (CaN β /CaN B1 und CaN β^{22-524} /CaN B1) oder 20 °C (CaN γ /CaN B1 und CaN γ /CaN B2) inkubiert. Die Zellpellets wurden vor der Lagerung bei -80 °C mit Puffer B gewaschen. Nach dem Zellaufschluss mittels French Press (siehe 3.2.2.2) in Puffer B sowie einer Proteaseinhibitortablette und der anschließenden Ultrazentrifugation wurde die DNA im Überstand der CaN α /CaN B1-Fractionen mit 0,4 % (w/v) Protaminsulfat gefällt und 15 min im Eisbad unter rühren inkubiert. Anschließend erfolgte ein Ultrazentrifugationsschritt bei 100000 x g für 30 min. Es folgte eine Proteinfällung des Überstandes mit 45 % (w/v) Ammoniumsulfat und eine erneute Ultrazentrifugation bei 75000 x g für 30 min. Das daraus resultierende Pellet wurde in 20 ml Puffer B resuspendiert und über Nacht in Puffer C dialysiert.

Die dialysierte Probe von CaN α /CaN B1 sowie die Überstände von CaN β /CaN B1, CaN β^{22-524} /CaN B1 und CaN γ /CaN B1 nach dem Zellaufschluss und der Ultrazentrifugation wurden anschließend nach dem Protokoll von Mondragon et al. gereinigt (Mondragon et al., 1997). Die Proben wurden mit 1 ml/min auf eine Ni^{2+} -NTA-Affinitätschromatographie-Säule aufgetragen und anschließend mit Puffer C, mit 5 mM Imidazol versetzt, gefolgt von drei Waschschritten mit Puffer G1, G2 und C gewaschen. Die Elution der gebundenen Proteine erfolgte durch einen 80 ml Gradienten aus 40 ml Puffer C mit 25 mM Imidazol und 40 ml Puffer C versetzt mit 250 mM Imidazol. Es schloss sich eine pNPP-Aktivitätsmessung an wie unter 3.2.2.14 beschrieben. Die aktiven Fraktionen wurden 1:1 mit Puffer E verdünnt, mit 3 mM CaCl_2 versetzt und auf eine CaM-Affinitätschromatographie-Säule aufgetragen. Daraufhin wurde die Säule mit Puffer F und anschließend mit Puffer E gewaschen. Die Elution des CaN erfolgte durch Puffer D. Die im pNPP-Assay aktiven Fraktionen wurden mit 10 % Glycerin versetzt, in Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

3.2.2.4 Proteinbestimmung

3.2.2.4.1 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinbestimmung von Proteingemischen erfolgte nach der Bradford-Methode (Bradford, 1976). Als Proteinstandard wurde bovines Serumalbumin verwendet. Der entstandene blaue Farbkomplex wurde bei 595 nm mit einem Mikrotiterplatten-Spektrometer MR7000 (Dynatech, Chantilly, USA) detektiert.

3.2.2.4.2 Spektrophotometrische Proteinbestimmung

Die Konzentration gereinigter Proteine wurde in einer Quarz-Küvette bei einer Absorption von 280 nm spektrophotometrisch bestimmt. Der molare Extinktionskoeffizient kann für Proteine bekannter Aminosäuresequenz nach Gill und von Hippel ermittelt werden (Gill und von Hippel, 1989). Die Proteinkonzentration konnte nun über das Lambert-Beer'sche-Gesetz ermittelt werden.

3.2.2.5 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Trenngelbuffer: 1,8 M Tris/HCl (pH 8,8)

Sammelgelbuffer: 1,25 M Tris/HCl (pH 6,8)

SDS-Laufpuffer: 3,02 g Tris/HCl (pH 8,3)
14,4 g Glycin
1 g SDS
H₂O ad 1 l

Probenpuffer: 40 µl Glycerin
23 mg SDS
125 µl Sammelgelbuffer
5 µl β-Mercaptoethanol
50 µl Bromphenolblau
H₂O ad 1 ml

Die Auftrennung der Proteine erfolgte durch eine SDS-PAGE nach Laemmli (Laemmli, 1970) mit 15 %igen Polyacrylamidgelen bei einer Stromstärke von 15 mA (Sammelgel) und 30 mA (Trenngel). Die Proteinbanden wurden durch Coomassiefärbung detektiert.

3.2.2.6 Coomassie-Färbung

Entfärber: 50 ml Essigsäure
225 ml Methanol
H₂O ad 500 ml

Coomassie-Lösung: 2,0 g Coomassie Brilliant Blue R 250
0,5 g Coomassie Brilliant Blue G 250
425 ml Ethanol
50 ml Methanol
100 ml Essigsäure
H₂O ad 1 l

Trockner: 200 ml Methanol
50 ml Essigsäure
40 ml Glycerin
H₂O ad 500 ml

Die Polyacrylamidgele wurden 1-16 h mit Coomassie-Lösung gefärbt, anschließend bis zur Sichtbarkeit der Banden entfärbt und getrocknet.

3.2.2.7 Western Blot

Blocking-Lösung: 200 ml TBS
10 g Trockenmilch
400 µl 50 % (v/v) Tween20

Transferpuffer: 25 mM Tris/HCl (pH 8,3)
150 mM Glycin
10 % (v/v) Methanol
0,01 % (w/v) SDS

Ponceau S-Lösung: 2 mg Ponceau S/ml in 2 % (v/v) Essigsäure

TBS-T: 50 mM Tris/HCl (pH 7,5)
150 mM NaCl
0,2 % (v/v) Tween20

Stripping-Puffer: 62,5 mM Tris/HCl (pH 6,7)
2 % (w/v) SDS
100 mM β-Mercaptoethanol

Die Western Blot-Analyse erfolgte im Anschluss an die SDS-PAGE. Eine mit Transferpuffer getränkte Nitrozellulosemembran wurde auf das Gel gelegt und anodenwärts ausgerichtet. Beide Seiten wurden von Filterpapier und Filz umgeben und das Sandwich in die Blot-Apparatur gegeben. Der Blot-Vorgang erfolgte nach dem *semi dry electroblotting* Verfahren bei einer Stromstärke von 2 mA/cm^2 für 90 min (Towbin et al., 1979). Um die übertragenen Proteinbanden sichtbar zu machen, wurde die Membran mit Ponceau S-Lösung angefärbt. Nach dem Entfärben wurde die Membran für 2 h bei Raumtemperatur in 10 ml Blocking-Lösung geschüttelt, um unspezifische Bindungen der Antikörper zu verhindern. Nach dreimaligem Waschen mit je 10 ml TBS-T für 5 min wurde der erste Antikörper 1:1000 in der Blocking-Lösung verdünnt, auf die Membran gegeben und 1 h bei RT inkubiert. Die Membran wurde nach erneutem Waschen mit TBS-T mit dem 1:2000 verdünntem Peroxidase-konjugierten sekundären Antikörper für 30 min geschüttelt und anschließend wieder gewaschen.

Die Entwicklung erfolgte mit Hilfe des Chemiluminescence Detection Kits von AppliChem nach Anleitung des Herstellers. Die mit ECL inkubierten Blots wurden mittels der CCD-Kamera Biovision + 3000 WL/LC von peqLab (Erlangen) entwickelt.

Um die Membranen mit anderen Antikörpern erneut zu inkubieren, mussten die bereits gebundenen Antikörper abgelöst werden. Dazu wurde die Membran für 30 min in einem 50°C Wasserbad in Stripping Puffer inkubiert. Anschließend erfolgten drei Waschschriffe mit TBS-T sowie ein erneutes Blocken der Membran mit Blocking-Lösung.

Die Western Blot Banden konnten durch ebenfalls auf dem Blot aufgetragene Standards mit bekannten Konzentrationen durch die Software AIDA 2.1 quantifiziert werden.

3.2.2.8 Co-Präzipitationsexperimente

Lysepuffer:	10 mM	HEPES/NaOH (pH 8,0)
	0,1 % (v/v)	NP-40
	15 μl	Proteaseinhibitoren (von 1 Tablette in 500 μl H ₂ O gelöst)
Elutionspuffer:	50 mM	Tris/HCl (pH 7,5)
	250 mM	Imidazol

Zur Analyse, welche FKBP/FK506- oder Cyp/CsA-Komplexe in der Lage sind, CaN *in vivo* zu binden und damit eine Rolle bei der Immunsuppression zu spielen, wurden Co-Präzipitationsexperimente durchgeführt. Dazu wurden 500 pmol CaN Ad/CaN B1 an 100 μl Ni²⁺-NTA-Beads immobilisiert und dreimal mit 50 mM Tris/HCl (pH 7,5) gewaschen. Frische

Jurkat-Zellen wurden mit Lysepuffer für 30 min bei 4°C lysiert und 300 µl Jurkat-Zellextrakt (1 mg/ml) in Anwesenheit von 20 µM FK506 auf der CaN Aα/CaN B1 Ni²⁺-NTA-Matrix für 1 h bei 4°C gebunden. Nach dreimaligem Waschen mit 50 mM Tris/HCl (pH 7,5) wurden die gebundenen Proteine mit 60 µl Elutionspuffer eluiert und mittels SDS-PAGE sowie Western Blot mit verschiedenen FKBP-Antikörpern analysiert. Als Kontrolle wurden die Ni²⁺-NTA-Beads mit dem Jurkat-Zelllysate ohne CaN inkubiert beziehungsweise mit CaN aber ohne FK506.

Für die Untersuchungen der CaN-Interaktion mit FKBP/FK506- oder Cyp/CsA-Komplexen unter *in vivo* Bedingungen wurden Jurkat-Zellen in An- und Abwesenheit von 20 µM FK506 oder 20 µM CsA für 16 h inkubiert, geerntet und lysiert. Die Bindung der sich in den Zellen gebildeten Komplexe an CaN wurde wie bereits beschrieben analysiert.

3.2.2.9 CD-Spektroskopie

Die optische Aktivität von Molekülen durch asymmetrische Kohlenstoffatome wird sich bei der CD-Spektroskopie zu nutze gemacht, um Aussagen über Strukturgehalt sowie Strukturänderungen von Proteinen treffen zu können. Die chromophoren Gruppen der Proteine absorbieren zirkular polarisiertes Licht unterschiedlich stark, so dass die Differenz der Extinktionskoeffizienten für links und rechts polarisiertes Licht die molare Elliptizität für ein Protein ergibt. Die molare Elliptizität in Abhängigkeit von der Wellenlänge ergibt ein CD-Spektrum und lässt sich sowohl für Nah- als auch für Fern-UV-CD nach folgender Formel berechnen.

$$[\Theta]_{MRW} = \frac{\Theta \cdot 100 \cdot Mr}{c \cdot d \cdot N_A}$$

$[\Theta]_{MRW}$	molare Elliptizität bezogen auf das durchschnittliche Molekulargewicht einer Aminosäure (deg·cm ² ·dmol ⁻¹)
Θ	gemessene Elliptizität (grad)
Mr	Molekulargewicht
c	Proteinkonzentration (mg/ml)
d	Schichtdicke (cm)
N_A	Anzahl der Aminosäuren

Die Fern-UV CD-Spektren wurden in einem Jasco J-710 CD-Spektrometer mit einer 0,1 cm Quarzglasküvette in 25 mM Tris/HCl (pH 7,4); 3 mM MgSO₄; 1 mM EGTA bei 20°C mit 2 µM CaN Aα/CaN B1, β und β²²⁻⁵²⁴ sowie 1 µM CaN Aγ/CaN B1 aufgenommen. Das Pufferspektrum wurde von den Proteinspektren abgezogen und die molaren Elliptizitäten berechnet.

Die thermisch-induzierte Denaturierung wurde von 4°C bis 95°C aufgenommen. Daraus ergeben sich die thermalen Denaturierungskurven. Sie wurden bei einer Wellenlänge von 222 nm aufgenommen. Im Abstand von 10°C, beginnend bei 10°C bis 90°C wurde jeweils ein Fern-UV-CD-Spektrum gemessen.

3.2.2.10 Protease-gekoppelter PPlase-Test

Die Messung der PPlase-Aktivität wurde von Fischer *et al* 1984 entwickelt (Fischer et al., 1984). Das Prinzip dieser Messungen beruht auf konformationsspezifischen Proteasen wie Chymotrypsin oder Trypsin, welche die Yaa-pNA-Bindung in den verwendeten Suc-Ala-Xaa-Pro-Yaa-pNA-Peptiden nur hydrolysieren, wenn die Xaa-Pro-Bindung in der *trans*-Konformation vorliegt. Die pNA-Freisetzung kann bei 390 nm verfolgt werden. Aufgrund eines Überschusses an Protease wird der größte Teil des Substrates in den ersten 10 sec. gespalten. Es schließt sich eine langsamere *cis* → *trans*-Isomerisierung an, die mittels PPlasen beschleunigt werden kann. Wird das Substrat statt üblicherweise in DMSO in Li/Cl-TFA gelöst, erhöht sich der initiale *cis*-Gehalt des Substrates von ursprünglich ca. 5 % auf bis zu 50 %, so dass sich das Messfenster der Reaktion vergrößert.

Gemessen wurde üblicherweise bei 10°C an einem UV/Vis-Diodenarray-Spektrophotometer bei 390 nm für 250 s. Als Referenz diente die Messung der Absorption bei 510 nm. Dazu wurden 1,5 ml 35 mM HEPES/NaOH (pH 7,8) mit 0,5 µM BSA, verschiedenen Konzentrationen PPlase und 0,5 mg/ml Chymotrypsin (in 5 mM HCl gelöst) für 5 min bei 10 °C inkubiert. Anschließend konnte die Reaktion durch Zugabe von 40 µM Substrat (in 0,47 M LiCl/TFE gelöst) gestartet werden. Üblicherweise wird die PPlase-Aktivität der Cyp mit dem Substrat Xaa = Ala, der FKBP mit Xaa = Phe/Leu gemessen.

Mit folgender Formel wurde die Geschwindigkeitskonstante der katalysierten Reaktion berechnet:

$$k_{enz} = k_{obs} - k_{nenz}$$

k_{enz}	Geschwindigkeitskonstante der katalysierten Reaktion
k_{obs} :	beobachtete Geschwindigkeitskonstante
k_{nenz} :	Geschwindigkeitskonstante der nicht katalysierten Reaktion

Die katalytische Effizienz k_{cat}/K_m der PPlasen für ein Substrat wurde mit Hilfe folgender Formel berechnet:

$$\frac{k_{cat}}{K_m} = \frac{k_{enz}}{[E]}$$

k_{cat}/K_m :	Spezifitätskonstante eines Enzyms gegenüber einem Substrat
k_{enz} :	Geschwindigkeitskonstante der katalysierten Reaktion
$[E]$:	Enzymkonzentration im Messansatz

3.2.2.11 Phosphorylierung der Proteinsubstrate

Die Phosphorylierungen der Proteinsubstrate erfolgten in 24-70 µl-Ansätzen bei 30°C für 16 h nach den Vorschriften aus Tabelle 3.1.

Die Reinigung der Phosphorylierungsansätze erfolgte über die Mini Quick Spin Columns von Roche nach den Angaben des Herstellers. Um das noch freie ATP vollständig abzutrennen wurden die Ansätze zweimal hintereinander gefiltert.

Tab. 3.1: Phosphorylierungsansätze der Proteinsubstrate

Casein	DARPP-32	Elk-1	NFAT	Tau
450 µM ATP	200 µM ATP	195 µM ATP	190 µM ATP	190 µM ATP
2 mM DTT	2 mM DTT	2 mM DTT	2 mM DTT	2 mM DTT
7,5 µl 10 x PKA-Puffer	6 µl 10 x PKA-Puffer	2,4 µl 10 x MAPK-Puffer	6 µl 10 x PKA-Puffer	6 µl 10 x PKA-Puffer
10 mM MgCl ₂	10 mM MgCl ₂	10 mM MgCl ₂	10 mM MgCl ₂	10 mM MgCl ₂
16000 U PKA	17500 U PKA	240 U Erk-2	12500 U PKA	2500 U Gsk-3β
			2500 U GSK-3β	240 U Erk-2
0,5 µl Proteaseinhibitoren	0,25 µl Proteaseinhibitoren	0,25 µl Proteaseinhibitoren	0,25 µl Proteaseinhibitoren	0,25 µl Proteaseinhibitoren
67,6 µM Casein	30 µM DARPP-32	55 µM Elk-1	30 µM NFAT	11 µM Tau A
1 µM ATP [γ- ³³ P]	0,8 µM ATP [γ- ³³ P]	1 µM ATP [γ- ³³ P]	0,7 µM ATP [γ- ³³ P]	1 µM ATP [γ- ³³ P]

3.2.2.12 Phosphatase-Aktivitätsmessung mittels Proteinsubstraten

Die CaN-Aktivität wurde durch die Messung des freigesetzten ³³P von den radioaktiv-markierten Substraten bestimmt. Die Messungen erfolgten in einem Reaktionsansatz von 10 µl mit 40 mM Tris/HCl (pH 7,5); 6 mM MgCl₂; 100 mM NaCl; 1 mM CaCl₂; 500 µM DTT; 100 µg/ml BSA; 150-200 nM CaM und einer CaN-Konzentration von 5-170 nM sowie verschiedenen Konzentrationen von ³³P-markiertem Substrat. Um die Inhibitionskonstanten der Immunophilin / Immunosuppressiva-Komplexe zu ermitteln, wurden 0-400 nM FKBP12 und 20 µM FK506 oder 0-500 nM Cyp 18 und 20 µM CsA zu den Ansätzen gegeben. Die

Menge an phosphoryliertem Proteinsubstrat wurde über eine ATP-Standardkurve berechnet. Die Dephosphorylierungen wurden durch die Zugabe von ^{33}P -markiertem Substrat gestartet. Nach Inkubationszeiten von 1-90 min bei 30°C wurden die Proteine durch die Zugabe von 20 % TCA und, 150 $\mu\text{g/ml}$ BSA präzipitiert. Anschließend an eine 15 minütige Inkubation auf Eis erfolgte ein Zentrifugationsschritt für 15 min bei 15000 x g. Das Pellet wurde mit Aceton gewaschen und erneut zentrifugiert. Pellet und Überstand wurden mit 1,5 ml Scintillator im MicroBeta Top-Counter vermessen.

3.2.2.13 Aktivitätsmessungen mittels pNPP

<u>pNPP-Assaypuffer:</u>	50 mM	Tris/HCl (pH 8,0)
	30 mM	MgCl ₂
	5 mM	CaCl ₂
	10 mM	pNPP

Das para-Nitrophenylphosphat (pNPP) ist ein kleines unspezifisches Substrat für Proteinphosphatasen. Auch CaN kann die Hydrolyse des pNPP zu dem chromophoren p-Nitrophenolat-Ion katalysieren.

Die Messung der p-Nitrophenolat-Freisetzung erfolgte spektrophotometrisch bei 405 nm in einem Mikrotiterplatten-Spektrometer MR7000 (Dynatech, Chantilly, USA) bei Raumtemperatur (RT). Die Anfangsanstiege der Reaktionen wurden mittels linearer Regression bestimmt.

Messansatz pro Kavität:	20 μl	Probe
	100 μl	10 mM pNPP in pNPP-Messpuffer

Zur Bestimmung der kinetischen Konstanten wurden 40 nM CaN A α /CaN B1, CaN A β /CaN B1, CaN A γ /CaN B1 oder CaN A β^{22-524} /CaN B1 mit jeweils 150 nM CaM und 2,5-120 mM pNPP in pNPP-Assaypuffer gemessen und die kinetischen Konstanten ermittelt. Die ermittelten Anfangsanstiege k wurden über folgende Beziehung in Reaktionsgeschwindigkeiten v (nM/s) umgerechnet.

$$v = \frac{k \cdot F}{\epsilon \cdot 10^{-9}} \quad F = 374/\text{Volumen der Kavität in } \mu\text{l}$$

Der Faktor F korrigiert die gemessene Extinktion in der Kavität auf die Extinktion bei einer Schichtdicke von 1 cm. Der Extinktionskoeffizient ε beträgt bei 405 nm $18200 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

3.2.2.14 Phosphorylierung des RII-Peptids

Ein biotinyliertes 19-mer Peptid, welches der Sequenz der RII-Untereinheit der bovinen PKA (DLDVPIRGRFDRRVSVAAE-OH) entspricht, wurde nach einem modifizierten Protokoll von Enz et al. phosphoryliert (Enz et al., 1994). Die Dephosphorylierung dieses Peptids weist ähnliche kinetischen Konstanten im Vergleich mit der gesamten RII-Untereinheit auf (Blumenthal et al., 1986).

Der RII-Phosphorylierungsansatz wurde für 3 h bei 30 °C unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurde das freie ATP mit einer RP-C2 clean-up Extraktionssäule (Amchro, Sulzbach) welche vorher mit Methanol, 70 % (v/v) Acetonitril und H₂O gespült wurde, abgetrennt. Nach dem Waschen mit 5 Säulenvolumina H₂O wurde das Peptid mit 500 µl 70 % (v/v) Acetonitril in H₂O eluiert. Das Eluat wurde aliquotiert und lyophilisiert.

Zur Bestimmung der kinetischen Konstanten wurde zusätzlich nicht-biotinyliertes RII-Peptid phosphoryliert (Tab. 3.2). Die Inkubation des Ansatzes und die anschließende Reinigung erfolgten wie oben beschrieben.

Tab. 3.2: Phosphorylierungsansätze des biotinylierten RII-Peptids mit radioaktiv-markiertem ATP sowie des nicht-biotinylierten RII-Peptids mit ATP.

Phosphorylierung des biotinylierten RII-Peptids mit ATP [γ - ³³ P]		Phosphorylierung des nicht-biotinylierten RII-Peptids mit ATP	
50 mM	Tris/HCl (pH 7,5)	50 mM	Tris/HCl (pH 7,5)
10 mM	MgCl ₂	10 mM	MgCl ₂
200 µM	ATP	1 mM	ATP
100 µCi	ATP [γ - ³³ P]		
0,5 mM	DTT	0,5 mM	DTT
100 µM/ml	BSA	100 µM/ml	BSA
12,5 kU	PKA	12,5 kU	PKA
700 µM	biotinyliertes RII-Peptid	1 mM	nicht-biotinyliertes RII-Peptid

3.2.2.15 Phosphatase-Aktivitätsmessung mittels ^{33}P -RII-Peptid

<u>RII-Assaypuffer:</u>	40 mM	Tris/HCl (pH 7,5)
	100 mM	NaCl
	6 mM	MgCl ₂
	1 mM	CaCl ₂
	500 μM	DTT
	100 μg/ml	BSA

Das lyophilisierte ^{33}P -RII-Peptid wurde kurz vor den Messungen in 100 μl RII-Assaypuffer aufgenommen. Zur Phosphatase-Aktivitätsmessung mit dem RII-Peptid wurden bis zu 2 nM CaN mit Assaypuffer und 100 pmol des ^{33}P -RII-Peptid in einem 100 μl Ansatz für 30-60 min bei 30 °C inkubiert.

Anschließend wurden 90 μl des Reaktionsgemisches in eine Streptavidin-beschichtete 96 well-Szintillationsmikrotiterplatte (Costar, Bodenheim, Deutschland) pipettiert und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das Prinzip der Szintillation wurde bereits 1997 von Sullivan et al. beschrieben (Sullivan et al., 1997). Das biotinylierte ^{33}P -RII-Peptid bindet durch die Biotin/Streptavidin-Wechselwirkung an die Streptavidin-beschichteten Kavitäten der Szintillationsmikrotiterplatte. Nach Dephosphorylierung des ^{33}P -RII-Peptid kann die restliche, gebundene Radioaktivität in einem MicroBeta Top-Counter (Perkin-Elmer; Boston, USA) gemessen werden.

Zur Bestimmung der kinetischen Konstanten wurden 15 nM CaN Aα/CaN B1, β und β²²⁻⁵²⁴ sowie 50 nM CaN Aγ/CaN B1 mit 150 nM CaM vorinkubiert. Es folgte die Zugabe von 0,11-30,11 μM RII-Phosphopeptid, wobei jeweils 0,11 μM biotinyliertes ^{33}P -RII-Peptid und der Rest aus nicht-biotinyliertem P-RII-Peptid bestand.

3.2.3 Zellbiologische Methoden

3.2.3.1 Kultivierung der humanen Zelllinien

<u>PBS (pH 7,4):</u>	8,77 g	NaCl
	3,15 g	Na ₂ HPO ₄
	0,163 g	KH ₂ PO ₄
	H ₂ O ad 1 l	

Tab. 3.3: Darstellung der kultivierten, humanen Zelllinien mit ihrem Ursprung und Charakteristika.

Zelllinie	Charakteristika	Kultivierung	Referenz
Jurkat	humane T-Zelllinie von Kind mit akuter lymphoblastischer Leukämie, Suspensionszellen	RPMI mit 10 % FCS und 2 mM Glutamax, 37°C, 5 % CO ₂ , 95 % Luftfeuchtigkeit	(Schneider et al., 1977)
HEK 293	Nierenzelllinie entstanden durch Transfektion humaner embryonaler Nierenzellen mit DNA des Adenovirus 5, adherente Zellen	DMEM mit 10 % FCS und 2 mM Glutamax, 37°C, 5 % CO ₂ , 95 % Luftfeuchtigkeit	(Graham et al., 1977)
HeLa	humane Gebärmutterhalskrebszelllinie einer Frau mit Gebärmutterhalskrebs durch Papillomavirus 18, adherente Zellen	DMEM mit 10 % FCS und 2 mM Glutamax, 37°C, 5 % CO ₂ , 95 % Luftfeuchtigkeit	(Scherer et al., 1953)
HT-29	humane Darmepithelzelllinie einer Frau mit Adenokarzinom Typ 1 im Dickdarm, adherente Zellen	DMEM mit 10 % FCS und 2 mM Glutamax, 37°C, 5 % CO ₂ , 95 % Luftfeuchtigkeit	(Von Kleist et al., 1975)
SH-SY5Y	humane Neuroblastomazelllinie entstand aus dreimaligem Klonen der SK-N-SH-Zelllinie, ursprüngliche Zellen einer Frau mit metastasierendem Knochenmarkskrebs, adherente Zellen	DMEM mit 10 % FCS und 2 mM Glutamax, 37°C, 10 % CO ₂ , 95 % Luftfeuchtigkeit	(Biedler et al., 1973; Ross et al., 1983)
MCF-7	humane Brust-Adenocarcinomazellen einer Frau mit Mammakarzinom, adherente Zellen	RPMI mit 10 % FCS und 2 mM Glutamax, 37°C, 5 % CO ₂ , 95 % Luftfeuchtigkeit	(Soule et al., 1973)
Y79	humane Retinoblastomazellen eines Mädchens mit Retinoblastom im rechten Auge, Suspensionszellen	DMEM mit 10 % FCS und 2 mM Glutamax, 37°C, 5 % CO ₂ , 95 % Luftfeuchtigkeit	(Reid et al., 1974)
A431	humane Hautkrebszellen einer Frau mit Hautkrebs, adherente Zellen	RPMI mit 10 % FCS und 2 mM Glutamax, 37°C, 5 % CO ₂ , 95 % Luftfeuchtigkeit	(Giard et al., 1973)

Der Umgang mit Zelllinien erfolgte ausnahmslos unter sterilen Bedingungen. Zwei- bis dreimal pro Woche wurde das Kulturmedium komplett erneuert. Dazu wurden die adherenten Zellen mit Trypsin EDTA für ca. 2-3 min behandelt und dadurch abgelöst. Nach der Aufnahme der Zellen in Medium erfolgte eine Zentrifugation mit 1000 x g für 5 min bei RT. Das Zellpellet konnte nun mit PBS gewaschen, erneut zentrifugiert und in frischem Medium,

welches auf 37°C vorgewärmt wurde, aufgenommen werden. Suspensionszellen wurden ebenfalls zentrifugiert, mit PBS gewaschen und in frischem, vorgewärmtem Medium resuspendiert.

Die Zellen wurden in regelmäßigen Abständen in Stickstoff eingefroren, um gegebenenfalls auf den Pool an Zellen zurückgreifen zu können. Dafür wurde auf ein Zellpellet von ungefähr 10^6 Zellen 500 µl kaltes, reines FCS pipettiert und 5-10 min auf Eis inkubiert. Es folgte die Zugabe von 100 µl DMSO und 400 µl Medium. Die Kryostocks wurden über Nacht bei -80°C eingefroren und anschließend in Stickstoff gelagert.

Zum Auftauen der Zellen wurden die Kryoröhrchen im Wasserbad bei 37°C schnell aufgetaut und in vorgewärmtes Medium überführt. Nach 12-24 h erfolgte ein Mediumwechsel.

Alle Zellen in Kultur wurden im Abstand von einem Monat auf Mycoplasmen mittels PCR geprüft.

3.2.3.2 Transfektion der Zellen mittels Elektroporation oder Lipofektion

Eine Vielzahl an Transfektionsmethoden zum Einschleusen von Fremd-DNA in eukaryotische Zellen sind bis heute erfolgreich getestet worden. Als sehr effiziente Methoden erwiesen sich dabei neben der viralen Transfektion die Calciumphosphat-Methode, die Lipofektion und die Elektroporation.

Besonders menschliche Lymphozyten lassen sich durch die Calciumphosphat-Methode beziehungsweise Lipofektion schlecht transfizieren. Deshalb bietet sich bei diesen Zellen eine Transfektion mit elektrischen Impulsen an.

Dazu wurden 1×10^7 Jurkat-Zellen bei 1000 x g zentrifugiert und das Pellet in 70 µl Transfektionslösung (Amaya, Köln) resuspendiert. Es folgte eine Zugabe von 5-10 µg Plasmid-DNA. Diese Mischung wurde in eine Elektroporationsküvette gegeben und anschließend in das Nukleofektor-Gerät (Amaya, Köln) eingesetzt. Zur Transfektion der Jurkat-Zelllinie wurde das Programm A-17 verwendet. Nach dem Impuls erfolgte die Aufnahme der Zellen in 5 ml vorgewärmten Medium und eine Inkubation im Brutschrank.

Die Transfektion der SH-SY5Y-Zellen erfolgte durch Lipofektion mit Hilfe des Lipofectamine 2000 nach den Angaben des Herstellers.

3.2.3.3 RNA Interferenz-Experimente

Die verwendeten *small interfering* dsRNAs (siRNAs) wurden von der Firma MWG Biotech (Ebersberg) synthetisiert.

Die Transfektion der siRNA in Jurkat-Zellen erfolgte durch Elektroporation. Die Transfektionseffizienz der Zellen lag bei 50-60 %.

3.2.3.4 Messung der NFAT-Reporter-Gen-Aktivität

Zur Quantifizierung von Promotoraktivitäten wird gewöhnlich das Firefly-Luciferase-Gen von *Photinus pyralis* unter die Kontrolle des zu untersuchenden Promotors gestellt. Die Luciferase katalysiert die ATP-abhängige oxidative Decarboxylierung von Luciferin.

Bei dieser Reaktion entsteht neben Oxyluciferin, AMP und Kohlendioxid auch Licht, welches detektiert werden kann (Brasier und Ron, 1992).

Im Jahre 1993 wurde der Transkriptionsfaktor NFAT erstmals als direktes CaN-Substrat beschrieben (Jain et al., 1993).

Zur Untersuchung der CaN-Aktivität in Zellen wurde der NFAT-Reporter-Gen-Assay gewählt. CaN dephosphoryliert das zelleigene NFAT, welches daraufhin an den NFAT-Promotor des Reporter-Gen-Plasmids bindet. Die Transkription des Luciferase-Gens wird initiiert. So ist die Luciferase-Aktivität ein indirektes Maß für die CaN-Aktivität in der Zelle. Die Zellen wurden 12 h nach der transienten Co-Transfektion zentrifugiert und in 100 µl Reporter-Gen-Lyse-Puffer lysiert. Es folgten ein Ultraschallaufschluss der Zellen und eine erneute Zentrifugation. Jeweils 20 µl des Überstandes wurde im Luminescence Counter (Perkin-Elmer; Boston, USA) automatisch mit 100 µl des Reporter-Gen-Assay-Substrates versetzt und die Lichtemission gemessen. Als interner Standard wurden alle Zellen zusätzlich mit dem β -Galaktosidase-Plasmid transfiziert.

3.2.3.5 Messung der Elk-1-Reporter-Gen-Aktivität

Das Prinzip der Messung der Elk-1 Reporter-Gen-Aktivität ist das gleiche wie für den NFAT-Reporter-Gen-Test bereits beschrieben.

Zur Messung der Elk-1 Dephosphorylierung wurde das PathDetect Elk-1 *trans*-Reporting System von Stratagene verwendet.

Elk-1 wird durch das *trans*-aktivator Plasmid kodiert. Das Reporter Plasmid kodiert die Luciferase. SH-SY5Y wurden mit beiden Plasmiden transfiziert, zusätzlich wurden die RFP-CaN-Plasmide co-transfiziert. Zur intrazellulären Phosphorylierung des Elk-1 erfolgte außerdem die Transfektion des pFC-MEK1 Plasmids. Phosphoryliertes Elk-1 initiiert die Transkription des Luciferase-Gens durch Interaktion an die GAL4UAS-Bindestelle vor dem

Luciferase-Gen. So ist die Luciferase-Aktivität ein indirektes Maß für die CaN-Aktivität in der Zelle. Die Zellen wurden 12 h nach der transienten Co-Transfektion für 4 h mit 2 µg/ml Ionomycin stimuliert und in 100 µl Reporter-Gen-Lyse-Puffer (Promega, Madison, USA) lysiert. Es folgten ein Ultraschallaufschluss der Zellen und eine erneute Zentrifugation. Jeweils 20 µl des Überstandes wurde im Luminescence Counter (Perkin-Elmer; Boston, USA) automatisch mit 100 µl des Reporter-Gen-Assay-Substrates versetzt und die Lichtemission gemessen. Als interner Standard wurden alle Zellen zusätzlich mit dem β-Galaktosidase-Plasmid transfiziert.

3.2.3.6 Immunfluoreszenz

Zur Analyse der Lokalisierung der CaN-Isoformen in der Zelle wurde die Methode der Immunfluoreszenz gewählt. Bei dieser Methode können zelluläre Proteine mit spezifischen Antikörpern markiert und mit fluoreszierenden primären oder sekundären Antikörpern sichtbar gemacht werden. Eine Alternative stellt die Fusion der Proteine mit fluoreszierenden Proteinen dar, welche durch Vektoren in die Zelle transfiziert werden.

Dazu wurden die Zellen durch Lipofektion mit den entsprechenden Plasmiden transfiziert und auf Deckgläschen in 6-well Platten ausgesät. Am nächsten Tag erfolgte die Fixierung der Zellen mit 1 ml 4 % Paraformaldehyd für 30 min bei Raumtemperatur. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit 1 ml 0,2 % Triton X-100, 1 % FCS in PBS für 5 min auf Eis permeabilisiert. Es folgten erneut dreimal 15-minütige Waschschrte mit PBS und 1 % FCS. Zur Färbung der Zellkerne wurden daraufhin die Zellen mit 1 ml 0,2 % Triton X-100, 1 % FCS, 0,4 µg/ml 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI; Stammlösung: 1mg/ml in DMSO) in PBS für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Abschließend wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen. Die Deckgläschen wurden auf Objektträger mit einem Tropfen Mounting Medium gelegt und getrocknet. Die Analyse der Lokalisierung erfolgte mit Hilfe des konfokalen Laser scanning Mikroskops TE2000 der Firma Nikon.

4 Ergebnisse

4.1 Klonierung und Reinigung der humanen CaN-Isoformen

Es existieren drei humane Isoformen des CaN A, über deren physiologische Funktionen bisher nur wenig bekannt ist. Vor allem CaN A γ war bisher nicht Gegenstand der Forschung. Ein erstes Ziel der Arbeit war deshalb die DNA der katalytischen Untereinheiten des CaN zusammen mit der regulatorischen Untereinheit CaN B in einen prokaryotischen Expressionsvektor zu klonieren, zu überexprimieren und zu reinigen.

4.1.1 Klonierung

Der Tandem-Expressionsvektor pET15b/CaN A α /CaN B1 wurde freundlicherweise durch die Arbeitsgruppe von Jun Liu (Universität, Baltimore) bereitgestellt. Die kodierenden Sequenzen von CaN A β und A γ wurden mittels PCR amplifiziert. Als Templates dienen dabei IMAGE-Klone der Firma IMAGENES (Berlin). Da die Sequenz von CaN A β sehr viele GC-reiche Regionen enthält, wurde das PCR-Programm für diese Amplifizierung leicht abgewandelt.

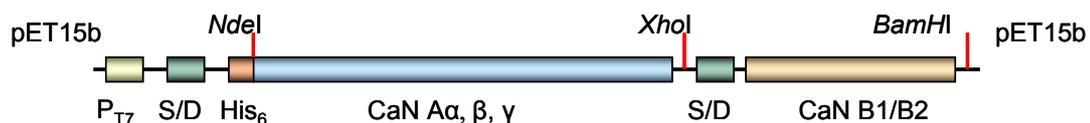


Abb. 4.1: Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie für die humanen CaN-Isoformen

Ausgehend von dem Tandemexpressionskonstrukt CaN A α /CaN B1 wurden die katalytischen Untereinheiten CaN A β und γ sowie die Kombination CaN A γ /CaN B2 in den pET15b-Vektor kloniert. P_{T7}: T7-Promotor, S/D: Shine/Dalgarno-Sequenz, His₆: His-Tag

Aufgrund einer bereits vorhandenen *NdeI*-Schnittstelle in der Sequenz von CaN A γ wurde eine Base aus dieser Schnittstelle durch Mutagenese verändert, ohne dabei die Aminosäuresequenz zu beeinflussen. Die PCR-Produkte wurden mit den Restriktionsendonukleasen *NdeI* und *XhoI* verdaut und anstelle des CaN A α in den pET15b-Vektor ligiert (Abb. 4.1). Positive Klone der Ligationen wurden mittels Kolonie-PCR und einen erneuten Restriktionsverdau der präparierten Plasmide identifiziert (Abb. 4.2).

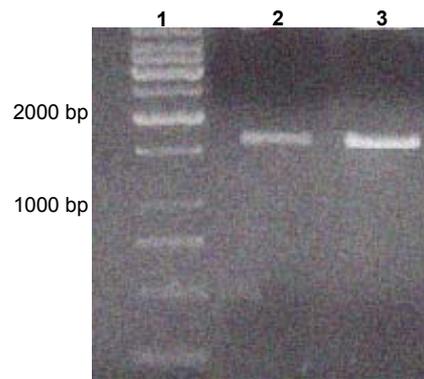


Abb. 4.2: Gelelektrophorese der einzelnen CaN A-Fragmente aus einem gereinigten PCR-Ansatz

Die durch PCR amplifizierten DNA-Fragmente von CaN A β und γ wurden anstelle des CaN A α in den pET15b ligiert. Das Agarose-Gel zeigt neben dem DNA-Marker (1) je einen gereinigten PCR-Ansatz von CaN A β (2- 1575 bp) und γ (3- 1509 bp).

Von Mäusen und Ratten ist bereits bekannt, dass die γ -Isoform des CaN A nur in Kombination mit der regulatorischen Untereinheit CaN B2 zu finden ist. Beim humanen CaN A γ ist allerdings bislang unbekannt, ob CaN B1 oder CaN B2 die regulatorische Untereinheit darstellt. Deshalb wurde zusätzlich das CaN B2 mit einer N-terminalen Shine/Dalgarno-Sequenz kloniert und über die Schnittstellen *XhoI* und *BamHI* anstelle des CaN B1 in den pET15b Vektor eingefügt. Zuvor musste jedoch erst durch eine Mutagenese eine zusätzliche *XhoI*-Schnittstelle zwischen der Shine/Dalgarno-Sequenz und CaN B1 entfernt werden (siehe 3.1.10; 3.2.1.2). Alle positiven Klone wurden zur eindeutigen Identifizierung durch die Firma MWG Biotech sequenziert.

4.1.2 Expression und Reinigung

Die Expression und Reinigung des CaN A α /CaN B1 war bereits durch Mondragon *et al.* beschrieben und wurde in Anlehnung an dieses Protokoll durchgeführt (Mondragon *et al.*, 1997).

Die Überexpression des CaN A α /CaN B1 erfolgte zusammen mit der N-Myristyltransferase aus *S. cerevisiae* in *E. coli* BL21(DE3)-Zellen mit 1 mM IPTG und 0,2 mM Myristinsäure bei 37°C. Die anschließende Reinigung erfolgte wie in Material und Methoden beschrieben durch eine Protamin- und Ammoniumsulfatfällung sowie über eine Ni²⁺-NTA- und eine CaM-Affinitätschromatographie (Abb. 4.3). Die sauberen und im pNPP-Test aktiven Fraktionen wurden vereinigt, mit 10 % Glycerin versetzt, aliquotiert, im flüssigen Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert. Die Proteinausbeute lag bei 5 mg aus einer 6 l-Kultur.

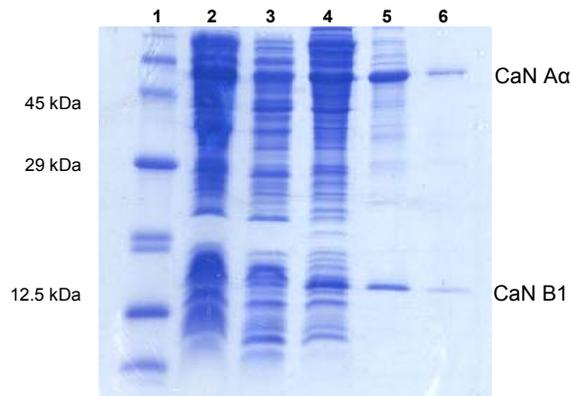


Abb. 4.3: Überexpression in *E. coli* und Reinigung des CaN A α /CaN B1

Das 15 %ige Coomassie-gefärbte SDS-Polyacrylamid-Gel zeigt neben dem Marker (1) den Überstand des Zelllysates nach der Überexpression des CaN A α /CaN B1 (2) im Anschluss an die French Press und die Ultrazentrifugation. Das Lysat wurde zuerst mit Protaminsulfat gefällt (3) gefolgt von einer Ammoniumsulfat-Fällung (4). Das daraus resultierende Pellet wurde in Puffer B aufgenommen und das CaN A α /CaN B1 wurde mittels Ni²⁺-NTA- (5) und CaM-Affinitätschromatographie-Säule gereinigt (6).

Besonders bei CaN A β /CaN B1 sowie CaN A γ /CaN B1 war der Anteil an *inclusion bodies* nach der Expression der Proteine sehr hoch. Zur Verbesserung der löslichen Proteinexpression von CaN A β /CaN B1 wurden das Tandemexpressionskonstrukt im pET15b-Vektor sowie das pBB131-Konstrukt, welches die *N*-Myristyltransferase kodiert, in *E. coli* BL21(DE3)pLysE-Zellen transformiert.

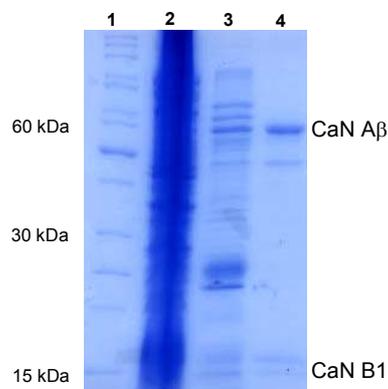


Abb. 4.4: Überexpression in *E. coli* und Reinigung des CaN A β /CaN B1

Das 15 %ige Coomassie-gefärbte SDS-Polyacrylamid-Gel zeigt neben dem Marker (1) das Zelllysate nach der Überexpression von CaN A β /CaN B1 (2). CaN A β /CaN B1 wurde mittels einer Ni²⁺-NTA- (3) und einer CaM-Affinitätschromatographie gereinigt (4).

Eine weitere Steigerung der löslichen Expression erfolgte durch Erniedrigung der Expressionstemperatur auf 30°C. Dafür wurde die Zeit der Expression von 3 h auf 4,5 h erhöht. Aufgrund der hohen Verluste an Protein bei der Protamin- und Ammoniumsulfatfällung wurde der Überstand der Ultrazentrifugation im Anschluss an die French Press direkt auf die Ni²⁺-NTA-Säule aufgetragen, gefolgt von der CaM-Sepharose-Affinitätschromatographie (Abb. 4.4). Die sauberen und im pNPP-Test aktiven Fraktionen

wurden vereinigt, mit 10 % Glycerin versetzt, aliquotiert, im flüssigen Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert. Aus einer 6 l-Kultur konnten 2,5 mg Protein gereinigt werden.

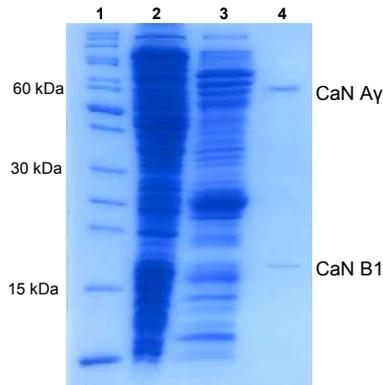


Abb. 4.5: Überexpression in *E. coli* und Reinigung des CaN A γ /CaN B1

Das 15 %ige Coomassie-gefärbte SDS-Polyacrylamid-Gel zeigt neben dem Marker (1) das Zelllysate nach der Überexpression von CaN A γ /CaN B1 (2). CaN A γ /CaN B1 wurde mittels einer Ni^{2+} -NTA- (3) und einer CaM-Affinitätschromatographie gereinigt (4).

Die Überexpressionen von CaN A γ /CaN B1 und CaN A γ /CaN B2 mit der *N*-Myristyltransferase erfolgten ebenfalls in *E. coli* BL21(DE3)pLysE-Zellen. Die höchste Expressionsrate von CaN A γ /CaN B1 wurde bei einer Temperatur von 20°C erhalten. Die Reinigung erfolgte analog des CaN A β /CaN B1 (Abb. 4.5). Die sauberen und im pNPP-Test aktiven Fraktionen wurden vereinigt, mit 10 % Glycerin versetzt, aliquotiert, im flüssigen Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert. Die Proteinausbeute lag bei ca. 0,5 mg aus einer 6 l-Kultur.

Das Prinzip der CaN-Reinigung durch die CaM-Sepharose-Affinitätschromatographie beruht auf der Bindung der katalytischen Untereinheit an CaM, während die regulatorische Untereinheit durch die Bindung an CaN A co-gereinigt wird. Im Fall des CaN A γ /CaN B2 war eine Co-Reinigung unter keiner der getesteten Varianten möglich. Somit kann davon ausgegangen werden, dass das humane CaN A γ wahrscheinlich nur mit der regulatorischen Untereinheit CaN B1 eine funktionelle Phosphatase bilden kann. Damit wurden erstmals alle drei CaN-Isoformen rekombinant hergestellt, so dass sie untereinander funktional verglichen werden konnten.

4.2 Charakterisierung der humanen CaN-Isoformen

Nach der rekombinanten Herstellung der drei heterodimeren CaN-Isoformen sollten die Isoformen hinsichtlich ihrer Faltung, zellulären Verteilung sowie enzymatischen Eigenschaften vergleichend charakterisiert werden, um somit weitere Hinweise auf deren physiologische Funktionen zu erhalten.

4.2.1 Strukturuntersuchungen mittels CD-Spektroskopie

Um Aussagen über eine korrekte Faltung und den Strukturgehalt der gereinigten rekombinanten CaN-Isoformen machen zu können, wurden Fern-UV-CD-Spektren aufgenommen.

Dazu wurden 2 μM CaN $\text{A}\alpha/\text{B1}$ oder CaN $\text{A}\beta/\text{CaN B1}$ sowie 1 μM CaN $\text{A}\gamma/\text{CaN B1}$ in 25 mM Tris/HCl pH 7,4; 3 mM MgSO_4 ; 1 mM EGTA; 0,5 mM DTT bei 20°C vermessen. Leider war das Umpuffern der Proteinlösungen in einen für die CD-Spektroskopie besser geeigneten Puffer, wie zum Beispiel in 10 mM Phosphatpuffer aufgrund der Instabilität des CaN nicht möglich. Das entsprechende Pufferspektrum wurde von den Proteinspektren subtrahiert und die molaren Elliptizitäten berechnet (Abb. 4.6).

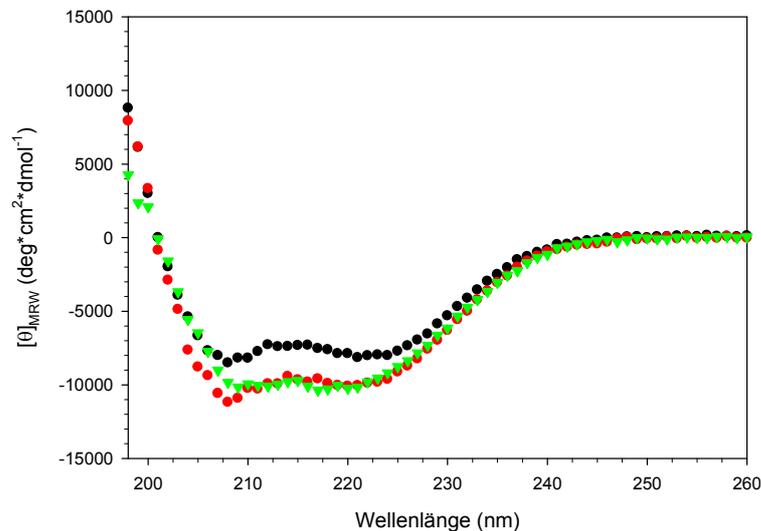


Abb. 4.6: Fern-UV-CD-Spektren der gereinigten CaN-Isoformen

Die CD-Messungen erfolgten in 25 mM Tris/HCl pH 7,4; 3 mM MgSO_4 ; 1 mM EGTA bei 20°C mit 2 μM CaN $\text{A}\alpha/\text{CaN B1}$ (●) und CaN $\text{A}\beta/\text{CaN B1}$ (●) sowie 1 μM CaN $\text{A}\gamma/\text{CaN B1}$ (▼). Die Spektren wurden im Fern-UV-Bereich bei einer Wellenlänge von 195 nm bis 260 nm aufgenommen. Das Pufferspektrum wurde von den Proteinspektren abgezogen und die molaren Elliptizitäten bestimmt.

Die Spektren aller drei CaN-Isoformen weisen lokale Minima bei 208 nm und 222 nm auf. Diese Form der CD-Spektren deutet auf einen hohen α -helicalen Gehalt der Proteine hin. Während bei CaN $\text{A}\alpha/\text{CaN B1}$ und CaN $\text{A}\gamma/\text{CaN B1}$ beide Minima in ähnlicher Weise ausgeprägt sind, ist das lokale Minimum des CaN $\text{A}\beta/\text{CaN B1}$ bei 208 nm deutlich stärker ausgebildet.

Des Weiteren wurde die thermische Denaturierung von 4°C bis 95°C gemessen, um die Temperatur-abhängige Stabilität der CaN-Isoformen zu ermitteln. Dabei wurden 2 μM CaN

A α /CaN B1, 2 μ M CaN A β /CaN B1 sowie 1 μ M CaN A γ /CaN B1 in 25 mM Tris/HCl (pH 7,4); 3 mM MgSO₄; 1 mM EGTA; 0,5 mM DTT vermessen.

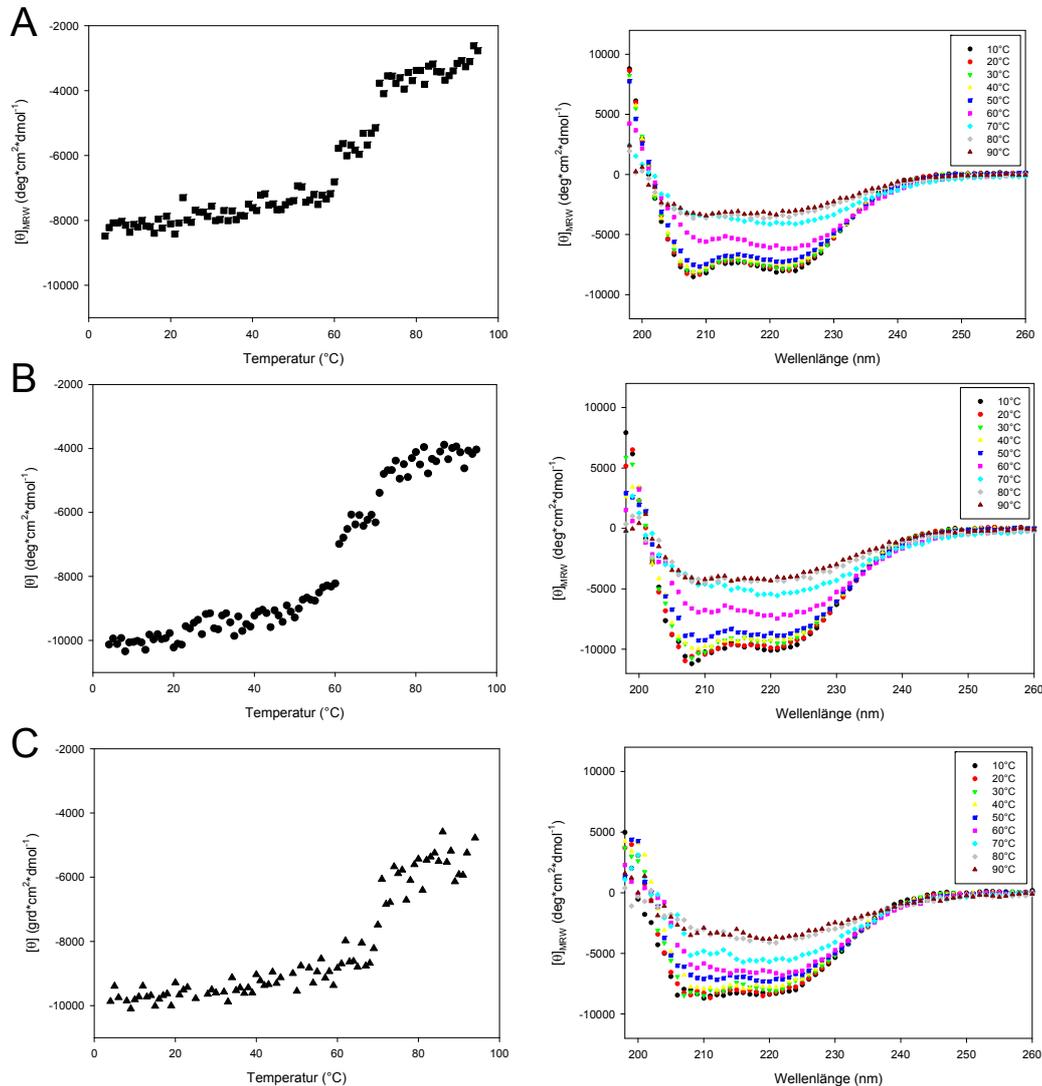


Abb. 4.7: Thermische Denaturierung der CaN-Isoformen

Die thermischen Denaturierungen von CaN A α /CaN B1 (A), CaN A β /CaN B1 (B) sowie CaN A γ /CaN B1 (C) wurden von 4°C bis 95°C aufgenommen. Daraus ergeben sich die Denaturierungskurven, welche links dargestellt sind und bei einer Wellenlänge von 222 nm aufgenommen wurden. Während bei CaN A α /CaN B1 und β zwei deutliche Übergangspunkte bei 60°C und 70°C zu sehen sind, zeigt CaN A γ /CaN B1 nur einen Übergangspunkt bei ca. 70°C.

Im Abstand von 10°C, beginnend bei 10°C bis 90°C wurde jeweils ein Fern-UV-CD-Spektrum gemessen. Alle aufgenommenen Spektren pro Messung sind rechts dargestellt.

Die thermischen Denaturierungskurven bei 222 nm (Abb. 4.7 links) zeigen für CaN A α /CaN B1 (Abb. 4.7 - A) und CaN A β /CaN B1 (Abb. 4.7 - B) zwei Übergangspunkte bei ca. 60°C und 70°C. Vermutlich ergibt sich der erste Punkt durch die Trennung der regulatorischen von der katalytischen Untereinheit, welche mit der Denaturierung letzterer einhergeht. Aus Versuchen mit der regulatorischen Untereinheit allein geht hervor, dass CaN B1 stabiler ist und erst bei 70°C denaturiert. Das CaN A γ /CaN B1 (Abb. 4.7 - C) zeigt lediglich einen unscharfen Übergangspunkt bei ca. 70°C, welcher auf eine größere thermische Stabilität der

γ -Isoform des CaN hinweisen könnte. Zusätzlich zu den Denaturierungskurven wurde aller 10°C jeweils ein Fern-UV-CD-Spektrum aufgenommen (Abb. 4.7 rechts). Mit steigenden Temperaturen konnte bei allen drei Isoformen ein Rückgang der für Proteine mit großem helikalen Anteil typischen Form der zwei Minima bei 208 nm und 222 nm beobachtet werden. Die Kurvenformen ähneln immer mehr der einer *random coiled* Struktur, wobei allerdings die Denaturierungsprozesse bei 90°C des letzten Spektrums noch nicht abgeschlossen sind.

4.2.2 Verteilung der Calcineurin-Isoformen in humanen Zelllinien

Die Expression sowohl in Geweben als auch die physiologischen Funktionen der beiden CaN-Isoformen CaN α und β wurden schon teilweise untersucht. Dabei gibt es widersprüchliche Veröffentlichungen im Hinblick auf ihre subzelluläre Verteilung und der damit verbundenen Funktionen der beiden humanen Isoformen. Einerseits werden beide ubiquitär in allen Geweben exprimiert, andererseits deuten *knock-out*-Experimente mit Mäusen auf unterschiedliche Funktionen von CaN α und β hin. Diese könnten entweder Folge unterschiedlicher Substratspezifitäten sein, oder auf verschiedenen subzellulären Verteilungen beruhen. Zu CaN γ liegen hinsichtlich der Verteilung in Geweben sowie der subzellulären Lokalisierung nur unzureichende Daten vor.

Zuerst wurden deshalb die Verteilungen der CaN A-Isoformen in ausgewählten humanen Zelllinien getestet. Die Zellen wurden lysiert, Zelltrümmer wurden abzentrifugiert und die Proteidlösung auf 1 mg/ml eingestellt. Auf ein SDS-Gel wurden neben einer Kontrolle vom rekombinanten Protein 15 μ l der Zellproteine aufgetragen. Auf einem zweiten Gel erfolgte die Auftragung einer Eichreihe der rekombinanten CaN-Isoformen. Die Gele wurden geblottet und mit anti-CaN α (Epitomics, USA)-, anti-CaN β (Millipore, USA)- oder anti-CaN γ (Santa Cruz, USA)-Antikörper inkubiert. Alle drei Antikörper detektierten sowohl die rekombinant hergestellten Proteine als auch die zellulären CaN-Isoformen spezifisch.

In Abb. 4.8 sind die Verteilungen von CaN α , β und γ in verschiedenen humanen Zelllinien dargestellt. Als Ladekontrolle wurden die Western Blots im Nachhinein mit anti- β -Actin-Antikörper behandelt. Mit Hilfe der Actin-Banden erfolgte eine Normalisierung, so dass mittels der Eichreihe der rekombinanten Proteine die CaN α - (Abb. 4.8 - A), β - (Abb. 4.8 - B) und γ - (Abb. 4.8 - C) Verteilungen in den humanen Zellen quantifiziert werden konnten. Die rekombinanten Proteine, welche als Kontrolle dienten, migrierten im SDS-Gel etwas langsamer, da sie im Gegensatz zu dem zellulären CaN eine His₆-Fusion besitzen.

In Abb. 4.8 ist zu erkennen, dass in fast allen getesteten humanen Zelllinien sowohl CaN α und CaN β als auch CaN γ exprimiert wird. Die Konzentrationen von CaN α und β ähneln sich in den meisten Zelllinien. Während CaN α besonders hoch in den humanen

Gebärmutterschleimhaut-Karzinom-Zellen HeLa exprimiert wird, weist die β -Isoform ihre höchsten Konzentrationen in der Nierenkrebs-Zelllinie HEK 293 auf.

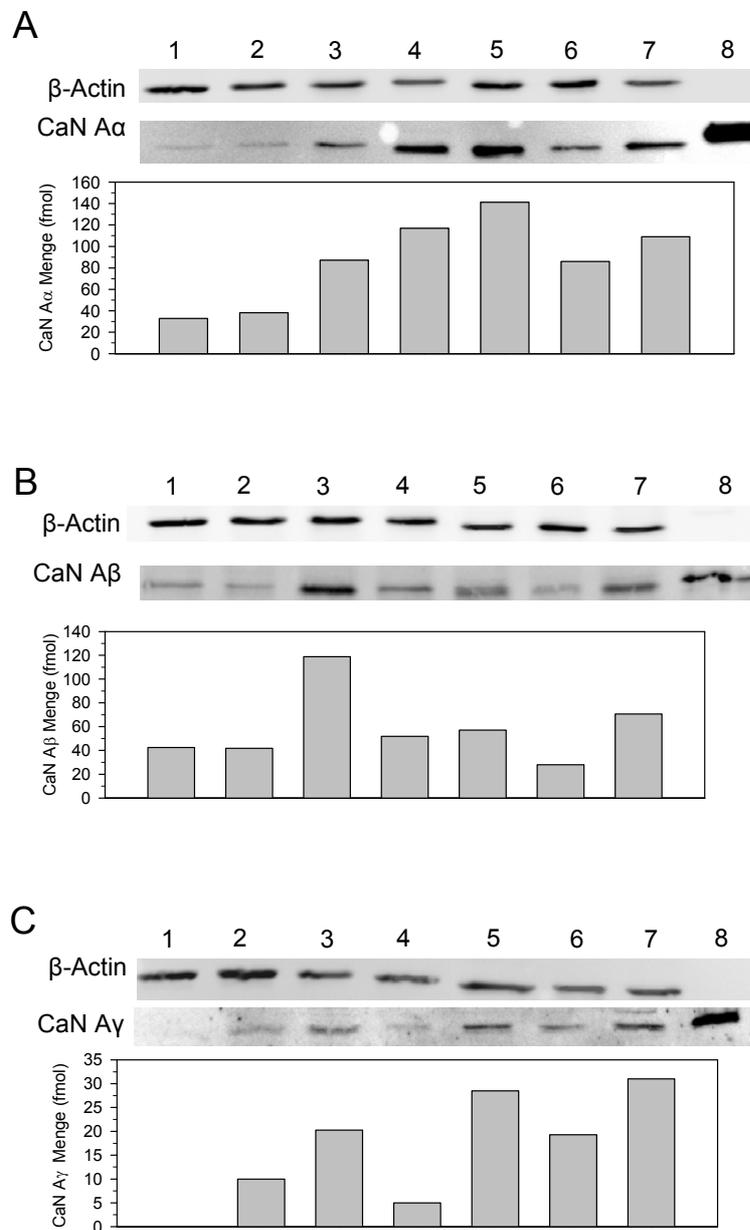


Abb. 4.8: Verteilung der CaN A Isoformen α , β und γ in ausgewählten humanen Zelllinien

Jeweils 15 μ l einer 1 mg/ml Proteinlösung der humanen Zelllinien (**1**- Y 79; **2**- Jurkat; **3**- HEK 293; **4**- SH-SY5Y; **5**- HeLa; **6**- A431; **7**- MCF-7, **8**- 0,5 pmol rekombinantes CaN A α /CaN B1, 0,05 pmol rekombinantes CaN A β /CaN B1 oder 1 pmol rekombinantes CaN A γ /CaN B1) wurden auf ein 15 %iges SDS-Gel aufgetragen. Nach dem Blotten wurden die Membranen entweder mit anti-CaN A α - (**A**), anti-CaN A β - (**B**) oder anti-CaN A γ -Antikörper (**C**) inkubiert, gewaschen, mit dem jeweiligen sekundären Antikörper inkubiert, gewaschen und entwickelt. Danach wurden die Blots gestrippt und mit anti- β -Actin-Antikörper behandelt. Die Blots wurden densitometrisch mittels der Actin-Banden quantifiziert. Mit Hilfe eines zweiten Gels, auf dem verschiedene Konzentrationen der rekombinanten Proteine aufgetragen wurden, konnte die CaN-Konzentration in den Zellen bestimmt werden.

Hauptsächlich in der T-Zelllinie Jurkat, in HEK 293 und Y79-Zellen kommen die CaN A-Isoformen α und β zu gleichen Anteilen vor. In A431-Zellen ist der Expressionsunterschied der CaN A-Isoformen α und β mit einem 3-fach höheren Anteil von CaN A α am deutlichsten. Auch das ursprünglich als Hoden-spezifisch beschriebene CaN A γ wird, außer in Y79-Zellen, in allen anderen getesteten Zelllinien exprimiert. Im Vergleich zu den anderen Isoformen sind die ermittelten Konzentrationen allerdings geringer. Die höchste CaN A γ -Expression mit je ca. 30 fmol wurde in MCF-7- und HeLa-Zellen bestimmt.

Da alle drei CaN-Isoformen sehr homolog sind, wurde die Spezifität der Antikörper für ihre jeweilige Isoform kontrolliert. Dafür wurden alle drei CaN-Isoformen auf ein SDS-Gel aufgetragen, geblottet und mit den zu testenden Antikörpern inkubiert. Abb. 4.9 zeigt, dass alle drei Antikörper sehr spezifisch ihre jeweilige Isoform erkennen.

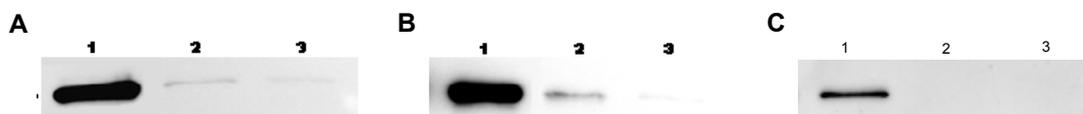


Abb. 4.9: Spezifität der verwendeten Antikörper gegenüber CaN A α , β und γ

Die Western Blots zeigen die Spezifität der CaN Antikörper, mit denen die Zellkonzentrationen von CaN A α , β und γ bestimmt wurden. Blot **A** wurde mit anti-CaN A α -Antikörper behandelt (1- 0,5 pmol CaN A α /CaN B1, 2- 1 pmol CaN A β /CaN B1, 3- 1 pmol CaN A γ /CaN B1). Blot **B** wurde mit anti-CaN A β inkubiert (1- 0,5 pmol CaN A β /CaN B1, 2- 1 pmol CaN A α /CaN B1, 3- 1 pmol CaN A γ /CaN B1). **C** zeigt die Spezifität des anti-CaN A γ -Antikörpers (1- 1 pmol CaN A γ /CaN B1, 2- 1 pmol CaN A α /CaN B1, 3- 1 pmol CaN A β /CaN B1).

Trotz ähnlicher zellulärer Verteilung der CaN A-Isoformen α und β ist bisher ungeklärt, wodurch ihre unterschiedlichen Funktionen vermittelt werden. Um zu untersuchen, ob die verschiedenen zellulären Funktionen der beiden CaN-Isoformen durch ihre subzelluläre Verteilung verursacht werden, wurden die CaN A-Isoformen α , β und γ in den pmaxFP-Red-C Vektor kloniert und dadurch mit einem rot-fluoreszierenden Protein fusioniert. Die Plasmide wurden in die SH-SY5Y Neuroblastoma-Zelllinie transfiziert und die Rotfluoreszenz mittels eines konfokalen *Laser-scanning* Mikroskops analysiert. Zusätzlich wurden die Zellkerne mit DAPI gefärbt.

Die Abb. 4.10 zeigt, dass Zellen, die zur Kontrolle mit dem leeren pmaxFP-Red-C Vektor transfiziert wurden über die gesamte Zelle verteilt rot fluoreszieren. Im Gegensatz dazu sind alle drei CaN A-Isoformen vorwiegend cytoplasmatisch lokalisiert. Die Ergebnisse zeigen, dass obwohl CaN A α und β in humanen Zelllinien in ähnlichen Konzentrationen vorliegen, auch die subzelluläre Verteilung gleich ist.

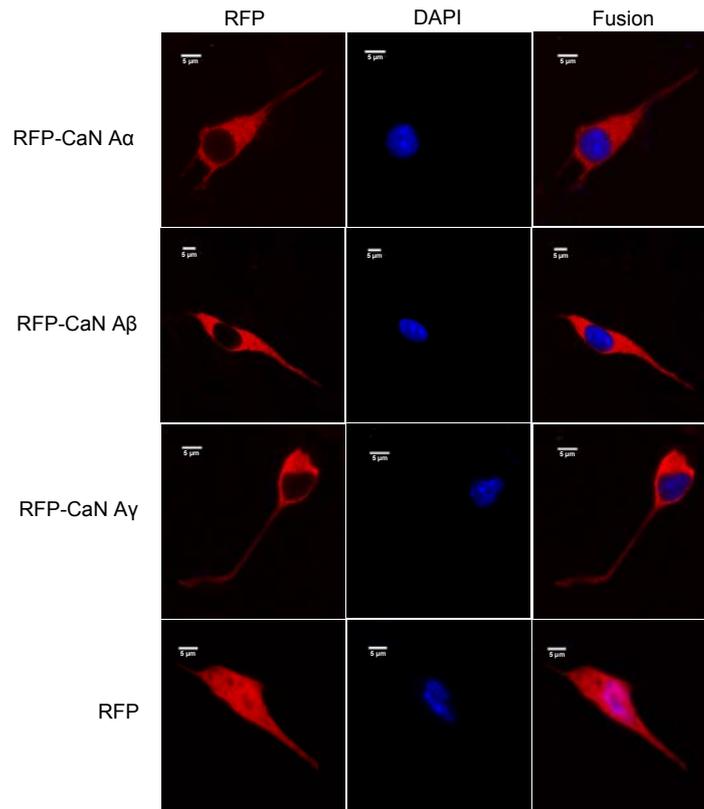


Abb. 4.10: Subzelluläre Verteilung der CaN A-Isoformen

Die CaN A-Isoformen wurden in den pmaxFP-Red-C Vektor mit einem *N*-terminalen rot-fluoreszierenden Protein (RFP) kloniert und in SH-SY5Y-Zellen transfiziert. Die rote Fluoreszenz, sowie die DAPI-Zellkernfärbung wurden im konfokalen *Laser-scanning* Mikroskop analysiert. Als Kontrolle diente der leere Vektor.

4.2.3 Enzymkinetischer Vergleich der CaN-Isoformen

Aufgrund der ubiquitären Expression der CaN A-Isoformen in den getesteten Zellen sowie einer gleichen subzellulären Verteilung lässt sich nicht ableiten, wodurch die unterschiedlichen Funktionen insbesondere von CaN A α und β bestimmt werden. Möglicherweise besitzen die Isoformen unterschiedliche Substratspezifitäten, welche im Folgenden analysiert werden sollen. Zudem ist es erstmals möglich, neben den rekombinanten CaN-Isoformen α und β auch die γ -Isoform zu charakterisieren und mit den anderen Formen zu vergleichen.

Es ist bereits eine Vielzahl von CaN-Substraten bekannt. Die Substrate pNPP, Casein und RII werden in Standardtests für CaN-Aktivitätsmessungen verwendet. Während jedoch das pNPP ein in der Natur nicht vorkommendes, artifizielles, unspezifisches Phosphatase-Substrat darstellt, sind die kinetischen Konstanten, welche mit dem RII-Peptid gemessen wurden, vergleichbar mit denen der RII-Untereinheit der PKA (Blumenthal et al., 1986). Damit können mit Hilfe des RII-Peptids Aussagen über die Funktion des CaN *in vivo*

getroffen werden. Casein wird als Proteinsubstrat zum Vergleich von Phosphatase-Aktivitäten genutzt, ist aber für CaN ebenfalls unspezifisch. Deshalb wurden neben diesen auch die bekanntesten spezifischen humanen Proteinsubstrate für CaN, wie NFAT, DARPP-32, Elk-1 und Tau verwendet.

4.2.3.1 Charakterisierung der CaN-Aktivität mittels pNPP

Zu Beginn wurden die drei CaN-Isoformen mit dem Substrat pNPP charakterisiert. Als kleines, artifizielles und unspezifisches Substrat für CaN wird es häufig für CaN-Charakterisierungen verwendet, obwohl es gegenüber den Peptid- und Proteinsubstraten nicht nur strukturell einige Besonderheiten aufweist.

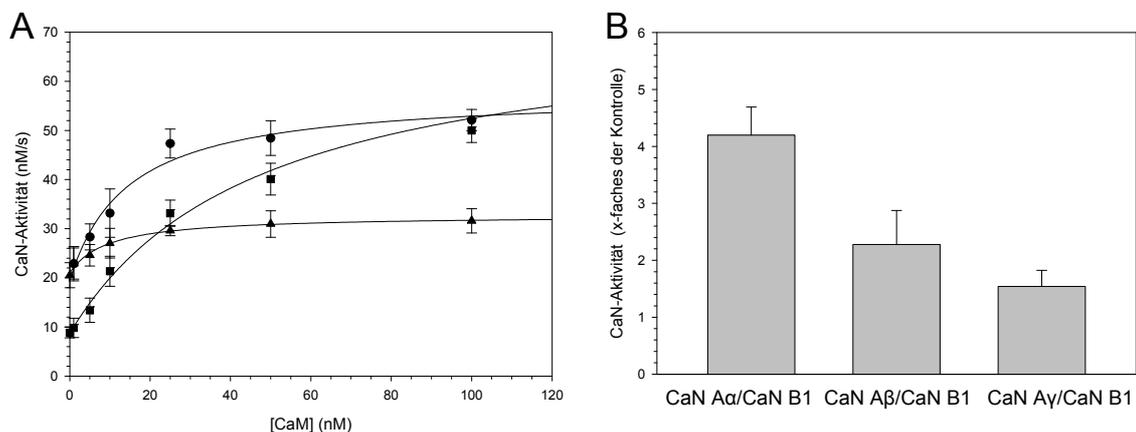


Abb. 4.11: Einfluss von CaM auf die Aktivität der CaN-Isoformen im pNPP-Test

Die Abbildung **A** zeigt den Verlauf der CaM-Abhängigkeit von CaN α /CaN B1 (\blacksquare), CaN β /CaN B1 (\bullet) und CaN γ /CaN B1 (\blacktriangle). In Abbildung **B** ist die höchstmögliche CaM-Aktivierung der CaN-Isoformen im pNPP-Test dargestellt. Die Kontrolle wurde ohne CaM gemessen. Die Werte \pm Standardabweichungen (SD) wurden aus drei voneinander unabhängigen Experimenten ermittelt.

Damit die maximale Aktivität der CaN-Isoformen in den darauf folgenden Messungen garantiert werden konnte, wurden die CaM-Abhängigkeiten der Phosphatasen getestet.

Dafür wurden je 50 nM CaN mit 0-100 nM CaM für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Anfangsanstiege wurden sofort nach Zugabe von 10 mM pNPP in pNPP-Assaypuffer bei 405 nm bestimmt. Die Abb. 4.11 A zeigt den Verlauf der CaN-Aktivität bei steigenden CaM-Konzentrationen. Während CaN β /CaN B1 und CaN γ /CaN B1 eine höhere Grundaktivität im Vergleich zur α -Isoform aufweisen, zeigt Abb. 4.11 B, dass CaN α /CaN B1 durch CaM um das 4-fache aktiviert werden kann. Die CaN-Isoformen β und γ besitzen mit 2,2 und 1,5 eine deutlich niedrigere Aktivierung durch CaM.

Mit Hilfe des pNPP-Tests konnten anschließend die kinetischen Konstanten der CaN-Isoformen ermittelt werden.

Zur Bestimmung der Parameter wurden 40 nM CaN α /CaN B1, CaN β /CaN B1 oder CaN γ /CaN B1 mit 150 nM CaM vorinkubiert und Anfangsanstiege mit 2,5-120 mM pNPP bei 405 nm gemessen.

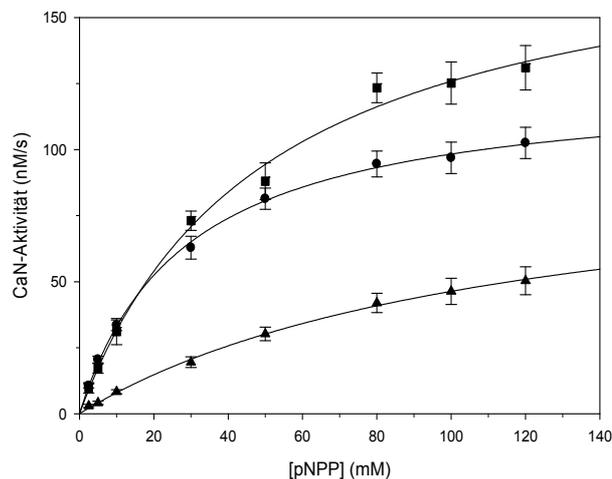


Abb. 4.12: Bestimmung der kinetischen Konstanten der CaN-Isoformen im pNPP-Test

Zur Bestimmung der kinetischen Konstanten mit dem Substrat pNPP wurden die Anfangsgeschwindigkeiten der Dephosphorylierung des pNPP durch CaN α /CaN B1 (■), CaN β /CaN B1 (●) und CaN γ /CaN B1 (▲) gegen die Substratkonzentration aufgetragen. Die dargestellten Werte \pm SD wurden aus drei unabhängigen Versuchen ermittelt. Die kinetischen Konstanten wurden bestimmt und sind in Tabelle 4.1 dargestellt.

Die ermittelten Anfangsanstiege wurden in Geschwindigkeiten der enzymatischen Katalyse umgerechnet und in Abb. 4.12 gegen die pNPP-Konzentration aufgetragen. Daraus ist zu entnehmen, dass die maximale Reaktionsgeschwindigkeit (V_{max}) bei CaN α /CaN B1 mit über 200 nM/s am größten war, während V_{max} für CaN β /CaN B1 und CaN γ /CaN B1 deutlich darunter lagen.

Tab. 4.1: Vergleich der kinetischen Konstanten der CaN-Isoformen im pNPP-Assay

CaN-Isoform	K_m (mM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($M^{-1}s^{-1}$)
CaN α /CaN B1	$39,6 \pm 3,3$	$4,31 \pm 0,4$	$108 \pm 9,1$
CaN β /CaN B1	$33,3 \pm 2,1$	$3,70 \pm 0,2$	$111 \pm 6,5$
CaN γ /CaN B1	$117 \pm 16,5$	$2,23 \pm 0,2$	$18,7 \pm 1,4$

Anhand der Anpassung nach der Michaelis-Menten-Gleichung über eine nicht-lineare Regression konnten die kinetischen Konstanten für die CaN-Isoformen berechnet werden. Der Vergleich der Parameter ist in Tab. 4.1 dargestellt. Die Substrataffinität (K_m) als auch die Wechselzahl (k_{cat}) lagen bei CaN A β /CaN B1 leicht unter den Werten, die für CaN A α /CaN B1 erhalten wurden. Insgesamt waren sich die kinetischen Konstanten für CaN A α /CaN B1 und CaN A β /CaN B1 allerdings sehr ähnlich, demnach besitzen beide Proteine im pNPP-Assay vergleichbare enzymatische Eigenschaften.

Die Substrataffinität ist bei CaN A γ /CaN B1 stark vermindert, was sich in einem sehr hohen K_m -Wert ausdrückt und damit auch eine deutlich geringere katalytische Effizienz (k_{cat}/K_m) von $18,7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ zur Folge hat.

4.2.3.2 Charakterisierung der CaN-Aktivität mittels RII-Peptid

Das ^{33}P -RII-Peptid ist ein 19-mer Peptid und entspricht einem Sequenzabschnitt der regulatorischen Untereinheit der PKA, welche auch *in vivo* ein CaN-Substrat darstellt. Dieser Test wird standardmäßig zur Bestimmung von CaN-Aktivitäten eingesetzt und ermöglicht einen hohen Durchsatz mit sehr guter Reproduzierbarkeit bei sehr geringem Substanzverbrauch.

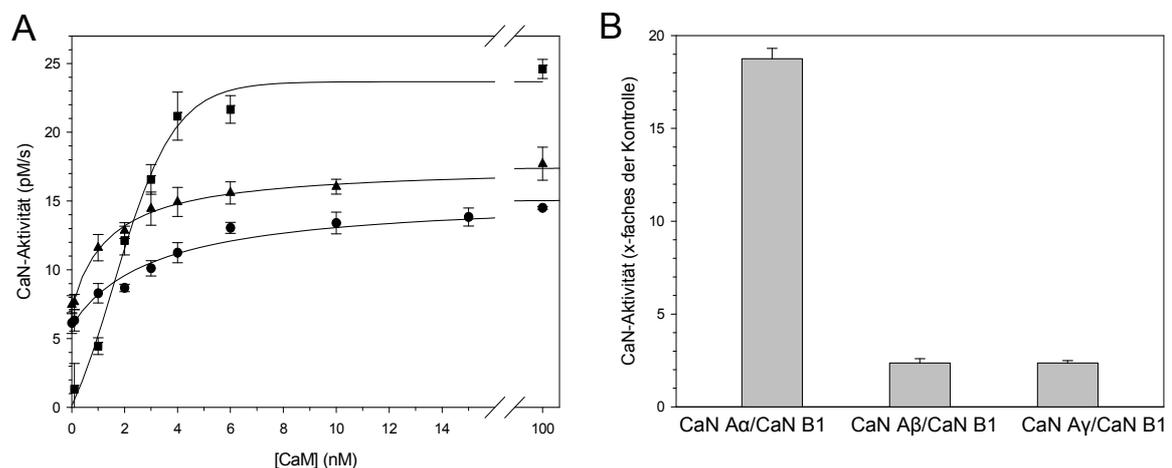


Abb. 4.13: CaM-Abhängigkeit der CaN-Isoformen im RII-Test

Die Abbildung **A** zeigt den Verlauf der CaM-Abhängigkeit von CaN A α /CaN B1 (■), CaN A β /CaN B1 (●) und CaN A γ /CaN B1 (▲).

In Abbildung **B** ist die höchstmögliche CaM-Aktivierung der CaN-Isoformen im RII-Test dargestellt. Die Kontrollwerte wurden ohne CaM gemessen. Die Werte setzen sich aus drei unabhängigen Messungen \pm SD zusammen.

Zu Beginn der Charakterisierungsstudien wurden die CaN-Aktivitäten in Abhängigkeit von der CaM-Konzentration untersucht. Dazu wurden je 15 nM CaN A α /CaN B1 und CaN A β /CaN B1 beziehungsweise 15 nM CaN A γ /CaN B1 mit 0-100 nM CaM vorinkubiert. Nach

Zugabe von 100 pmol ^{33}P -RII-Peptid wurde der Ansatz 40 min bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden 90 µl des Ansatzes in eine Szintillationsmikrotiterplatte überführt und erneut für 20 min bei RT inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit 150 µl H₂O wurde die gebundene Radioaktivität mit einem MicroBeta Top-Counter gemessen.

CaN A α /CaN B1 weist im RII-Test nur eine niedrige Basalaktivität auf. Erst durch Zugabe von CaM konnte die Aktivität um das 18-fache der Kontrolle auf bis zu 24 pmol/s gesteigert werden (Abb. 4.13). Wiederum zeigen CaN A β /CaN B1 und CaN A γ /CaN B1 höhere Grundaktivitäten ohne CaM im Vergleich zur α -Isoform. Die maximale Aktivierung ist bei beiden mit einem Faktor von 2,5 jedoch deutlich niedriger als bei CaN A α /CaN B1.

Mit Hilfe des RII-Peptids wurden im Folgenden die kinetischen Konstanten der drei humanen CaN-Isoformen bestimmt. Die Messungen der Parameter im RII-Test erfolgten mit 15 nM CaN A α /CaN B1, CaN A β /CaN B1 oder CaN A γ /CaN B1 in Anwesenheit von 150 nM CaM. Nach Zugabe von 0-30 µM RII-Peptid wurde der Ansatz für 1 h bei 30°C inkubiert. 90 µl der Lösung wurden für 20 min in eine Scintillations-Platte pipettiert und danach die Dephosphorylierung gemessen.

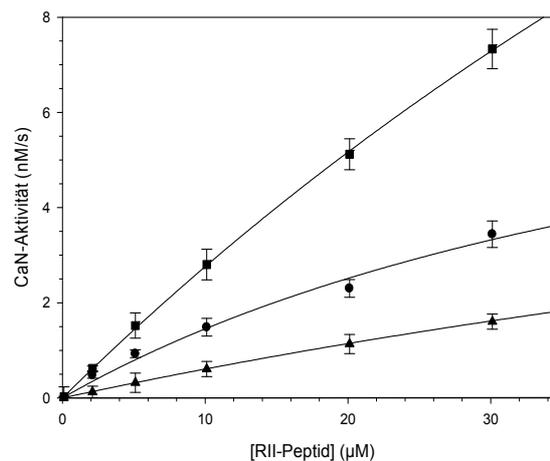


Abb. 4.14: Bestimmung der kinetischen Konstanten der CaN-Isoformen im RII-Test

Zur Bestimmung der kinetischen Konstanten im RII-Test wurden die Anfangsgeschwindigkeiten der Dephosphorylierung des RII-Peptid durch CaN A α /CaN B1 (■), CaN A β /CaN B1 (●) und CaN A γ /CaN B1 (▲) gegen die Substratkonzentration aufgetragen. Die dargestellten Werte \pm SD wurden aus drei voneinander unabhängigen Experimenten ermittelt. Die kinetischen Konstanten wurden bestimmt und sind in Tabelle 4.2 dargestellt.

Abb. 4.14 stellt die Auftragung der Anfangsgeschwindigkeiten der Dephosphorylierung gegen die Substratkonzentrationen dar. Die Geschwindigkeit der enzymatischen Katalyse des CaN A α /CaN B1 ist erneut höher, im Vergleich zur β - und γ -Isoform.

Zur Bestimmung der kinetischen Konstanten wurde eine nicht-lineare Regression nach der Michaelis-Menten-Gleichung durchgeführt. Die Werte wurden durch die Lineweaver-Burk-

Auftragung überprüft. Beide Arten der Auswertung der Messdaten ergaben vergleichbare Werte. In der Tab. 4.2 sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Messungen aufgeführt.

Der K_m -Wert des CaN A β /CaN B1 ist mit 16,7 μM deutlich niedriger als für die α - oder γ -Isoform mit 136 μM beziehungsweise 246 μM . Damit ist die Substrataffinität der γ -Isoform im Vergleich zu CaN A β /CaN B1 für das RII-Peptid 12-mal geringer. Das hat auch Auswirkungen auf die katalytische Effizienz für CaN A γ /CaN B1, welche lediglich bei 3,55 $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ liegt.

Tab. 4.2: Vergleich der kinetischen Konstanten der CaN-Isoformen im RII-Test

CaN-Isoform	K_m (μM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$)
CaN A α /CaN B1	136 \pm 8,40	2,76 \pm 0,72	19,7 \pm 1,87
CaN A β /CaN B1	16,7 \pm 1,31	0,36 \pm 0,02	18,0 \pm 1,16
CaN A γ /CaN B1	246 \pm 10,5	0,87 \pm 0,06	3,55 \pm 2,60

Die Wechselzahl unterscheidet sich ebenfalls zwischen den CaN-Isoformen. CaN A α /CaN B1 besitzt mit 2,8 s^{-1} eine 9-mal höhere Wechselzahl als CaN A β /CaN B und im Vergleich zu CaN A γ /CaN B1 ist sie noch 3-mal höher. Obwohl sich die Substrataffinitäten als auch die Geschwindigkeiten der enzymatischen Reaktionen des CaN A α /CaN B1 und CaN A β /CaN B deutlich unterscheiden, sind die katalytische Effizienzen der beiden Isoformen mit 20 und 18 $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ vergleichbar (Tab. 4.2)

4.2.3.3 Charakterisierung der CaN-Aktivität mittels Proteinsubstraten

Zur weiteren Analyse der Substratspezifitäten der drei humanen CaN-Isoformen wurden neben den häufig verwendeten CaN-Substraten pNPP und RII auch Proteinsubstrate getestet. Mögliche Unterschiede in der Substratspezifität können weitere Einblicke in die physiologischen Funktionen der CaN-Isoformen geben.

Casein stellt wahrscheinlich ein unspezifisches Phosphatasesubstrat dar. Es wurde allerdings bereits häufig für Studien zur CaN-Charakterisierung verwendet. NFAT ist ein hochspezifisches CaN-Substrat, dessen physiologische Bedeutung unter anderem als Transkriptionsfaktor zur T-Zell-Aktivierung im Immunsystem sehr gut untersucht wurde. Elk-1 ist ebenfalls ein Transkriptionsfaktor. Als Stimulator der c-fos-Expression wird er durch die CaN-katalysierte Dephosphorylierung des Serin 383 negativ reguliert. Im Gehirn ist die CaN-

Konzentration besonders hoch. Deshalb wurden auch Substrate aus diesem Bereich getestet. DARPP-32 wird von CaN spezifisch am Threonin 34 dephosphoryliert. Phosphoryliertes DARPP-32 inhibiert die Proteinphosphatase 1, welche wiederum Ca^{2+} - und Na^+ -Kanäle, sowie Na^+/K^+ -ATPasen im Nervensystem reguliert.

Auch das Mikrotubuli-assoziierte Protein Tau, welches in großen Mengen im Hirn vorkommt, wurde als CaN-Substrat beschrieben. Es wird durch sehr viele verschiedene Kinasen phosphoryliert und ist damit auch ein Substrat für viele Phosphatasen. Unter anderem reguliert auch CaN den Phosphorylierungs-Zustand des Tau-Proteins, welches verantwortlich ist für die Stabilität des Cytoskeletts in Neuronen und die Axonentwicklung.

Für alle Proteinsubstrate wurden nachfolgend die kinetischen Parameter bestimmt. Die Phosphorylierung des Caseins erfolgte durch die PKA in Gegenwart von $[\gamma\text{-}^{33}\text{P}]\text{-ATP}$. Zur Bestimmung der kinetischen Konstanten der CaN-Isoformen für Casein wurden 170 nM CaN und 200 nM CaM mit 0-400 nM Casein bei 30°C für 2,5-80 min inkubiert. Nach einer Proteinfällung mit 20 % TCA und 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ BSA wurden sowohl Überstand als auch Pellet mit 1,5 ml Scintillator versetzt und in einem MicroBeta Top-Counter vermessen.

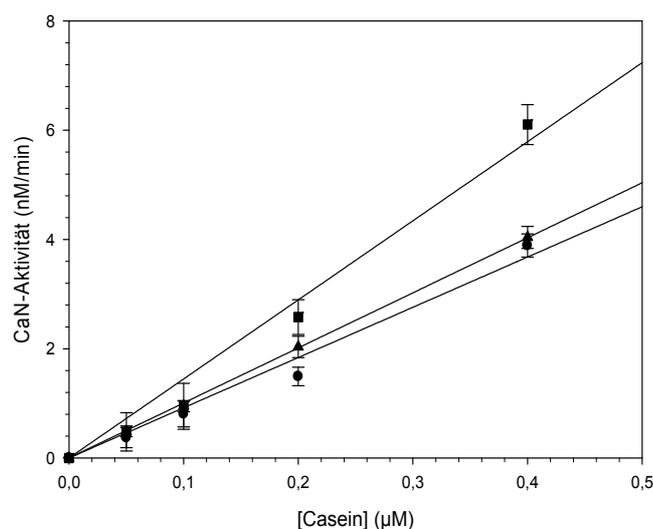


Abb. 4.15: Bestimmung der kinetischen Konstanten für Casein

Zur Bestimmung der kinetischen Konstanten der CaN-Isoformen für Casein wurden die Anfangsgeschwindigkeiten der Dephosphorylierung des Caseins durch CaN A α /CaN B1 (■), CaN A β /CaN B1 (●) und CaN A γ /CaN B1 (▲) gegen die Substratkonzentration aufgetragen. Die Werte ergeben sich aus drei unabhängigen Messungen \pm SD. Die kinetischen Konstanten sind in Tabelle 4.3 dargestellt.

Die höchste Geschwindigkeit der Dephosphorylierung des Caseins wurde durch CaN A α /CaN B1 erreicht, während sich die β - und γ -Isoform in ihrer Reaktionsgeschwindigkeiten ähneln (Abb. 4.15).

Es konnten keine ausreichend hohen Substratkonzentrationen erreicht werden, um in der Nähe des K_m -Wertes für Casein messen zu können. Die k_{cat}/K_m -Werte ergaben sich aus dem Quotienten des Anstiegs (V_{max}/K_m) der Auftragung der CaN-Aktivität gegen die

Substratkonzentrationen und der Enzymkonzentration. Aus Tab. 4.3 sind die ermittelten k_{cat}/K_m -Werte zu entnehmen. Für Casein wurde mit $871 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ der geringste k_{cat}/K_m -Wert durch CaN A β /CaN B1 im Vergleich zu den anderen CaN-Isoformen ermittelt. CaN A α /CaN B1 und CaN A γ /CaN B1 besitzen mit 1370 beziehungsweise 1210 $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ vergleichbare katalytische Effizienzen.

Tab. 4.3: Vergleich der k_{cat}/K_m -Werte der CaN-Isoformen für Casein

CaN-Isoform	$k_{\text{cat}}/K_m \text{ (M}^{-1}\text{s}^{-1}\text{)}$
CaN A α /CaN B1	$1370 \pm 120,5$
CaN A β /CaN B1	$871 \pm 75,1$
CaN A γ /CaN B1	$1210 \pm 94,0$

Das spezifische CaN-Substrat DARPP-32 wurde wie auch *in vivo* mit der PKA phosphoryliert. Die Phosphorylierung an der Position Threonin 34 wurde massenspektrometrisch nachgewiesen. Zur Bestimmung der kinetischen Konstanten der CaN-Isoformen für DARPP-32 wurden je 9 nM CaN und 150 nM CaM mit 0-800 nM DARPP-32 bei 30°C für 5-40 min inkubiert. Nach der Proteinfällung mit 20 % TCA und 150 $\mu\text{g/ml}$ BSA wurden der Überstand und das Pellet mit 1500 μl Scintillator versetzt und gemessen.

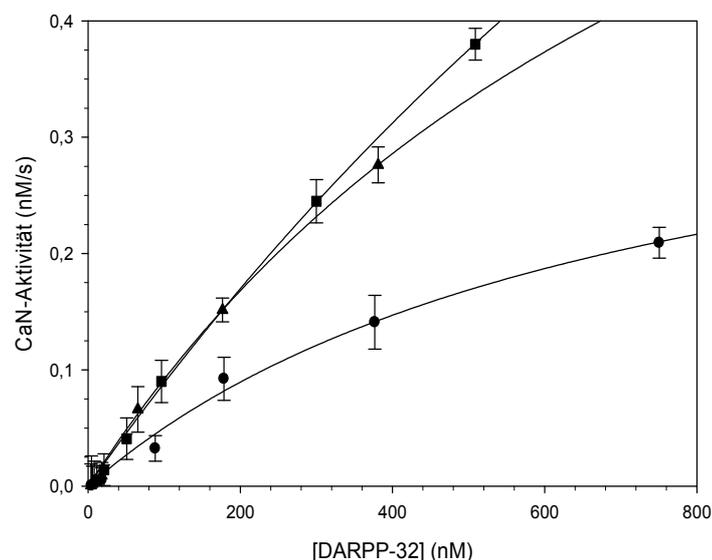


Abb. 4.16: Bestimmung der kinetischen Konstanten für DARPP-32

Zur Bestimmung der kinetischen Konstanten der CaN-Isoformen für DARPP-32 wurden die Anfangsgeschwindigkeiten der Dephosphorylierung des DARPP-32 durch CaN A α /CaN B1 (■), CaN A β /CaN B1 (●) und CaN A γ /CaN B1 (▲) gegen die Substratkonzentration aufgetragen. Die dargestellten Werte setzen sich aus drei unabhängigen Messungen \pm SD zusammen. Die kinetischen Konstanten sind in Tabelle 4.4 dargestellt.

In Abb. 4.16 wurden die Geschwindigkeiten der enzymatischen Katalyse gegen die DARPP-32-Konzentrationen aufgetragen. Zu sehen ist, dass CaN A β /CaN B1 im Vergleich zu den anderen Isoformen das DARPP-32 mit sehr geringer Geschwindigkeit dephosphorylieren konnte. Das spiegelt sich durch die 2-mal niedrigere katalytische Effizienz von $60,3 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ im Vergleich zu den anderen CaN-Isoformen wider. CaN A α /CaN B1 und CaN A γ /CaN B1 besitzen vergleichbare katalytische Effizienzen. Obwohl die Substrataffinität des CaN A β /CaN B1 mit einem K_m von $0,7 \mu\text{M}$ vergleichsweise hoch ist, besitzt diese Isoform eine niedrige Wechselzahl von $0,04 \text{ s}^{-1}$. Die k_{cat}/K_m -Werte des CaN A α /CaN B1 und CaN A γ /CaN B1 sind 5,5- beziehungsweise 2,3-mal höher als für CaN A β /CaN B1.

Tab. 4.4: Vergleich der kinetischen Konstanten der CaN-Isoformen mit DARPP-32

CaN-Isoform	K_m (μM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$)
CaN A α /CaN B1	$2,22 \pm 0,25$	$0,23 \pm 0,01$	$104 \pm 9,61$
CaN A β /CaN B1	$0,70 \pm 0,06$	$0,04 \pm 0,003$	$60,3 \pm 7,36$
CaN A γ /CaN B1	$0,94 \pm 0,07$	$0,13 \pm 0,002$	$108 \pm 8,45$

NFAT kann durch mehrere Proteinkinasen phosphoryliert werden, deren Phosphorylierungsstellen Substrate für CaN darstellen. Deshalb erfolgte die NFAT-Phosphorylierung mit der PKA und der GSK-3 β .

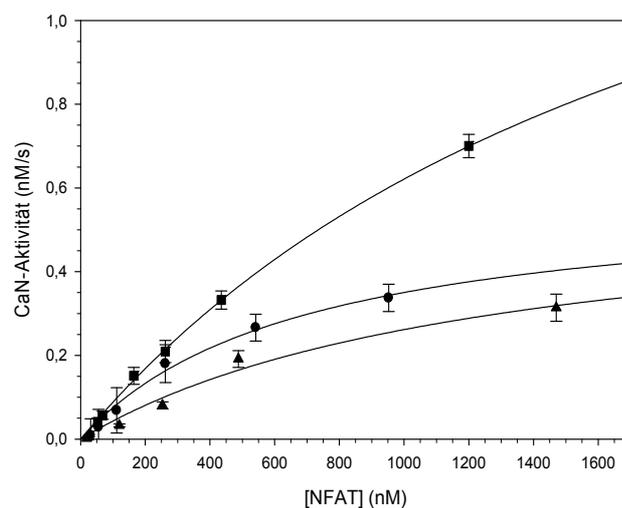


Abb. 4.17: Bestimmung der kinetischen Konstanten für NFAT

Zur Bestimmung der kinetischen Konstanten der CaN-Isoformen für NFAT wurden die Anfangsgeschwindigkeiten der Dephosphorylierung des NFAT durch CaN A α /CaN B1 (\blacksquare), CaN A β /CaN B1 (\bullet) und CaN A γ /CaN B1 (\blacktriangle) gegen die Substratkonzentration aufgetragen. Die dargestellten Werte \pm SD wurden aus drei voneinander unabhängigen Experimenten ermittelt. Die kinetischen Konstanten sind in Tabelle 4.5 dargestellt.

Zur Bestimmung der kinetischen Konstanten der CaN-Isoformen für NFAT wurden je 9 nM CaN und 150 nM CaM mit 0-1500 nM ^{33}P -markiertem NFAT bei 30°C für 3-60 min inkubiert. Nach der Proteinfällung mit 20 % TCA und 150 µg/ml BSA wurden Überstand und Pellet mit 1500 µl Scintillator versetzt und gemessen.

Die erhaltenen Messwerte wurden ausgewertet und als hyperbole Kurven in Abb. 4.17 dargestellt. Zusätzlich erfolgte eine Auswertung mit der Lineweaver-Burk Methode zum Verifizieren der Ergebnisse. Die kinetischen Konstanten sind in Tab. 4.5 dargestellt.

Erneut ist der K_m -Wert für CaN A β /CaN B1 von 0,69 µM besonders klein im Gegensatz zu 2 µM bei CaN A α /CaN B1 und 1,27 µM bei CaN A γ /CaN B1. Die katalytische Effizienz von CaN A α /CaN B1 ist dennoch größer als bei CaN A β /CaN B1. CaN A γ /CaN B1 besitzt durch seine geringe Wechselzahl auch wiederum den kleinsten k_{cat}/K_m -Wert.

Tab. 4.5: Vergleich der kinetischen Konstanten der CaN-Isoformen mit NFAT

CaN-Isoform	K_m (µM)	k_{cat} (s $^{-1}$)	k_{cat}/K_m (mM $^{-1}$ s $^{-1}$)
CaN A α /CaN B1	2,04 ± 0,23	0,11 ± 0,01	55,1 ± 4,30
CaN A β /CaN B1	0,69 ± 0,07	0,04 ± 0,004	52,1 ± 4,54
CaN A γ /CaN B1	1,27 ± 0,19	0,02 ± 0,001	15,7 ± 1,60

Um zu überprüfen, ob die *in vitro* gemessenen Substratpräferenzen *in vivo* von Relevanz sind, wurde der Beitrag der verschiedenen CaN-Isoformen auf die Dephosphorylierung des NFAT im zellulären System bestimmt. Dazu wurden SH-SY5Y-Zellen mit den RFP-CaN-Konstrukten und einem NFAT-Luciferase Reporter Plasmid transfiziert. 12 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit 2 µM Ionomycin und 100 nM PMA für 4 h inkubiert. Es folgte die Lyse der Zellen in 100 µl Reporter-Gen-Lyse-Puffer und ein Ultraschallaufschluß der Zellen. Jeweils 20 µl des Überstandes wurden mit 100 µl Reporter-Gen-Assay-Substrat im Luminescence Counter gemessen. Die Menge an überexprimierten RFP-CaN-Isoformen wurde mittels Western Blot mit Isoform-spezifischen Antikörpern ermittelt (Abb. 4.18 A).

Wie Abb. 4.18 B zeigt, korrespondiert die CaN-abhängige Aktivierung der NFAT-Reporter-Gen-Aktivität mit den *in vitro* gemessenen katalytischen Effizienzen der CaN-Isoformen. Zellen, welche mit CaN A α transfiziert wurden, besitzen die höchste Aktivierung der Luciferase-Aktivität, gefolgt von CaN A β . Im Gegensatz dazu hatte eine zusätzliche Expression von CaN A γ keinen Effekt auf die NFAT-Aktivierung in SH-SY5Y-Zellen.

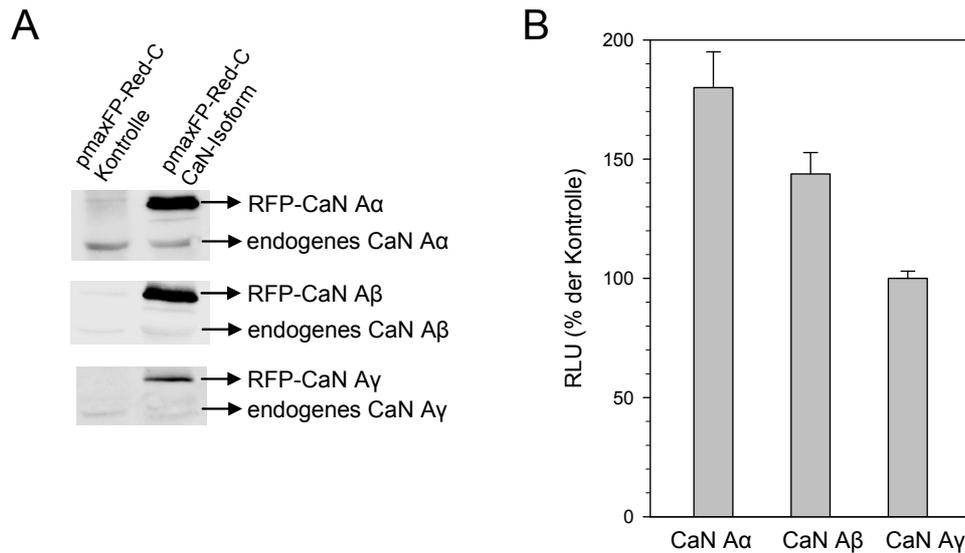


Abb. 4.18: Einfluss der CaN A-Isoformen auf die NFAT Reportergen-Aktivität

SH-SY5Y-Zellen wurden mit den pmaxFP-Red-C-CaN-Konstrukten und dem NFAT-Luciferase Reporter Plasmid transfiziert. Die NFAT Reportergen-Aktivität wurde mittels des Luciferase Assay Systems bestimmt. Die Menge an überexprimierten RFP-CaN-Isoformen wurde mittels Western Blot ermittelt (**A**). Es wurden Isoform-spezifische Antikörper eingesetzt. Die relativen *luminescence units* (RLU) wurden als Prozente der Vektor-Kontrolle angegeben (**B**). Die Werte ergeben sich aus drei unabhängigen Messungen \pm SD.

Der Transkriptionsfaktor Elk-1 wurde an der für CaN spezifischen Stelle Serin 383 durch die Erk-2 phosphoryliert. Die Phosphorylierungsstelle wurde durch Massenspektrometrie bestätigt. Die Dephosphorylierung zur Bestimmung der kinetischen Konstanten der CaN-Isoformen mit Elk-1 erfolgte mit je 30 nM CaN, 150 nM CaM und 0-530 nM ^{33}P -markiertem Elk-1. Der Ansatz wurde bei 30°C für 2-40 min inkubiert. Nach der Proteinfällung mit 20 % TCA und 150 $\mu\text{g/ml}$ BSA und einer sich anschließenden Zentrifugation wurden der Überstand und das Pellet mit 1500 μl Scintillator versetzt und gemessen.

Aus der Abb. 4.19 ist zu erkennen, dass CaN α /CaN β die höchste Reaktionsgeschwindigkeit der Dephosphorylierung des Elk-1 besitzt. Im Vergleich dazu kann CaN γ /CaN β das Elk-1 nur sehr langsam dephosphorylieren. Wie beim Casein, war es auch bei Elk-1 nicht möglich mit ausreichend hohen Substratkonzentrationen zu messen, so dass die K_m - und k_{cat} -Werte einzeln nicht bestimmt werden konnten. Die katalytischen Effizienzen der CaN-Isoformen ergaben sich aus dem Quotienten des Anstiegs (V_{max}/K_m) der Auftragung der Geschwindigkeit gegen die Substratkonzentration und der Enzymkonzentration (Abb. 4.19).

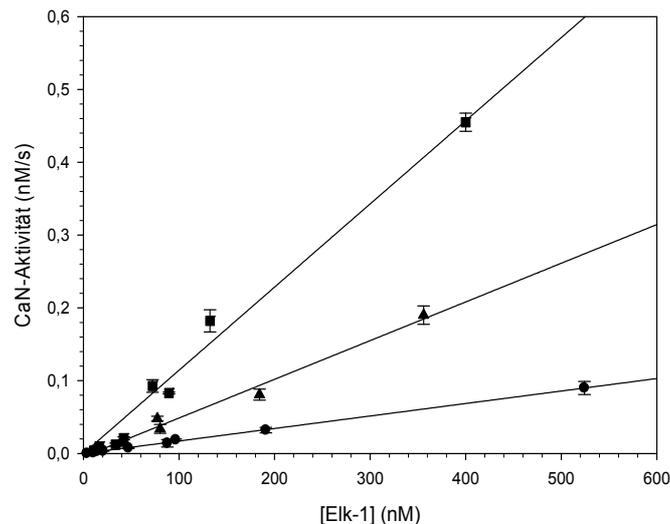


Abb. 4.19: Bestimmung der kinetischen Konstanten für Elk-1

Zur Bestimmung der kinetischen Konstanten der CaN-Isoformen für Elk-1 wurden die Anfangsgeschwindigkeiten der Dephosphorylierung des Elk-1 durch CaN Aα/CaN B1 (■), CaN Aβ/CaN B1 (●) und CaN Aγ/CaN B1 (▲) gegen die Substratkonzentration aufgetragen. Die Werte ergeben sich aus drei unabhängigen Messungen ± SD. Die kinetischen Konstanten sind in Tabelle 4.6 dargestellt.

Für das Substrat Elk-1 besitzt CaN Aα/CaN B1 im Vergleich zu den anderen Isoformen mit einem Wert von $39 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ den höchsten $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ -Wert und ist damit die effizienteste Elk-1-Phosphatase (Tab. 4.6). Dagegen weist CaN Aβ/CaN B1 mit $5,9 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ eine fast 7-mal niedrigere katalytische Effizienz auf. Für die γ-Isoform des CaN wurde ein $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ -Wert von $18,3 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ ermittelt, welcher 2-mal niedriger als der Wert für CaN Aα/CaN B1 beziehungsweise 3-mal höher als der für CaN Aβ/CaN B1 ist.

Tab. 4.6: Vergleich der $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ -Werte der CaN-Isoformen für Elk-1

CaN-Isoform	$k_{\text{cat}}/K_{\text{m}} \text{ (mM}^{-1}\text{s}^{-1}\text{)}$
CaN Aα/CaN B1	$38,9 \pm 2,6$
CaN Aβ/CaN B1	$5,90 \pm 0,4$
CaN Aγ/CaN B1	$18,3 \pm 1,2$

Um den Beitrag der verschiedenen CaN-Isoformen auf die Dephosphorylierung des Elk-1 im zellulären System zu bestimmen, wurde ein Elk-1 Reportergen-Test durchgeführt. Dazu wurden SH-SY5Y-Zellen mit den RFP-CaN-Konstrukten, dem Elk-1 trans-activator Plasmid und dem Luciferase Reporter Plasmid transfiziert. Zur besseren Phosphorylierung des Elk-1 wurde das pFC-MEK1 Plasmid co-transfiziert. 12 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit $2 \mu\text{M}$ Ionomycin für 4h inkubiert. Es folgte die Lyse der Zellen in $100 \mu\text{l}$ Reportergen-Lyse-Puffer und ein Ultraschallaufschluß der Zellen. Jeweils $20 \mu\text{l}$ des Überstandes wurden

mit 100 µl Reporter-Gen-Assay-Substrat im Luminescence Counter gemessen. Die Menge an überexprimierten RFP-CaN-Isoformen wurde mittels Western Blot mit Isoform-spezifischen Antikörpern ermittelt (Abb. 4.20 A).

Wie Abb. 4.20 B zeigt, wurde die Elk-1-Reporter-Gen-Aktivität durch überexprimiertes CaN A α um 50 % inhibiert, während CaN A β die Luciferase-Aktivität nur auf 80 % der Vektor-Kontrolle inhibierte. In Übereinstimmung mit den ermittelten katalytischen Konstanten dephosphorylierte CaN A γ das Elk-1 effizienter als CaN A β , was sich in einer geringeren Luciferase-Aktivität widerspiegelt.

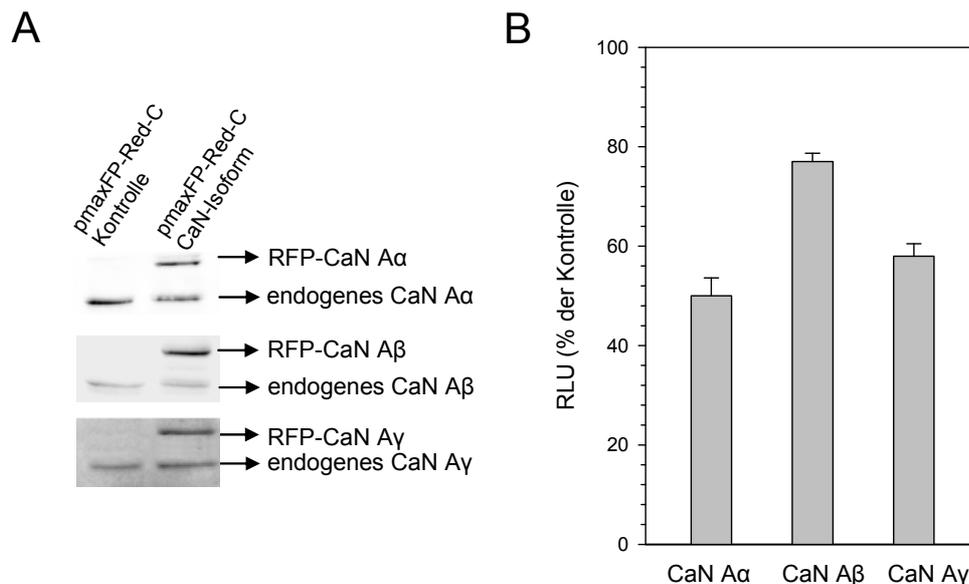


Abb. 4.20: Einfluss der CaN A-Isoformen auf die Elk-1 Reporter-Gen-Aktivität

SH-SY5Y-Zellen wurden mit den pmaxFP-Red-C-CaN-Konstrukten, dem Elk-1 *trans*-aktivator Plasmid und dem Luciferase Reporter Plasmid transfiziert. Die Elk-1 Reporter-Gen-Aktivität wurde durch die zusätzliche Transfektion des pFC-MEK1 Plasmids erhöht. Die Menge an überexprimierten RFP-CaN-Isoformen wurde mittels Western Blot ermittelt (A). Es wurden Isoform-spezifische Antikörper eingesetzt. Die RLU wurden als Prozente der Vektor-Kontrolle angegeben (B). Die Werte ergeben sich aus drei unabhängigen Messungen \pm SD.

Tau wird durch viele Kinasen phosphoryliert und kann durch mehrere Phosphatasen wieder dephosphoryliert werden. Die genauen Dephosphorylierungsstellen für CaN sind bisher noch nicht eindeutig geklärt. Deshalb wurde Tau mit der GSK-3 β -Kinase und der Erk-2-Kinase phosphoryliert. Zur Bestimmung der kinetischen Konstanten der CaN-Isoformen für Tau wurden je 70 nM CaN und 150 nM CaM mit 0-2500 nM Tau bei 30°C für 3-90 min inkubiert. Nach der Proteinfällung mit 20 % TCA und 150 µg/ml BSA wurden Überstand und Pellet mit 1500 µl Scintillator versetzt und in einem β -Counter gemessen (Abb. 4.21).

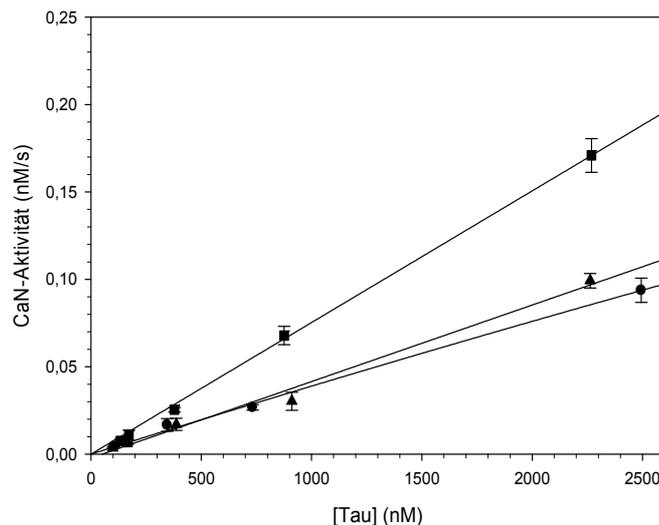


Abb. 4.21: Bestimmung der kinetischen Konstanten für Tau

Zur Bestimmung der kinetischen Konstanten der CaN-Isoformen für Tau wurden die Anfangsgeschwindigkeiten der Dephosphorylierung des Tau durch CaN A α /CaN B1 (■), CaN A β /CaN B1 (●) und CaN A γ /CaN B1 (▲) gegen die Substratkonzentration aufgetragen. Die dargestellten Werte setzen sich aus drei unabhängigen Messungen \pm SD zusammen. Die kinetischen Konstanten sind in Tabelle 4.7 dargestellt.

Wie bereits bei Casein und Elk-1 konnten wiederum nur die k_{cat}/K_m -Werte durch den Quotienten aus dem Anstieg der Auftragung der CaN-Aktivität gegen die Substratkonzentration und der Reaktionsgeschwindigkeiten bestimmt werden, da keine ausreichend hohen Substratkonzentrationen zur Messung in der Nähe der K_m -Werte erreicht wurden. Auch durch andere Methoden der Auswertung, wie der Lineweaver-Burk- oder der Cornish-Bowden-Auftragung war keine zuverlässige Auswertung der K_m - und k_{cat} -Werte möglich.

Tab. 4.7: Vergleich der k_{cat}/K_m -Werte der CaN-Isoformen für Tau

CaN-Isoform	k_{cat}/K_m ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)
CaN A α /CaN B1	$1075 \pm 89,5$
CaN A β /CaN B1	$668 \pm 70,4$
CaN A γ /CaN B1	$605 \pm 53,8$

Aus Tab. 4.7 geht hervor, dass CaN A α /CaN B1 mit dem höchsten k_{cat}/K_m -Wert von $1075 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ Tau am besten dephosphorylieren kann. Die katalytischen Effizienzen von CaN A β /CaN B1 und CaN A γ /CaN B1 sind mit 668 und $605 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ vergleichbar und liegen damit unter dem Wert von CaN A α /CaN B1.

Tab. 4.8: Gegenüberstellung der K_m -Werte der CaN-Isoformen mit unterschiedlichen Substraten

CaN-Isoform	pNPP K_m (μM)	RII K_m (μM)	NFAT K_m (μM)	DARPP-32 K_m (μM)
CaN A α /CaN B1	39600 \pm 3300	136 \pm 8,40	2,04 \pm 0,23	2,22 \pm 0,25
CaN A β /CaN B1	33300 \pm 2100	16,7 \pm 1,31	0,69 \pm 0,07	0,70 \pm 0,06
CaN A γ /CaN B1	117000 \pm 16500	246 \pm 10,5	1,27 \pm 0,19	0,94 \pm 0,07

Ein Überblick zu allen bestimmten K_m -Werten gibt die Tab. 4.8. dargestellt. Hier kann hinsichtlich der Substratbindung festgestellt werden, dass die Proteinsubstrate NFAT und DARPP-32 höhere Affinitäten zu CaN aufweisen als das Peptidsubstrat RII und das artifizielle Substrat pNPP. Die K_m -Werte für CaN A α /CaN B1 sind durchgehend höher als für CaN A β /CaN B1. Im pNPP-Test sind die Substrataffinitäten der beiden Isoformen jedoch vergleichbar, während die Messungen mit Peptid- und Proteinsubstraten für CaN A β /CaN B1 im Vergleich zu CaN A α /CaN B1 8-mal (RII) beziehungsweise 3-mal (NFAT, DARPP-32) niedrigere K_m -Werte aufwiesen. Die Substrataffinität des CaN A γ /CaN B1, im Vergleich zu den anderen CaN-Isoformen, ist für pNPP mit 117000 μM 3-mal niedriger und für das RII-Peptid mit 245 μM 2-mal beziehungsweise 15-mal niedriger. Bei den Proteinsubstraten NFAT und DARPP-32 liegen die K_m -Werte für CaN A γ /CaN B1 zwischen denen für die anderen beiden Isoformen.

Somit zeigen die Messungen der kinetischen Parameter der CaN-Isoformen mit den verschiedenen Substraten, dass CaN A β /CaN B1 für alle Substrate, bei denen eine K_m -Wert-Bestimmung durchgeführt werden konnte, die höchste Substrataffinität aufweist (Tab. 4.8). Da jedoch die katalytischen Domänen der drei CaN A-Isoformen sehr homolog sind, spielen wahrscheinlich sekundäre Bindestelle innerhalb des CaN A β eine Rolle bei der Substratbindung.

4.3 Charakterisierung der CaN A β ²²⁻⁵²⁴/CaN B1-Variante

Ein Aminosäure-Sequenzalignment der humanen CaN A-Isoformen könnte eine Erklärung für die hohe Substrataffinität des CaN A β /CaN B1 liefern. Die Bereiche der funktionellen Domänen und Binderegionen sind sehr homolog, während sich Unterschiede vor allem in den Bereichen zwischen den Domänen sowie den *N*- und *C*-terminalen Bereichen finden lassen.

```

CaN A $\alpha$  1 MSEPK-----AIDPKLSTTDRVVKAVPFPPSH 27
CaN A $\beta$  1 MAAPEPARAAPPPPPPPPGADRVVKAVPFPPTH 36
CaN A $\gamma$  1 MSGRR-----FHLSTTDRVIKAVPFPPPTQ 24
          * : . . : * * * : * * * * * * : :

```

Abb. 4.22: Aminosäure-Sequenzvergleich des *N*-terminalen Bereiches der humanen CaN A-Isoformen

Die Aminosäure-Sequenzen drei humanen CaN A-Isoformen sind zu 70 % identisch, unterscheiden sich jedoch vorwiegend an den *N*- und *C*-terminalen Bereichen. Dabei besitzt CaN A β als Besonderheit ein Polyprolin-Motiv im *N*-terminalen Bereich (grün).

Dabei fällt besonders eine Polyprolin-Sequenz innerhalb des *N*-terminalen Bereiches des CaN A β auf, welche aus 11 unmittelbar aufeinander folgenden Prolinresten besteht (Abb. 4.22). Polyprolin-Sequenzen stellen Protein-Protein Interaktionsmotive dar und sind auch in der Lage, DNA zu binden (Cubellis et al., 2005).

4.3.1 Klonierung, Expression und Reinigung

Das mögliche Protein-Protein-Interaktionsmotiv des CaN A β könnte verantwortlich sein für die höhere Substrataffinität dieser Isoform im Vergleich zu CaN A α und γ . Deshalb wurde eine Variante des CaN β kloniert, welcher die ersten 21 Aminosäuren und damit das gesamte Polyprolin-Motiv fehlen.

Das Template für CaN A β wurde für eine neue PCR mit einem anderen vorwärts Primer genutzt. Über die Restriktionsenzyme *NdeI* und *XhoI* wurde das CaN A α aus dem pET15b-Vektor geschnitten und die CaN A β -Variante ligiert. Positive Klone wurden durch Kolonie-PCR analysiert und zur eindeutigen Identifizierung durch die Firma MWG sequenziert.

Die Expression und Reinigung des CaN A β ²²⁻⁵²⁴/CaN B1 erfolgte analog des CaN A β /CaN B1 nach einem leicht abgewandelten Protokoll von Mondragon *et al.* (Mondragon et al., 1997). Die Überexpression des CaN β ²²⁻⁵²⁴/CaN B1 sowie der *N*-Myristyltransferase erfolgte in *E. coli* BL21(DE3)pLysE-Zellen bei 30°C für 4 h.

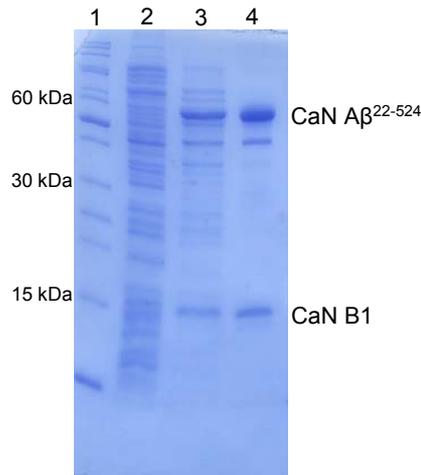


Abb. 4.23: Überexpression und Reinigung des CaN A β^{22-524} /CaN B1

Das 15 %ige Coomassie-gefärbte SDS-Polyacrylamid-Gel zeigt neben dem Marker (1) das Zelllysate nach der Überexpression von CaN A β^{22-524} /CaN B1 (2). CaN A β^{22-524} /CaN B1 wurde mittels einer Ni²⁺-NTA- (3) und einer CaM-Affinitätschromatographie-Säule gereinigt (4).

Dem Aufschluss der Bakterien schlossen sich eine Ni²⁺-NTA- und eine CaM-Affinitätschromatographie-Säule an (Abb. 4.23). Die sauberen, aktiven Fraktionen wurden vereinigt, mit 10 % Glycerin versetzt, aliquotiert, im flüssigen Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert. Aus einer 6 l-Kultur konnten 10 mg Protein gereinigt werden.

4.3.2 Strukturuntersuchungen mittels CD-Spektroskopie

Die Struktur des CaN A β^{22-524} /CaN B1 wurde durch die CD-Spektroskopie untersucht. Das Fern-UV-CD-Spektrum wurde mit 2 μ M CaN in 25 mM Tris/HCl, pH 7,4; 3 mM MgSO₄, 1 mM EGTA; 0,5 mM DTT bei 20°C gemessen. Das entsprechende Pufferspektrum wurde vom Proteinspektrum subtrahiert und die molare Elliptizität berechnet.

Das Spektrum des CaN A β^{22-524} /CaN B1 weist lokale Minima bei 208 nm und 222 nm auf, was auf einen hohen Anteil an α -Helices hindeutet. Das Spektrum ist vergleichbar mit dem des CaN A β /CaN B1 (Abb. 4.24). Trotz der fehlenden 21 N-terminalen Aminosäuren hat das CaN A β^{22-524} /CaN B1 eine ähnliche Struktur wie der Wildtyp.

Weiterhin wurde die thermische Denaturierung des CaN A β^{22-524} /CaN B1 von 4°C bis 95°C gemessen, um die thermische Stabilität der Variante mit CaN A β /CaN B1 zu vergleichen. Dafür wurden 2 μ M CaN in 25 mM Tris/HCl, pH 7,4; 3 mM MgSO₄, 1 mM EGTA; 0,5 mM DTT vermessen. Die thermische Denaturierungskurve bei 222 nm in Abb. 4.25 lässt die Übergangspunkte bei 60°C und 70°C auch bei CaN A β^{22-524} /CaN B1 erkennen.

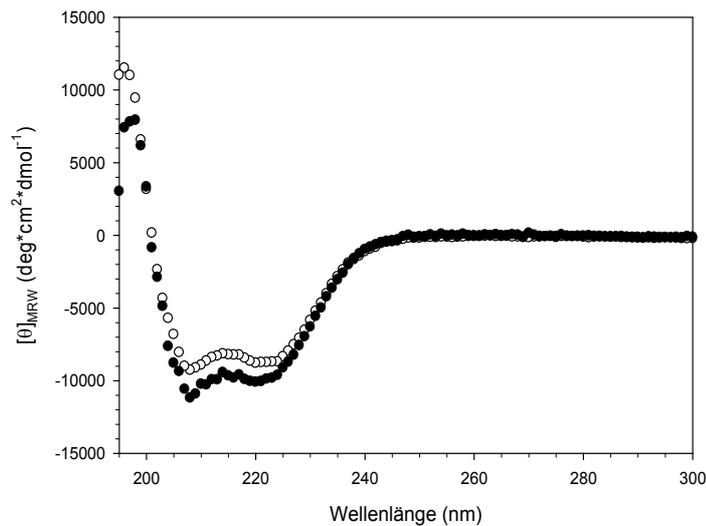


Abb. 4.24: Fern-UV-CD-Spektren der gereinigten CaN β -Varianten

Die CD-Messungen erfolgten in 25 mM Tris/HCl, pH 7,4; 3 mM MgSO_4 ; 1 mM EGTA; 0,5 mM DTT bei 20°C mit 2 μM CaN β /CaN B1 (●) oder CaN β^{22-524} /CaN B1 (○). Die Spektren wurden im Fern-UV-Bereich bei einer Wellenlänge von 195 nm bis 300 nm aufgenommen. Das Pufferspektrum wurde von den Proteinspektren abgezogen und die molaren Elliptizitäten bestimmt.

Zusätzlich zu der Denaturierungskurve wurde aller 10°C jeweils ein vollständiges Fern-UV-CD-Spektrum aufgenommen (Abb. 4.25). Ab 60°C ist eine Rückbildung der für Proteine mit großem helikalen Anteil typischen Form sichtbar. Die zwei Minima bei 208 nm und 222 nm sind kaum noch zu erkennen. Die Kurvenform ähnelt bei 90°C einer für *random coiled*-Strukturen typischen Form. Aus dem Plot ist jedoch zu entnehmen, dass der Denaturierungsprozess bei 90°C noch nicht vollständig abgeschlossen.

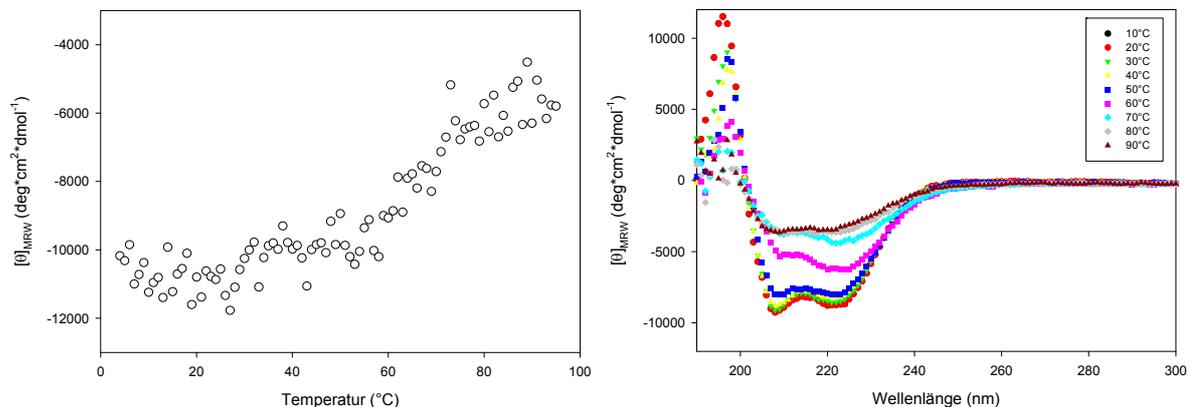


Abb. 4.25: Thermisch-induzierte Entfaltung des CaN β^{22-524} /CaN B1

Die Entfaltung wurde von 4°C bis 95°C bei 222 nm aufgenommen. Daraus ergab sich die thermische Denaturierungskurve (links). Im Abstand von 10°C, beginnend bei 10°C, wurde jeweils ein Fern-UV-CD-Spektrum gemessen (rechts). 2 μM CaN β^{22-524} /CaN B1 wurden mit 25 mM Tris/HCl, pH 7,4; 3 mM MgSO_4 ; 1 mM EGTA; 0,5 mM DTT vermessen.

4.3.3 Verteilung des CaN A β ²²⁻⁵²⁴ in humanen Zelllinien

Für die humanen CaN A-Isoformen α , β und γ wurde bereits gezeigt, dass sie cytoplasmatisch lokalisiert sind. Analog zu diesen Experimenten wurde die Lokalisierung des CaN A β ²²⁻⁵²⁴ in den Neuroblastoma-Zellen analysiert, um zu untersuchen, ob CaN A β ²²⁻⁵²⁴ und CaN A β eine vergleichbare Lokalisierung besitzen.

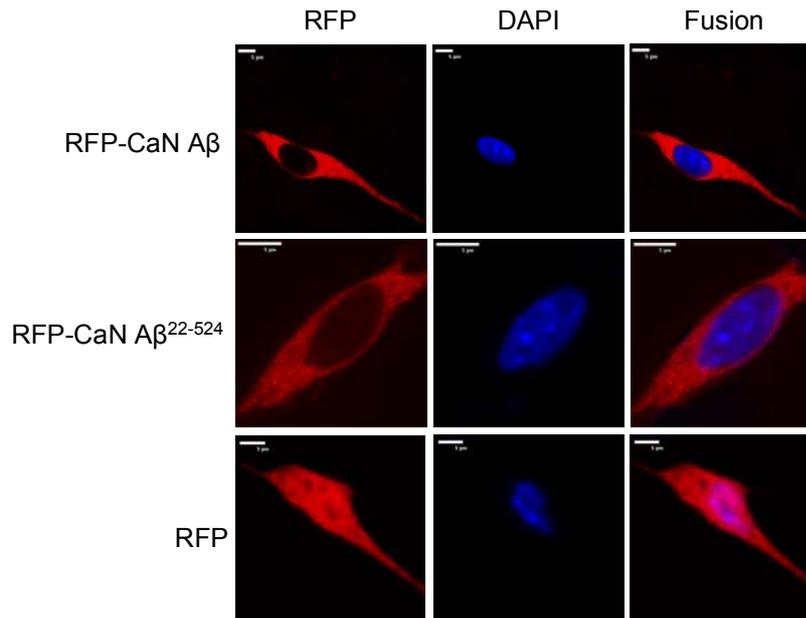


Abb. 4.26: Subzelluläre Lokalisierung des CaN A β ²²⁻⁵²⁴

CaN A β ²²⁻⁵²⁴ wurde in den pmaxFP-Red-C Vektor mit einem N-terminalen rot-fluoreszierenden Protein kloniert und in SH-SY5Y-Zellen transfiziert. Die rote Fluoreszenz sowie die DAPI-Zellkernfärbung wurden im konfokalen *Laser-scanning* Mikroskop analysiert. Als Kontrolle diente der leere Vektor. Zum Vergleich wurde die Färbung des CaN A β gegenübergestellt.

Dafür wurde die Variante ebenfalls in den pmax-FP-Red-C Vektor kloniert und dadurch mit einem rot-fluoreszierenden Protein fusioniert. Das Plasmid wurde in SH-SY5Y-Zellen transfiziert und die Rotfluoreszenz mittels eines konfokalen *Laser-scanning* Mikroskops analysiert. Die Zellkerne wurden zusätzlich mit DAPI gefärbt. In Abb. 4.26 wurden zum Vergleich noch einmal die Kontrolle mit dem leeren Vektor sowie die Zellfärbung des CaN A β gezeigt. Das CaN A β ²²⁻⁵²⁴ war ebenso wie CaN A β nur cytoplasmatisch lokalisiert. Das rot-fluoreszierende Protein, welches durch den leeren Vektor exprimiert wird, fluoreszierte sowohl im Cytoplasma als auch im Zellkern.

Die gleiche Lokalisierung des CaN A β und des CaN A β ²²⁻⁵²⁴ ist neben den CD-Spektren ein weiteres Indiz für ähnliche Eigenschaften der beiden CaN A β -Varianten.

Der *N*-terminale Bereich ist demnach nicht für die subzelluläre Verteilung des CaN A verantwortlich. Deshalb wurde im Folgenden die Substrataffinität des CaN A β^{22-524} /CaN B1 genauer untersucht.

4.3.4 Charakterisierung der CaN-Aktivität mittels pNPP

Aufgrund der ähnlichen Eigenschaften des CaN A β^{22-524} /CaN B1 und des CaN A β /CaN B1 hinsichtlich der Proteinfaltung und der subzellulären Lokalisierung erfolgte eine weitergehende Charakterisierung der Variante im pNPP-Test.

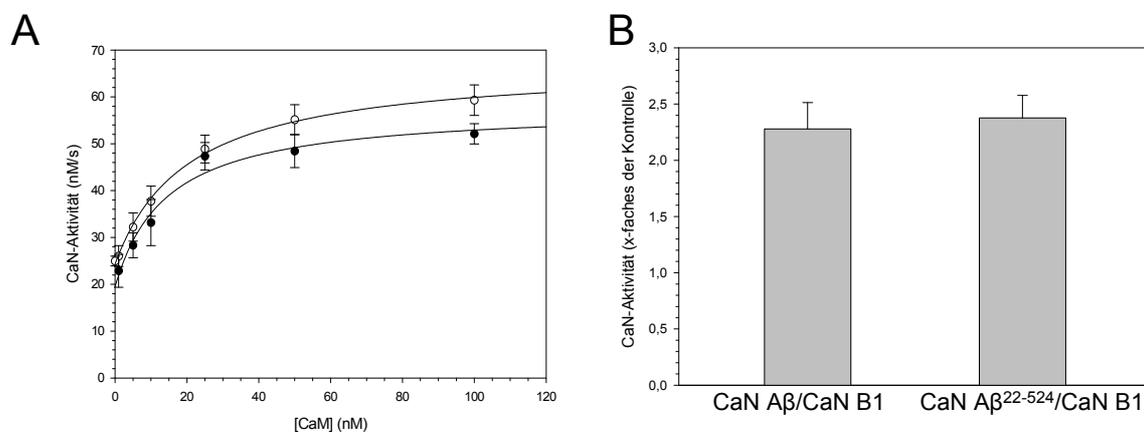


Abb. 4.27: CaM-Abhängigkeit des CaN A β^{22-524} /CaN B1 im pNPP-Test

Unter **A** ist der Verlauf der CaN A β^{22-524} /CaN B1-Aktivität (\circ) bei steigenden CaM-Konzentrationen im Vergleich zur CaN A β /CaN B1-Aktivierung (\bullet) dargestellt.

Unter **B** ist die maximale Aktivierung der beiden Isoformen aufgeführt. Die Kontrolle wurde ohne CaM gemessen. Die dargestellten Werte setzen sich aus drei unabhängigen Messungen \pm SD zusammen.

Zuerst erfolgten die Messungen der CaM-Abhängigkeit. In Abb. 4.27 A ist zu erkennen, dass CaN A β^{22-524} /CaN B1 eine leicht erhöhte Basalaktivität ohne CaM besitzt. Die maximale Aktivierung des CaN A β /CaN B1 um das 2,3-fache ist jedoch mit dem 2,4-fachen für CaN A β^{22-524} /CaN B1 vergleichbar (Abb. 4.27 B). Durch die höhere Grundaktivität des CaN A β^{22-524} /CaN B1 im Vergleich zu CaN A β /CaN B1 ist dementsprechend auch die maximale Aktivität, die mit CaM erreicht werden kann, bei dieser Variante höher (Abb. 4.27 A).

Die Bestimmung der kinetischen Konstanten für CaN A β^{22-524} /CaN B1 erfolgte durch eine Inkubation von 30 nM CaN A β^{22-524} /CaN B1 mit 150 nM CaM für 10 min bei Raumtemperatur. Nach Zugabe von 2,5-120 mM pNPP wurde die Dephosphorylierung bei 405 nm gemessen. Die Anfangsgeschwindigkeiten wurden gegen die pNPP-Konzentration aufgetragen (Abb. 4.28). Der Vergleich zu CaN A β /CaN B1 zeigt, dass die Reaktionsgeschwindigkeit des CaN A β^{22-524} /CaN B1 bei gleichen Substratkonzentrationen etwas höher war.

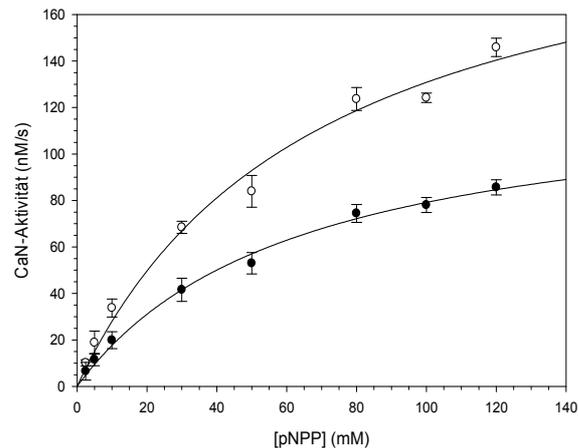


Abb. 4.28: Bestimmung der kinetischen Konstanten des CaN A β^{22-524} /CaN B1 im pNPP-Test

Zur Bestimmung der kinetischen Konstanten im pNPP-Test wurden die Anfangsgeschwindigkeiten der Dephosphorylierung des pNPP durch CaN A β^{22-524} /CaN B1 (○) gegen die Substratkonzentration aufgetragen. Als Vergleich ist die Kurve des CaN A β /CaN B1 (●) dargestellt. Die Werte setzen sich aus drei unabhängigen Messungen \pm SD zusammen. Die kinetischen Konstanten sind in Tabelle 4.9 dargestellt.

Durch die Auswertung der nicht linearen Regression nach Michaelis-Menten konnten die kinetischen Konstanten für CaN A β^{22-524} /CaN B1 im pNPP-Test ermittelt werden. Sie sind in Tab. 4.9 dargestellt. Wie bereits aus der Abb. 4.28 hervorgegangen, war der k_{cat} -Wert für CaN A β^{22-524} /CaN B1 fast doppelt so hoch wie bei CaN A β /CaN B1. Der K_{m} -Wert hingegen war bei der Variante nur leicht erhöht. Demnach war die Substrataffinität durch den *N*-Terminus des CaN A β /CaN B1 geringfügig beeinflusst, während durch die hohe Wechselzahl von $6,3 \text{ s}^{-1}$ auch die katalytische Effizienz im Vergleich zu CaN A β /CaN B1 stieg.

Tab. 4.9: Vergleich der kinetischen Konstanten von CaN A β^{22-524} /CaN B1 und CaN A β /CaN B1 mit pNPP als Substrat

CaN-Isoform	K_{m} (μM)	k_{cat} (s^{-1})	$k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ ($\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$)
CaN A β /CaN B1	$33,3 \pm 2,15$	$3,72 \pm 0,21$	$111 \pm 6,51$
CaN A β^{22-524} /CaN B1	$35,2 \pm 2,92$	$6,36 \pm 0,50$	$179 \pm 11,3$

4.3.5 Charakterisierung des CaN A β^{22-524} /CaN B1 mittels Peptid- und Proteinsubstraten

Neben der Charakterisierung des CaN A β^{22-524} /CaN B1 im pNPP-Test erfolgte ebenfalls der Vergleich zu CaN A β /CaN B1 mit dem RII-Peptid. Mit diesem spezifischen Peptidsubstrat lassen sich Aussagen treffen, welche den *in vivo* Verhältnissen näher kommen. Bei diesen

Messungen kann die Bedeutung des prolinreichen *N*-terminalen Bereiches des CaN A β wahrscheinlich genauer herausgestellt werden.

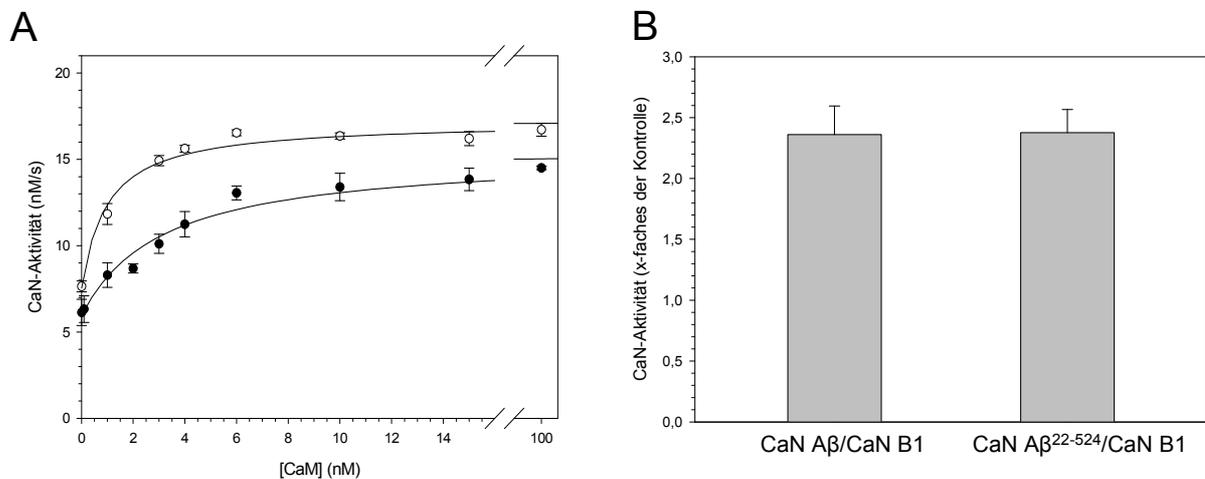


Abb. 4.29: CaM-Abhängigkeit des CaN A β ²²-⁵²⁴/CaN B1 im RII-Test

Die Abbildung **A** zeigt den Verlauf der CaN A β ²²-⁵²⁴/CaN B1-Aktivierung (○) bei steigenden CaM-Konzentrationen im Vergleich zu CaN A β /CaN B1 (●).

Die Abbildung **B** zeigt die maximale Aktivierung der CaN A β /CaN B1-Varianten mit CaM. Die Kontrolle wurde ohne CaM gemessen. Die dargestellten Werte setzen sich aus drei unabhängigen Messungen \pm SD zusammen.

Zuerst wurde die CaM-Abhängigkeit des CaN A β ²²-⁵²⁴/CaN B1 gemessen und dem CaN A β /CaN B1 gegenübergestellt. Dafür wurden 15 nM CaN mit 0-100 nM CaM für 10 min bei Raumtemperatur vorinkubiert. Nach der Zugabe von 100 pmol RII-Peptid inkubierte der Ansatz für 40 min bei 30°C. 90 μ l des Ansatzes wurden danach in eine Scintillationsplatte pipettiert und erneut 20 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Nach dreimaligem Waschen der Kavitäten erfolgte die Messung im MicroBeta Top-Counter.

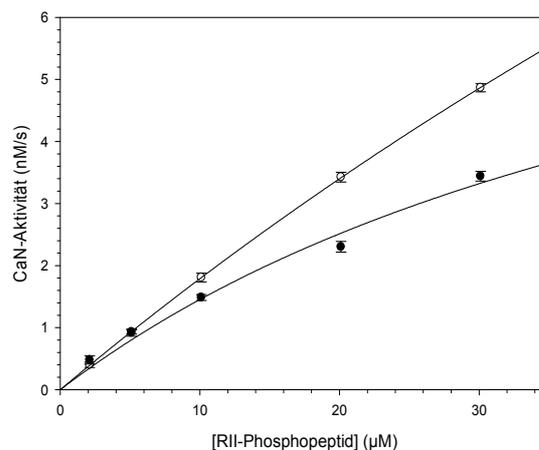


Abb. 4.30: Bestimmung der kinetischen Konstanten des CaN A β ²²-⁵²⁴/CaN B1 im RII-Test

Zur Bestimmung der kinetischen Konstanten im RII-Test wurden die Anfangsgeschwindigkeiten der Dephosphorylierung des RII-Peptids durch CaN A β ²²-⁵²⁴/CaN B1 (○) gegen die Substratkonzentration aufgetragen. Zum Vergleich ist die Kurve für CaN A β /CaN B1 (●) gegenübergestellt. Die dargestellten Werte setzen sich aus drei unabhängigen Messungen \pm SD zusammen. Die kinetischen Konstanten sind in Tabelle 4.10 dargestellt.

Die Abb. 4.29 A zeigt den Verlauf der CaN A β ²²⁻⁵²⁴/CaN B1 -Aktivität bei steigenden CaM-Konzentrationen und Abb. 4.29 B die maximale Aktivierung jeweils im Vergleich zu CaN A β /CaN B1. Wie bereits im pNPP-Test gezeigt, war auch mit dem RII-Peptid als Substrat die Basalaktivität des CaN A β ²²⁻⁵²⁴/CaN B1 ohne CaM höher als bei CaN A β /CaN B1. Beide Varianten können jedoch durch CaM um den gleichen Faktor von 2,3 aktiviert werden, was auf eine vergleichbare Faltung beider Proteine hindeutet.

Zur Bestimmung der kinetischen Konstanten von CaN A β ²²⁻⁵²⁴/CaN B1 im RII-Peptid-Test wurden 11 nM CaN mit 150 nM CaM vorinkubiert. Nach Zugabe von 0,1-30 μ M RII-Peptid erfolgte eine Inkubation des Ansatzes bei 30°C für 1 h. Nach der Übertragung von 90 μ l des Ansatzes auf eine Scintillationsplatte wurde erneut für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert und danach im MicroBeta Top-Counter gemessen.

In Abb. 4.30 ist zu erkennen, dass die Reaktionsgeschwindigkeit des CaN A β ²²⁻⁵²⁴/CaN B1 und damit auch der V_{max} -Wert deutlich höher als bei CaN A β /CaN B1 sind. Zusätzlich zur Auswertung der nicht-linearen Regression nach der Michaelis-Menten-Gleichung wurden die kinetischen Konstanten für CaN A β ²²⁻⁵²⁴/CaN B1 auch mittels der Lineweaver-Burk-Auftragung ermittelt. Die berechneten Parameter sind in Tab. 4.10 im Vergleich zu CaN A β /CaN B1 dargestellt. Sowohl der K_m -Wert als auch die Wechselzahl des CaN A β ²²⁻⁵²⁴/CaN B1 waren mit 125 μ M beziehungsweise 2,09 s⁻¹ deutlich höher als bei CaN A β /CaN B1. Das RII-Peptid kann demnach schlechter an die Variante binden, die katalytische Effizienz im Vergleich zu CaN A β /CaN B1 ist jedoch unverändert.

Tab. 4.10: Vergleich der kinetischen Konstanten von CaN A β ²²⁻⁵²⁴/CaN B1 und CaN A β /CaN B1 im RII-Test

CaN-Isoform	K_m (μ M)	k_{cat} (s ⁻¹)	k_{cat}/K_m (mM ⁻¹ s ⁻¹)
CaN A β /CaN B1	16,7 \pm 1,36	0,31 \pm 0,02	18,0 \pm 1,10
CaN A β ²²⁻⁵²⁴ /CaN B1	125 \pm 10,51	2,09 \pm 0,27	16,7 \pm 1,23

Um aufzuklären, ob der prolinreiche N-terminale Bereich für die hohe Substrataffinität und die niedrige Wechselzahl des CaN A β /CaN B1 im Vergleich zu den anderen Isoformen verantwortlich ist, wurden weiterhin die kinetischen Konstanten des CaN A β ²²⁻⁵²⁴/CaN B1 mit den Proteinsubstraten DARPP-32 und NFAT bestimmt.

In den DARPP-32-Messungen wurden 9 nM CaN A β ²²⁻⁵²⁴/CaN B1 mit 150 nM CaM 10 min bei Raumtemperatur vorinkubiert. Nach der Zugabe von 0-1150 nM DARPP-32 wurde der Ansatz für 2,5-30 min bei 30°C inkubiert. Nach der Proteinfällung mit 20 % TCA und 150 μ g/ml BSA wurden die Ansätze 15 min auf Eis inkubiert und danach für 15 min

zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 1,5 ml Scintillator versetzt und gemessen, das Pellet wurde mit Aceton gewaschen und ebenfalls mit 1,5 ml Scintillator im MicroBeta Top-Counter analysiert.

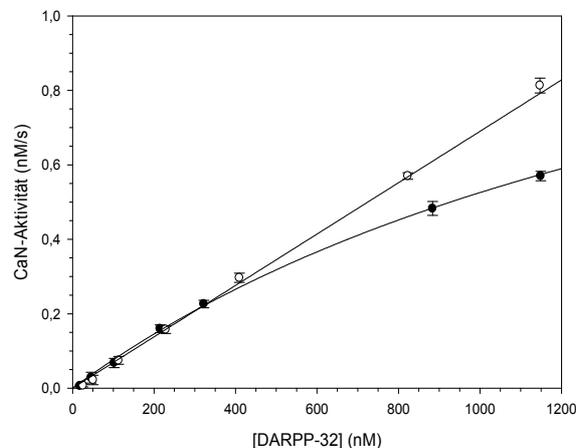


Abb. 4.31: Bestimmung der kinetischen Konstanten des CaN Aβ²²⁻⁵²⁴/CaN B1 mit DARPP-32

Zur Bestimmung der kinetischen Konstanten mit DARPP-32 als Substrat wurden die Anfangsgeschwindigkeiten der Dephosphorylierung des DARPP-32 durch CaN Aβ²²⁻⁵²⁴/CaN B1 (○) gegen die Substratkonzentration aufgetragen. Zum Vergleich ist die Kurve für CaN Aβ/CaN B1 (●) gegenübergestellt. Die Werte ergeben sich aus drei unabhängigen Messungen ± SD. Die kinetischen Konstanten sind in Tabelle 4.11 dargestellt.

Die Michaelis-Menten-Auftragung aus Abb. 4.31 zeigt, dass die Reaktionsgeschwindigkeit des CaN Aβ²²⁻⁵²⁴/CaN B1 bei einer Konzentration von 1150 nM DARPP-32 deutlich höher ist im Vergleich zu CaN Aβ/CaN B1. Zur Auswertung der kinetischen Parameter wurden erneut sowohl die Lineweaver-Burk als auch die Michaelis-Menten-Auftragung gewählt und die erhaltenen Werte gemittelt. Die kinetischen Konstanten von CaN Aβ²²⁻⁵²⁴/CaN B1 und CaN Aβ/CaN B1 sind in Tab. 4.11 dargestellt. Daraus geht hervor, dass bei vergleichbaren katalytischen Effizienzen der beiden CaN β-Varianten, die Substrataffinität des CaN Aβ²²⁻⁵²⁴/CaN B1 um das 10-fache abnimmt, während sich die Wechselzahl um mehr als das 10-fache erhöht.

Tab. 4.11: Vergleich der kinetischen Konstanten der CaN Aβ/CaN B1-Varianten mit DARPP-32

CaN-Isoform	K _m (μM)	k _{cat} (s ⁻¹)	k _{cat} /K _m (mM ⁻¹ s ⁻¹)
CaN Aβ/CaN B1	0,70 ± 0,06	0,04 ± 0,003	60,3 ± 7,30
CaN Aβ ²²⁻⁵²⁴ /CaN B1	6,93 ± 0,53	0,53 ± 0,03	76,6 ± 5,18

Zur Bestimmung der katalytischen Konstanten für CaN Aβ²²⁻⁵²⁴/CaN B1 mit dem Substrat NFAT wurden 17 nM CaN mit 150 nM CaM und 0-1700 nM NFAT für 2-30 min bei 30°C inkubiert. Nach der Proteinfällung mit 20 % TCA und 150 μg/ml BSA wurden die Ansätze 15 min auf Eis inkubiert und danach für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 1,5 ml

Scintillator versetzt und gemessen, das Pellet wurde mit Aceton gewaschen und ebenfalls mit 1,5 ml Scintillator im MicroBeta Top-Counter analysiert.

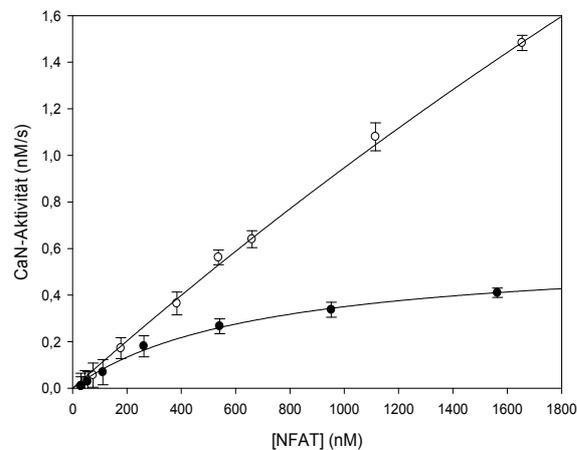


Abb. 4.32: Bestimmung der kinetischen Konstanten des CaN A β^{22-524} /CaN B1 mit NFAT

Zur Bestimmung der kinetischen Konstanten mit NFAT als Substrat wurden die Anfangsgeschwindigkeiten der Dephosphorylierung des NFAT durch CaN A β^{22-524} /CaN B1 (○) gegen die Substratkonzentration aufgetragen. Zum Vergleich ist die Kurve für CaN A β /CaN B1 (●) gegenübergestellt. Die Werte setzen sich aus drei unabhängigen Messungen \pm SD zusammen. Die kinetischen Konstanten sind in Tabelle 4.12 dargestellt.

Auch in diesem Fall zeichnete sich eine sehr hohe maximale Reaktionsgeschwindigkeit für CaN A β^{22-524} /CaN B1 ab (Abb. 4.32).

Die Berechnung der kinetischen Konstanten für CaN A β^{22-524} /CaN B1 erfolgte wiederum mit Hilfe der Michaelis-Menten- sowie der Lineweaver-Burk-Auftragung. Die Ergebnisse im Vergleich zu CaN A β /CaN B1 sind in Tab. 4.12 dargestellt.

Es zeigt sich ein ähnliches Bild wie mit dem Substrat DARPP-32. Die Substrataffinität des CaN A β^{22-524} /CaN B1 zu NFAT war um fast das 4-fache vermindert. Der K_m -Wert stieg demnach von 0,69 auf 2,6 μ M. Die Wechselzahl war ebenfalls deutlich erhöht, so dass die katalytische Effizienz letztendlich nur in geringem Maße beeinflusst wurde und mit 67,9 $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ in einem ähnlichen Bereich wie CaN A β /CaN B1 mit 52,1 $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ lag.

Tab. 4.12: Vergleich der kinetischen Konstanten der CaN A β /CaN B1-Varianten mit NFAT

CaN-Isoform	K_m (μ M)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$)
CaN A β /CaN B1	0,69 \pm 0,07	0,04 \pm 0,004	52,1 \pm 4,53
CaN A β^{22-524} /CaN B1	2,62 \pm 0,24	0,18 \pm 0,01	67,9 \pm 3,48

Die Charakterisierung der CaN A β -Variante CaN A β^{22-524} /CaN B1 deutet darauf hin, dass der prolinreiche N-terminale Bereich des CaN A β (Aminosäurereste 4-21) die Affinität zu den Substraten sowie die Wechselzahl beeinflusst, während die Faltung, die subzelluläre

Verteilung, sowie die CaM-Bindung der Phosphatase durch das Polyprolin-Motiv nicht beeinflusst werden.

4.4 Vergleich der Inhibition der CaN-Isoformen durch FKBP12/FK506 und Cyp18/CsA

In der Medizin ist die FK506- und CsA-vermittelte Immunsuppression von besonderer Bedeutung. Deshalb wurde die Inhibition der Phosphatase-Aktivitäten sowohl der drei humanen CaN-Isoformen als auch der Variante CaN $A\beta^{22-524}$ /CaN B1 durch FKBP12/FK506 und Cyp18/CsA mit unterschiedlichen Substraten bestimmt.

Neben der im Vergleich zu den Peptid- und Proteinsubstraten sehr hohen Basalaktivität von CaN zeigt der pNPP-Test noch eine weitere Besonderheit. Es ist bereits für die α -Isoform gezeigt worden, dass die spezifischen Inhibitor Komplexe FKBP12/FK506 und Cyp18/CsA die CaN-Aktivität mit pNPP als Substrat erhöhen, statt zu hemmen. Deshalb wurde der Einfluss der beiden Komplexe auf die Aktivität der CaN-Isoformen untersucht.

Für die Messungen wurden je 50 nM CaN mit 150 nM CaM, 10 μ M CsA und 0-1500 nM Cyp18 beziehungsweise 10 μ M FK506 und 0-1000 nM FKBP12 inkubiert. Nach der Zugabe von 10 mM pNPP, gelöst im pNPP-Assaypuffer wurden die Messungen bei 405 nm gestartet. Aus Abb. 4.33 geht hervor, dass sowohl der FKBP12/FK506-Komplex als auch der Cyp18/CsA-Komplex die Aktivitäten aller CaN-Isoformen erhöhen konnte. CaN $A\alpha$ /CaN B1 konnte jeweils am stärksten aktiviert werden, während sich die CaN $A\beta$ /CaN B1-Aktivität in Gegenwart von FKBP12/FK506 und Cyp18/CsA im Vergleich zu den anderen Isoformen am wenigsten erhöhen ließ. Weiterhin ist zu erkennen, dass die Aktivierungen der CaN-Isoformen mit Cyp18/CsA durchweg geringer waren als mit FKBP12/FK506 (Abb. 4.33 B, D). Am größten war die Aktivierung mit einem Faktor von 4 bei CaN $A\alpha$ /CaN B1 in Gegenwart von 1 μ M FKBP12/FK506.

Des Weiteren wurden die Aktivierungen des CaN $A\beta^{22-524}$ /CaN B1 durch die FKBP12/FK506- und Cyp18/CsA-Komplexe im pNPP-Assay mit denen des CaN $A\beta$ /CaN B1 verglichen (Abb. 4.33). Durch diese Messungen konnte gezeigt werden, dass CaN $A\beta^{22-524}$ /CaN B1 durch 1 μ M FKBP12/FK506 geringfügig höher aktiviert werden konnte. Die maximale Aktivierung der CaN β -Aktivität erfolgte um das 2,7-fache im Vergleich zu einer Kontrolle ohne FKBP12/FK506, während das CaN $A\beta^{22-524}$ /CaN B1 um das 3,0-fache aktiviert werden konnte.

Die Messungen mit dem Cyp18/CsA-Komplex im pNPP-Assay wiesen etwas größere Unterschiede zwischen den β -Varianten auf. Aus vorhergehenden Untersuchungen war bereits bekannt, dass die CaN $A\beta$ /CaN B1-Aktivität um das 2-fache durch 1,5 μ M Cyp18/CsA gesteigert werden kann. Im Vergleich dazu erfolgte die maximale Aktivierung des CaN

$A\beta^{22-524}/CaN$ B1 mit Cyp18/CsA um das 3-fache. Das entspricht in etwa dem Wert, welcher für CaN A α /CaN B1 ermittelt wurde.

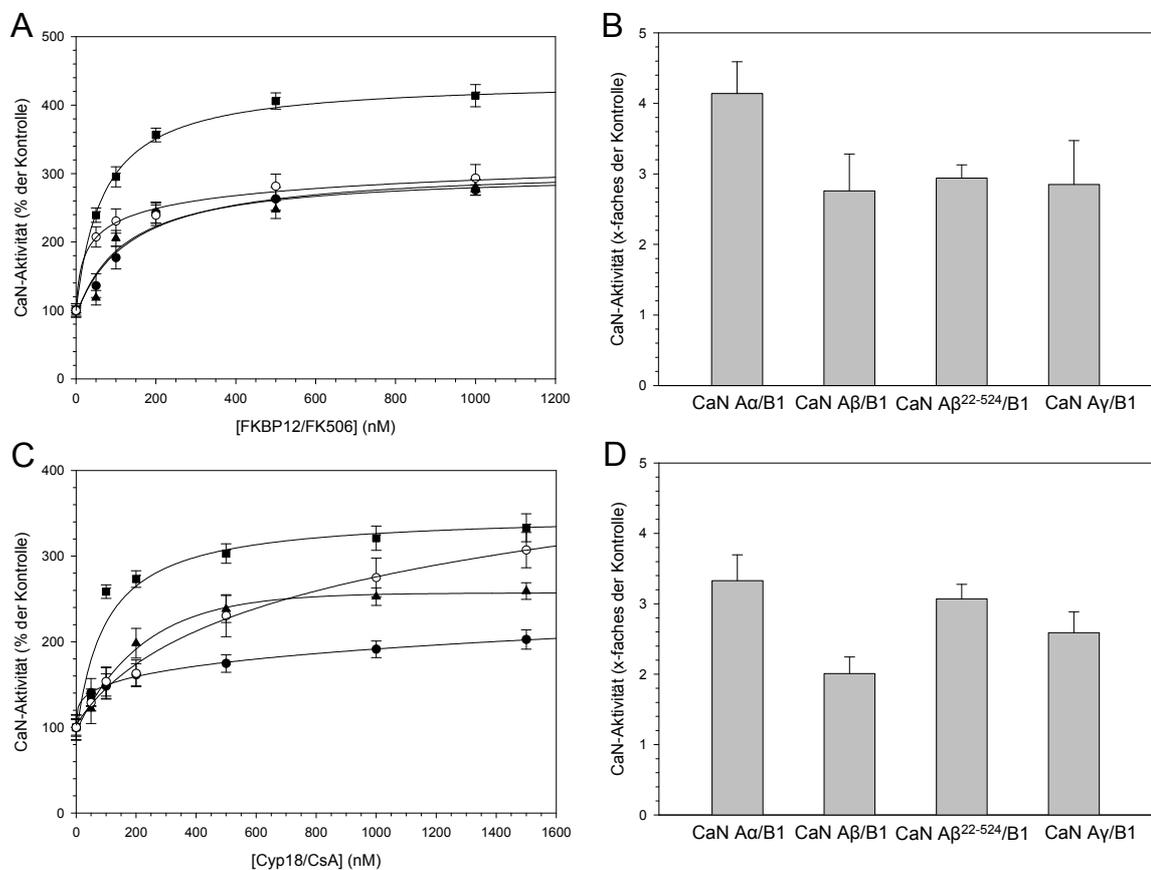


Abb. 4.33: CaN-Aktivierung durch FKBP12/FK506 und Cyp18/CsA im pNPP-Test

Die Abbildungen **A** und **C** zeigen den Verlauf der Aktivierung von CaN A α /CaN B1 (\blacksquare), CaN A β /CaN B1 (\bullet), CaN A β^{22-524} /CaN B1 (\circ) und CaN A γ /CaN B1 (\blacktriangle) bei steigenden Konzentrationen von FKBP12/FK506 (**A**) und Cyp18/CsA (**C**). Links sind die maximalen Aktivierungen der CaN-Isoformen mit FKBP12/FK506 (**B**) und Cyp18/CsA (**D**) dargestellt. Die Kontroll-Messungen erfolgten jeweils ohne die inhibierenden Komplexe. Die Werte setzen sich aus drei unabhängigen Messungen \pm SD zusammen.

Weiterhin wurde der Effekt des Cyp18/CsA-Komplexes auf die kinetischen Konstanten untersucht, um eine mögliche Erklärung für den Mechanismus der pNPP-Aktivierung zu finden. Stellvertretend ist in

Abb. 4.34 die Kurve für Cyp18/CsA und CaN A α /CaN B1 im Vergleich zu CaN A α /CaN B1 dargestellt. Aus den Auftragungen der CaN-Aktivität gegen die pNPP-Konzentration war zu entnehmen, dass sich jeweils die Wechselzahl k_{cat} in Anwesenheit der Immunophilin/Immunsuppressiva-Komplexe nicht verändert.

Der Vergleich der kinetischen Konstanten von CaN A α /CaN B1 mit und ohne Cyp18/CsA in Tab. 4.13 zeigt, dass in Anwesenheit von Cyp18/CsA sich die Substrataffinität von CaN A α /CaN B1 verbesserte, die katalytische Effizienz deutlich gesteigert wurde und die Wechselzahl sich erhöhte. Dieser Effekt konnte auch mit FKBP12/FK506 nachgewiesen

werden. Durch die Komplexe wird demnach das pNPP besser gebunden und kann effizienter dephosphoryliert werden.

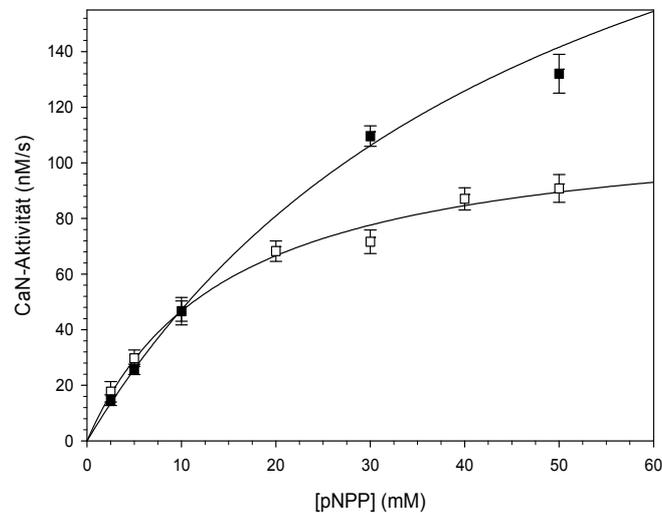


Abb. 4.34: Bestimmung der kinetischen Konstanten von CaN α /CaN β 1 in An- und Abwesenheit von Cyp18/CsA

Dargestellt ist die Auftragung der CaN-Aktivität gegen die pNPP-Konzentration in Anwesenheit von Cyp18/CsA (\square). Zum Vergleich wurde die CaN α /CaN β 1-Kurve ohne Cyp18/CsA dargestellt (\blacksquare). Die dargestellten Werte \pm SD wurden aus drei voneinander unabhängigen Experimenten ermittelt.

Im Vergleich zum pNPP-Assay ist bekannt, dass die immunsuppressiven Komplexe FKBP12/FK506 und Cyp18/CsA die CaN-Aktivität im RII-Assay inhibieren. Der Effekt der Komplexe auf die einzelnen CaN-Isoformen ist bislang jedoch noch nicht getestet worden.

Für die Messungen wurden 15 nM CaN mit 150 nM CaM, 10 μ M CsA und 0-500 nM Cyp18 beziehungsweise 10 μ M FK506 und 0-200 nM FKBP12 für 20 min bei RT vorinkubiert. Nach Zugabe von 100 pmol RII-Phosphopeptid wurde der Ansatz für 40 min bei 30°C inkubiert. 90 μ l der Lösung wurden danach für 20 min in einer Scintillations-Mikrotiter-Platte pipettiert und die Dephosphorylierung gemessen.

Tab. 4.13: Vergleich der kinetischen Konstanten von CaN α /CaN β 1 und CaN α /CaN β 1 mit Cyp18/CsA

CaN-Isoform	K_m (mM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($M^{-1}s^{-1}$)
CaN α /CaN β 1 mit Cyp18/CsA	21,8 \pm 2,01	9,24 \pm 0,86	421 \pm 38,1
CaN α /CaN β 1	39,6 \pm 3,34	4,31 \pm 0,47	108 \pm 9,15

Aus Abb. 4.35 geht hervor, dass die Phosphataseaktivität der humanen CaN-Isoformen und der Variante CaN β^{22-524} /CaN β 1 sowohl durch FKBP12/FK506 (Abb. 4.35 A) als auch

durch Cyp18/CsA (Abb. 4.35 B) vollständig inhibiert werden kann. Von den drei *in vivo* vorkommenden CaN-Isoformen kann CaN $\text{A}\gamma/\text{CaN B1}$ mit einem IC_{50} -Wert von 25,4 nM am effizientesten durch den FKBP12/FK506-Komplex inhibiert werden, während Cyp18/CsA die Aktivität des CaN $\text{A}\beta/\text{CaN B1}$ mit einem IC_{50} von 57,4 nM am besten inhibierte.

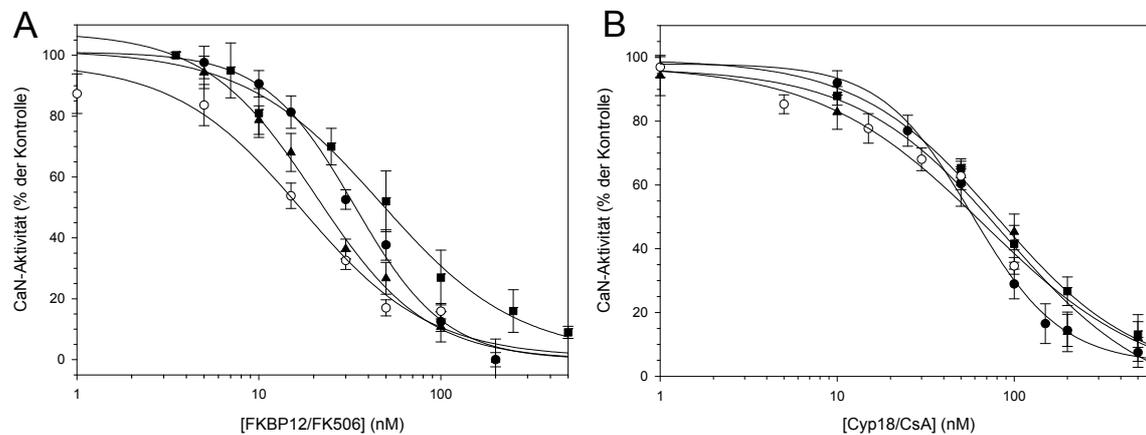


Abb. 4.35: CaN-Inhibition durch FKBP12/FK506 und Cyp18/CsA im RII-Assay

Die Abbildungen zeigen den Verlauf der Inhibition von CaN $\text{A}\alpha/\text{CaN B1}$ (■), CaN $\text{A}\beta/\text{CaN B1}$ (●), CaN $\text{A}\beta^{22-524}/\text{CaN B1}$ (○) und CaN $\text{A}\gamma/\text{CaN B1}$ (▲) bei steigenden Konzentrationen von FKBP12/FK506 (A) und Cyp18/CsA (B). Die jeweiligen Kontrollen ergaben sich aus Messungen ohne die Komplexe. Die Werte \pm SD wurden aus drei unabhängigen Versuchen ermittelt.

Die IC_{50} -Werte sind in Tab. 4.14 dargestellt. Die Werte der CaN-Isoformen mit FKBP12/FK506 liegen im Bereich zwischen 25 und 50 nM, während sie für Cyp18/CsA zwischen 57 und 80 nM liegen. Die CaN-Isoformen lassen sich demnach potenter durch den FKBP12/FK506-Komplex inhibieren. Bei CaN $\text{A}\gamma/\text{CaN B1}$ ist der Unterschied zwischen der Inhibition durch FKBP12/FK506 und Cyp18/CsA am größten. Während der IC_{50} -Wert mit FKBP12/FK506 bei 25 nM und damit niedriger im Vergleich zu den anderen Isoformen liegt, ist die Inhibitionskonstante von CaN $\text{A}\gamma/\text{CaN B1}$ und Cyp18/CsA mit 78 nM vergleichsweise hoch.

Aus Abb. 4.35 geht weiterhin hervor, dass die Variante CaN $\text{A}\beta^{22-524}/\text{CaN B1}$ mit einem IC_{50} -Wert von 15,5 nM durch FKBP12/FK506 effektiver inhibiert werden konnte als CaN $\text{A}\beta/\text{CaN B1}$ mit 34,3 nM, während die Inhibitionskonstanten mit Cyp18/CsA in einem ähnlichen Bereich von ca. 60 nM wie CaN $\text{A}\beta/\text{CaN B1}$ lagen.

Weiterhin wurde die CaN-Aktivität mit den Proteinsubstraten auf ihre Inhibierbarkeit durch FKBP12/FK506 und Cyp18/CsA getestet.

In Abb. 4.36 ist die Inhibition der drei humanen CaN-Isoformen durch FKBP12/FK506 dargestellt. Zum Vergleich der beiden CaN β -Varianten wurde zusätzlich die Inhibition des

CaN $A\beta^{22-524}$ /CaN B1 durch FKBP12/FK506 mit NFAT und DARPP-32 gemessen. Die Tabelle 4.15 führt die aus den Kurven hervorgehenden IC_{50} -Werte auf.

Tab. 4.14: Vergleich der Inhibition der CaN-Isoformen durch FKBP12/FK506 oder Cyp18/CsA im RII-Test

CaN-Isoform	FKBP12/FK506 IC_{50} (nM)	Cyp18/CsA IC_{50} (nM)
CaN $A\alpha$ /CaN B1	47,3 \pm 3,25	80,2 \pm 7,37
CaN $A\beta$ /CaN B1	34,3 \pm 3,52	57,4 \pm 5,29
CaN $A\beta^{22-524}$ /CaN B1	15,5 \pm 1,21	60,9 \pm 4,98
CaN $A\gamma$ /CaN B1	25,4 \pm 2,10	78,2 \pm 6,72

Je nach Substrat wurden entsprechende Konzentrationen an CaN mit jeweils 150 nM CaM, 10 μ M FK506 und 0-1000 nM FKBP12 vorinkubiert. Nach Zugabe von 160 nM NFAT, 160 nM DARPP-32, 170 nM Elk-1 oder 300 nM Tau wurden die Ansätze bei 30°C 20 min (NFAT und DARPP-32), 45 min (Elk-1) oder 30 min (Tau) inkubiert. Danach wurden die Proteine durch Zugabe von 20 μ l 20 % TCA und 150 μ g/ml BSA-Lösung gefällt. Sowohl der Überstand als auch das Pellet wurden mit 1,5 ml Scintillator versetzt und im MicroBeta Top-Counter gemessen.

Tab. 4.15: Vergleich der Inhibition der CaN-Isoformen durch FKBP12/FK506 mit Proteinsubstraten

CaN-Isoform	NFAT (nM)	DARPP-32 (nM)	Elk-1 (nM)	Tau (nM)
CaN $A\alpha$ /CaN B1	16,1 \pm 1,24	29,1 \pm 2,28	18,1 \pm 1,35	18,2 \pm 2,34
CaN $A\beta$ /CaN B1	7,25 \pm 0,67	58,9 \pm 4,82	12,6 \pm 1,08	42,2 \pm 4,56
CaN $A\beta^{22-524}$ /CaN B1	36,5 \pm 2,08	11,2 \pm 1,07	nicht bestimmt	nicht bestimmt
CaN $A\gamma$ /CaN B1	4,38 \pm 0,36	16,1 \pm 1,76	10,6 \pm 0,93	15,9 \pm 1,87

Aus Abb. 4.36 und Tab. 4.15 geht hervor, dass die CaN-Aktivität mit NFAT als Substrat bei geringeren FKBP12/FK506-Konzentrationen inhibiert werden konnte, als mit DARPP-32 und Tau. CaN $A\gamma$ /CaN B1 ließ sich durch FKBP12/FK506 mit allen Substraten am besten

inhibieren. Die höchsten IC_{50} -Werte von 16,1 und 18,1 nM hatte CaN α /CaN B1 mit den Substraten NFAT und Elk-1, während bei DARPP-32 und Tau die β -Isoform mit IC_{50} -Werten von 58,9 und 42,2 nM am geringsten mit FKBP12/FK506 inhibiert wurde. Des Weiteren wurde die Inhibition des CaN β^{22-524} /CaN B1 mit NFAT und DARPP-32 gemessen. Aus Abb. 4.36 geht hervor, dass die Variante CaN β^{22-524} /CaN B1 durch FKBP12/FK506 mit dem Substrat DARPP-32 effektiver inhibiert werden konnte als das CaN β /CaN B1. Der IC_{50} -Wert für die Variante war mit 11,2 nM 5-fach niedriger im Vergleich zum Wildtyp-Protein. Im Gegensatz dazu erhöhte sich die Inhibitionskonstante von 7,2 nM des Wildtyps auf 36,5 nM des CaN β^{22-524} /CaN B1, wenn die Inhibition des FKBP12/FK506-Komplexes mit NFAT bestimmt wurde.

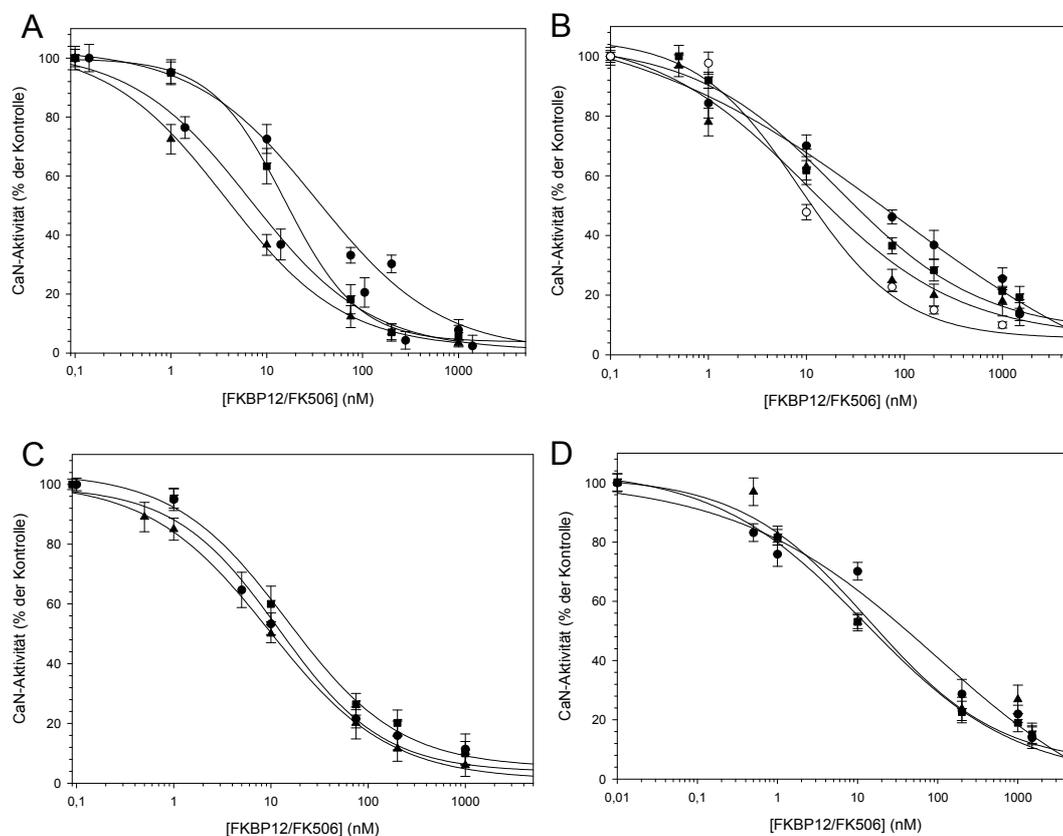


Abb. 4.36: Inhibition der CaN-Aktivität durch FKBP12/FK506 mit verschiedenen Proteinsubstraten

Mit unterschiedlichen Substraten wurde die CaN α /CaN B1- (\blacksquare), CaN β /CaN B1- (\bullet) und CaN γ /CaN B1- (\blacktriangle) Aktivität in Anwesenheit von steigenden Konzentrationen von FKBP12/FK506 bestimmt. Die Inhibition wurde für die Substrate NFAT (A), DARPP-32 (B), Elk-1 (C) und Tau (D) gemessen. Für die Substrate NFAT und DARPP-32 wurde zusätzlich die Inhibition des CaN β^{22-524} /CaN B1 (\circ) durch FKBP12/FK506 dargestellt. Die Kontrollmessungen erfolgten jeweils ohne FKBP12/FK506. Die Werte setzen sich aus drei unabhängigen Messungen \pm SD zusammen.

Analog zu den Inhibitionsstudien mit FKBP12/FK506 wurde die Regulation der CaN-Aktivität mit den Proteinsubstraten durch Cyp18/CsA untersucht.

Aus den Auftragungen der Restaktivität gegen die Substratkonzentration konnten die IC_{50} -Werte berechnet werden, welche in Tabelle 4.16 dargestellt sind.

Obwohl die Binderegionen der beiden immunsuppressiven Komplexe an CaN nahezu gleich sind, gibt es doch Unterschiede bezüglich der IC_{50} -Werte. Es fällt auf, dass die CaN-Aktivität mit NFAT und Elk-1, welche durch FKBP12/FK506 besonders gut inhibiert wurde, mit Cyp18/CsA im Vergleich deutlich schwächer inhibiert werden konnte (Abb. 4.37). Mit DARPP-32 hingegen ließen sich die CaN-Aktivitäten durch Cyp18/CsA besser inhibieren als mit FKBP12/FK506.

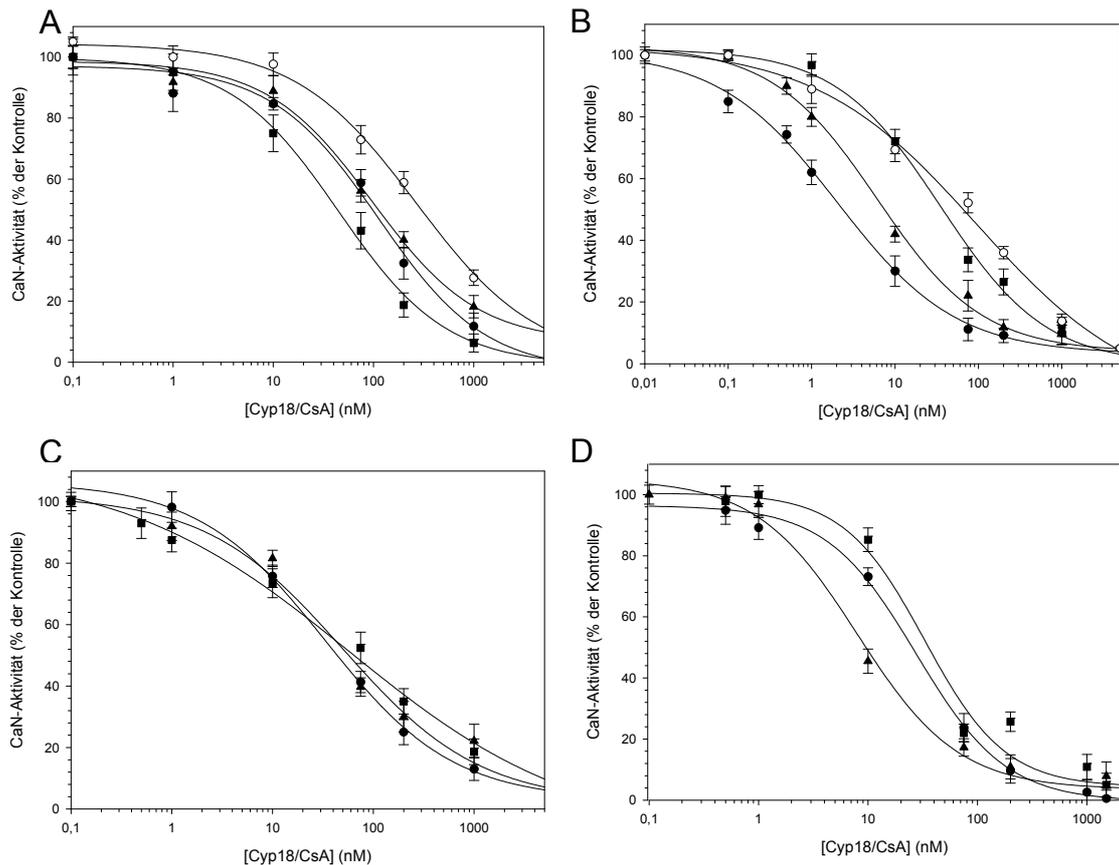


Abb. 4.37: Inhibition der CaN-Aktivität durch Cyp18/CsA mit verschiedenen Proteinsubstraten

Mit unterschiedlichen Substraten wurde die CaN α /CaN B1- (■), CaN β /CaN B1- (●) und CaN γ /CaN B1- (▲) Aktivität in Anwesenheit steigender Konzentrationen von Cyp18/CsA bestimmt. Die Inhibition wurde für die Substrate NFAT (A), DARPP-32 (B), Elk-1 (C) und Tau (D) gemessen. Für die Substrate NFAT und DARPP-32 wurde zusätzlich die Inhibition des CaN β^{22-524} /CaN B1 (○) durch Cyp18/CsA dargestellt. Die Kontrollmessungen erfolgten jeweils ohne Cyp18/CsA. Die Werte setzen sich aus drei unabhängigen Messungen \pm SD zusammen.

Mit Elk-1 und Tau waren die IC_{50} -Werte von CaN γ /CaN B1 mit 43,7 nM und 6,33 nM am kleinsten, während mit NFAT CaN α /CaN B1 (43,3 nM) und mit DARPP-32 CaN β /CaN B1 (2,39 nM) am besten inhibiert wurden.

In Abb. 4.37 ist zu erkennen, dass die Variante CaN β^{22-524} /CaN B1 durch Cyp18/CsA weniger effektiv inhibiert werden kann als CaN β /CaN B1. Die Auswertungen der Kurven, welche mit NFAT und DARPP-32 gemessen wurden, ergaben IC_{50} -Werte für CaN β^{22-524} /CaN B1 von 290 beziehungsweise 63,4 nM. Zusammenfassend kann die CaN β -

Variante deutlich besser durch FKBP12/FK506 als durch Cyp18/CsA mit den Proteinsubstraten inhibiert werden.

Tab. 4.16: Vergleich der Inhibition der CaN-Isoformen durch Cyp18/CsA mit Proteinsubstraten

CaN-Isoform	NFAT (nM)	DARPP-32 (nM)	Elk-1 (nM)	Tau (nM)
CaN α /CaN B1	43,3 \pm 3,96	36,1 \pm 2,97	63,4 \pm 5,75	36,5 \pm 4,38
CaN $\alpha\beta$ /CaN B1	97,3 \pm 8,64	2,39 \pm 0,23	54,3 \pm 3,10	26,4 \pm 1,76
CaN $\alpha\beta^{22-524}$ /CaN B1	290 \pm 9,12	63,4 \pm 5,11	nicht bestimmt	nicht bestimmt
CaN $\alpha\gamma$ /CaN B1	111 \pm 9,90	7,27 \pm 0,6	43,7 \pm 4,24	6,33 \pm 0,82

4.5 Vergleichende Analyse zur Relevanz immunsuppressiver Komplexe

Ein weiteres Ziel der Arbeit war die Untersuchung, welche FKBP in der Lage sind, einen Komplex mit FK506 zu bilden und welche FKBP/FK506-Komplexe daraufhin die CaN-Aktivität inhibieren. Von den 16 bislang identifizierten humanen FKBP gab es in der Literatur nur Hinweise auf FK506-Komplexe mit FKBP12 und FKBP12.6, welche CaN im nanomolaren Bereich inhibieren (Lam et al., 1995; Liu et al., 1991). Deshalb wurden die FK506-Affinität und die CaN-Inhibition von sechs humanen FKBP analysiert. Weiterführend war es ebenfalls von Interesse analog zu den FKBP/FK506-Messungen zu untersuchen, welche Cyp neben dem prototypischen Cyp18 in der Lage sind, CsA zu binden und im Cyp/CsA-Komplex die CaN-Aktivität inhibieren können.

4.5.1 Identifizierung von CaN-interagierenden FKBP/FK506-Komplexen

Zur Untersuchung, welche FKBP/FK506-Komplexe die CaN-Aktivität inhibieren können, wurden zuerst die Bindekonstanten der FKBP an FK506 bestimmt. Dazu wurden die Aktivitäten der FKBP12, 12.6, 13, 51 und 52 im PPlase-Test mit verschiedenen FK506-Konzentrationen gemessen (Tab. 4.17).

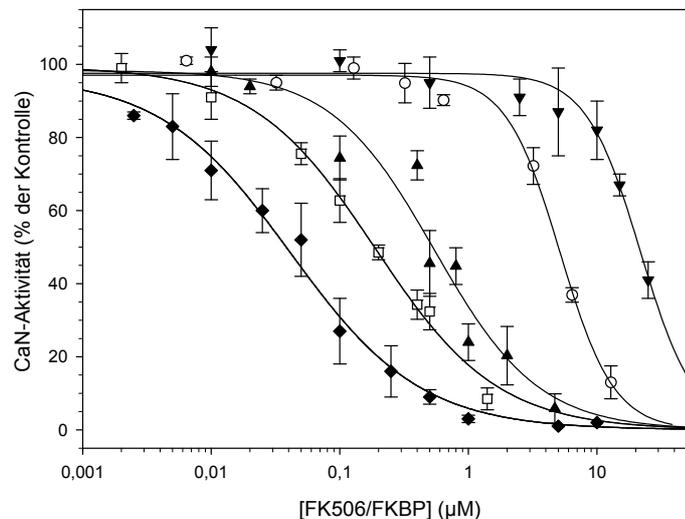


Abb. 4.38: Effekt der FKBP/FK506-Komplexe auf die CaN-Aktivität im RII-Assay

Zur Bestimmung der Inhibitionskonstanten wurden CaN A α /CaN B1 mit CaM, FK506 und verschiedene Konzentrationen von FKBP12 (\blacklozenge), FKBP12.6 (\square), FKBP13 (\circ), FKBP51 (\blacktriangle) und FKBP52 (\blacktriangledown) zusammen inkubiert. Die Inhibitionskonstanten sind in Tab. 4.17 dargestellt. Als Kontrolle dienten die Messungen ohne die FKBP/FK506-Komplexe. Die Werte \pm SD wurden aus drei voneinander unabhängigen Experimenten ermittelt.

Die FKBP mit nur einer PPlase-Domäne FKBP12, 12.6 und 13 wurden im Proteasegekoppelten PPlase-Test gemessen und zeigten alle eine FK506-Inhibition im unteren nanomolaren Bereich von 0,88 bis 3 nM. FKBP51 und 52 konnten durch FK506 mit 14,6 und 12 nM ebenfalls im nanomolaren Bereich inhibiert werden. Die Aktivitätsmessungen des FKBP51 und 52 erfolgten mit Hilfe des Protease-freien PPlase-Tests. Die Ergebnisse zeigen, dass obwohl die PPlase-Domänen der FKBP heterolog sind, alle getesteten FKBP FK506 sehr fest binden können.

Für den FKBP12/FK506-Komplex ist beschrieben, dass er die CaN-Aktivität sehr gut inhibieren kann. Die Bindung an CaN erfolgt über Aminosäuren des β Faltblattes 5 und des Loops zwischen den β -Faltblättern 2 und 3 (Van Duyne et al., 1991). Da diese Regionen der FKBP ebenfalls sehr heterolog sind, war es interessant die CaN-Inhibition aller FKBP/FK506-Komplexe zu vergleichen.

Im RII-Peptid-Test wurden 10 nM CaN A α /CaN B1 mit 150 nM CaM, 10 μ M FK506 und unterschiedlichen Konzentrationen an FKBP inkubiert und mit 10 pmol RII-Phosphopeptid gemessen. Durch die Auftragung der CaN-Aktivität gegen die FKBP/FK506-Konzentration, wie in Abb. 4.38 dargestellt, konnten die IC₅₀-Werte berechnet werden. Die Ergebnisse zeigten, dass FK506-Komplexe mit FKBP12, 12.6 und 51 die CaN-Aktivität im nanomolaren Bereich inhibieren konnten (Tab. 4.17). Obwohl sie zu 62 % homolog sind und ähnliche Affinität zu FK506 aufweisen, war der IC₅₀-Wert für FKBP13 im Komplex mit FK506 mit 5 μ M 100-mal höher als bei dem FKBP12/FK506-Komplex. Ebenfalls interessant ist, dass FKBP51

im Komplex mit FK506 die CaN-Aktivität 20-mal besser inhibieren konnte als das zu 77 % homologe FKBP52 zusammen mit FK506.

Tab. 4.17: Inhibitionskonstanten der PPlase-Aktivität der FKBP mit FK506 sowie der CaN-Aktivität durch FKBP/FK506-Komplexe

*FKBP38 wurde in einem Kompetitions-Assay von Dr. Frank Edlich (siehe Doktorarbeit) vermessen.

FKBP	Inhibition der	
	PPlase-Aktivität mit FK506 IC ₅₀ (nM)	CaN A α /CaN B1-Aktivität mit FK506/FKBP IC ₅₀ (nM)
FKBP12	0,88 \pm 0,25	47,2 \pm 3,71
FKBP12.6	2,92 \pm 0,41	147 \pm 17,0
FKBP13	1,50 \pm 0,33	4990 \pm 590
FKBP38*	51,0 \pm 6,20	17000 \pm 2500
FKBP51	14,6 \pm 1,87	744 \pm 98,1
FKBP52	12,0 \pm 1,46	15000 \pm 1600

Es konnte bereits gezeigt werden, dass der FKBP12/FK506-Komplex die CaN-Aktivität mit dem pNPP als Substrat stimulieren statt inhibieren kann (4.2.3.1). Deshalb wurde der Einfluss der verschiedenen FKBP/FK506-Komplexe auf die Dephosphorylierung des pNPP als Substrat untersucht. Dafür wurden 45 nM CaN A α /CaN B1 mit 1 μ M CaM, 10 μ M FK506 und 3 μ M FKBP für 10 min bei Raumtempertur inkubiert und mit 10 mM pNPP bei 405 nm gemessen. Wie im RII-Test können auch hier Unterschiede zwischen den verschiedenen FKBP/FK506-Komplexen beobachtet werden.

Aus Abb. 4.39 ist ersichtlich, dass die FK506-Komplexe mit FKBP12 und FKBP52 CaN aktivieren können. Allerdings ist die Aktivierung von CaN durch den FKBP52/FK506-Komplex 10-mal schlechter als durch FKBP12/FK506. Beide Aktivierungen konnten konzentrationsabhängig bis zum dargestellten Maximum gesteigert werden. Das FKBP12- verwandte FKBP12.6 konnte im Komplex mit FK506 die CaN-Aktivität um 20 % inhibieren, während die FK506-Komplexe mit FKBP13 und 51 keinen Einfluss auf die CaN-Aktivität zeigten.

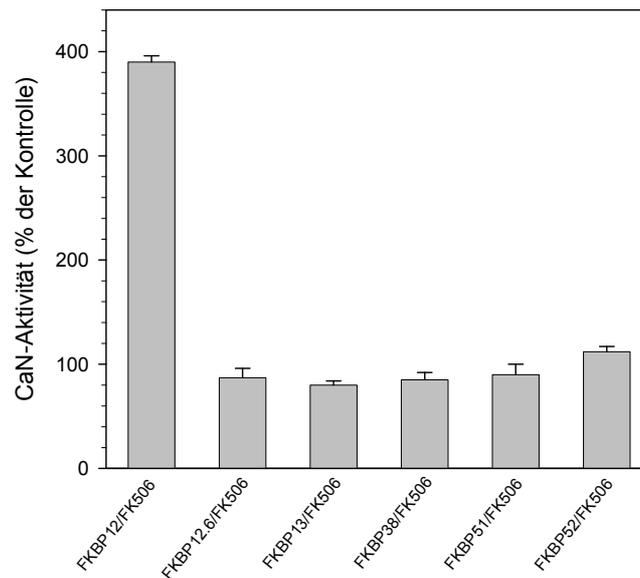


Abb. 4.39: Einfluss der FKBP/FK506-Komplexe auf die CaN-Aktivität im pNPP-Test

Der Einfluss der FKBP/FK506-Komplexe auf die CaN-Aktivität wurde bestimmt. Die Kontroll-Werte ergaben sich aus Messungen ohne die FKBP/FK506-Komplexe. Die Werte setzen sich aus drei unabhängigen Messungen \pm SD zusammen.

Im Unterschied zu Messungen mit dem Peptidsubstrat RII konnten die Effekte des FKBP12/FK506-Komplexes im pNPP-Test auch in Abwesenheit von CaM beobachtet werden (Abb. 4.40). Im Vergleich mit CaN/Ca²⁺/CaM sind für die vollständige Aktivierung von CaN in Abwesenheit von CaM höhere FKBP12/FK506-Konzentrationen notwendig. Jedoch ist letztendlich der Faktor der maximalen Aktivierung mit und ohne CaM vergleichbar.

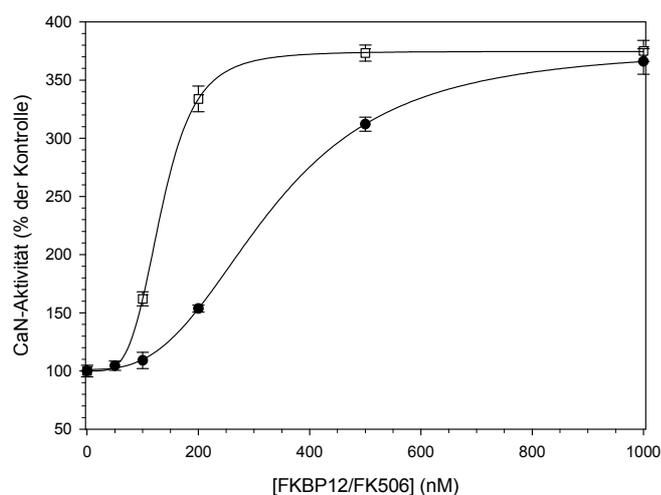


Abb. 4.40: Einfluss von CaM auf die CaN-Aktivierung durch FKBP12/FK506 im pNPP-Test

Die Erhöhung der CaN α /CaN β 1-Aktivität wurde mit steigenden Konzentrationen an FKBP12/FK506 in An- (□) und Abwesenheit (●) von CaM bestimmt. Die Kontrollen wurden ohne CaM und FKBP12/FK506 gemessen. Die dargestellten Werte \pm SD wurden aus drei unabhängigen Versuchen ermittelt.

Aufgrund der Unterschiede der CaN-Inhibition oder -Aktivierung durch FKBP/FK506-Komplexe war es von Interesse zu untersuchen, ob die verschiedenen FKBP/Rapamycin-Komplexe ebenfalls einen Einfluss auf die CaN-Aktivität haben. Bisher war lediglich bekannt, dass FKBP12 im Komplex mit dem immunsuppressiven Medikament Rapamycin CaN nicht inhibiert (Liu et al., 1991). Wie die FKBP/FK506-Komplexe besitzt auch Rapamycin eine hohe Affinität zu den FKBP, mit Inhibitionskonstanten im nanomolaren Bereich (Edlich et al., 2006; Peattie et al., 1992; Yeh et al., 1995).

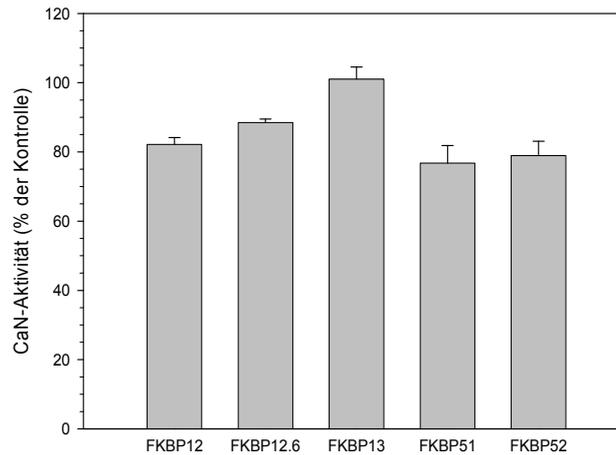


Abb. 4.41: Einfluss der FKBP/Rapamycin-Komplexe auf die CaN-Aktivität im RII-Test

Der maximale Einfluss der FKBP/Rapamycin-Komplexe auf die CaN-Aktivität wurde bestimmt. Die Kontrollen wurden ohne FKBP/Rapamycin gemessen. Die Werte setzen sich aus drei unabhängigen Messungen \pm SD zusammen.

Deshalb wurde die CaN-Aktivität im RII-Peptid-Test mit den verschiedenen FKBP/Rapamycin-Komplexen gemessen. Dafür wurden 15 nM CaN α /CaN B1 mit 150 nM CaM, 20 μ M Rapamycin und 5 μ M FKBP inkubiert. Nach Zugabe von 100 pmol RII-Peptid wurden die Ansätze für 40 min bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden 90 μ l auf eine Scintillationsplatte übertragen, erneut 20 min bei Raumtemperatur inkubiert und im MicroBeta Top-Counter die restliche Radioaktivität

Die Abb. 4.41 zeigt den maximal ermittelten Einfluss der FKBP/Rapamycin-Komplexe. Es wurde keine konzentrationsabhängige Inhibition der CaN-Aktivität gemessen. Ebenfalls keinen Einfluss auf die CaN-Aktivität haben die Komplexe im pNPP-Test. Die Inhibition von CaN spielt somit bei der Rapamycin-vermittelten Immunsuppression keine Rolle.

4.5.1.1 Einfluss der FKBP/FK506-Komplexe auf die zelluläre CaN-Inhibition

Weiterhin wurde die Rolle der FKBP/FK506-Komplexe auf die CaN-Inhibition in Zellen untersucht. Nur ausreichend hoch konzentrierte FKBP, die auch mit FK506 CaN-

Inhibitionskonstanten im nanomolaren Bereich besitzen, sind physiologisch von Bedeutung. Zuerst wurden deshalb die Verteilungen der FKBP in ausgewählten humanen Zelllinien getestet. Die Zellen wurden lysiert, Zelltrümmer wurden abzentrifugiert und die Proteinlösung auf 1 mg/ml eingestellt. Auf ein SDS-Gel wurden neben einer Kontrolle der rekombinant hergestellten Proteine 15 μ l des Zelllysats aufgetragen. Auf einem zweiten Gel erfolgte die Auftragung einer Eichreihe der FKBP. Die Gele wurden geblottet und mit dem jeweiligen anti-FKBP-Antikörper inkubiert.

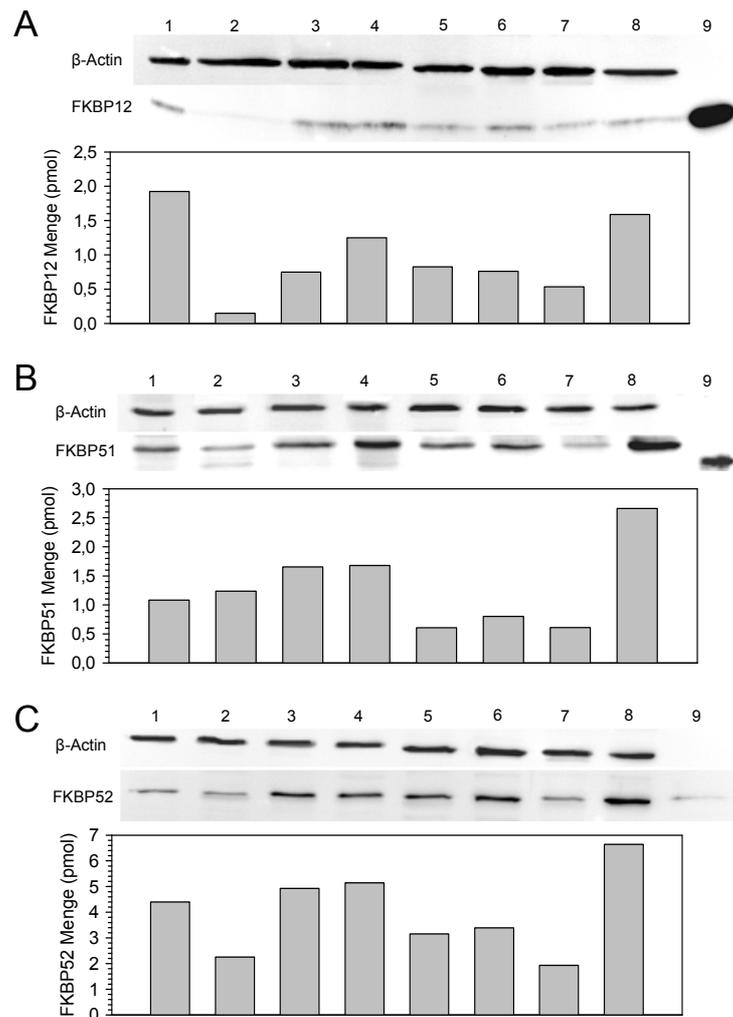


Abb. 4.42: Verteilung von FKBP12, FKBP51 und FKBP52 in ausgewählten humanen Zelllinien

Jeweils 15 μ l des 1 mg/ml Zelllysates der humanen Zelllinien (1- HT29; 2- Y79; 3- Jurkat; 4- HEK 293; 5- SH-SY5Y; 6- HeLa; 7- A431; 8- MCF-7, 9- 5 pmol rekombinantes FKBP12, 0,5 pmol rekombinantes FKBP51 oder 5 pmol FKBP52) wurden auf ein 15 %iges SDS-Gel aufgetragen. Nach dem Blotten wurden die Membranen mit dem jeweiligen anti-FKBP-Antikörper inkubiert. Danach wurden die Blots gestriipt und mit anti- β -Actin-Antikörper behandelt. Die Blots wurde densitometrisch mit Hilfe der Actin-Banden als Ladekontrolle quantifiziert. Mit Hilfe eines zweiten Gels, auf dem verschiedene Konzentrationen des rekombinanten Proteins aufgetragen wurden, konnten die FKBP-Gehalte in den Zellen bestimmt werden.

In Abb. 4.42 ist die Verteilung von FKBP12, FKBP51 und FKBP52 in verschiedenen humanen Zelllinien sichtbar. Zur genaueren Analyse der FKBP Mengen in den Zellen wurden die Western Blots im Anschluss mit anti- β -Actin-Antikörper behandelt. Mit Hilfe der Actin-

Banden, welche als Ladekontrolle dienten, sowie der Eichreihe des rekombinanten Proteins konnten densitometrisch die Verteilungen der FKBP in den humanen Zellen bestimmt werden. In allen humanen Zelllinien konnte sowohl FKBP12, als auch FKBP51 und FKBP52 nachgewiesen werden.

Während jedoch die Menge des FKBP12 in der Retinoblastoma-Zelllinie Y79 mit 0,2 pmol sehr niedrig ist, liegt FKBP12 in relativ hohen Mengen von 2 und 1,5 pmol in den Colonkarzinom-Zellen HT29 sowie in MCF-7-Zellen vor.

Aus Abb. 4.42 geht weiterhin hervor, dass die Expression des FKBP51 in MCF-7-Zellen mit 2,6 pmol im Vergleich zu den anderen Zelllinien relativ hoch ist. Dort wird sogar mehr FKBP51 als FKBP12 exprimiert. Ebenfalls in hohen Konzentrationen liegt FKBP51 in der T-Zell-Leukämie-Zelllinie Jurkat sowie in HEK 293-Zellen vor, während die FKBP51-Expression in den SH-SY5Y- und A431-Zellen mit jeweils 0,5 pmol verhältnismäßig niedrig ist.

Obwohl FKBP52 im Komplex mit FK506 die CaN-Aktivität *in vitro* erst im mikromolaren Bereich inhibieren kann, sind die FKBP52-Mengen in den getesteten Zelllinien höher im Vergleich zu FKBP12 und 51 (Abb. 4.42). Auch FKBP52 wird in MCF-7-Zellen mit 6,7 pmol im Vergleich zu den anderen Zelllinien am höchsten exprimiert. Aber auch in HT29-, Jurkat- und HEK 293-Zellen ist die Expression verhältnismäßig hoch. Am niedrigsten ist die FKBP52-Menge mit 2,2 beziehungsweise 1,8 pmol in Y79- und A431-Zellen. FKBP12.6 und FKBP13 spielen aufgrund ihrer sehr geringen Konzentrationen in den Zellen vermutlich nur eine geringe Rolle in der FK506-vermittelten Immunsuppression.

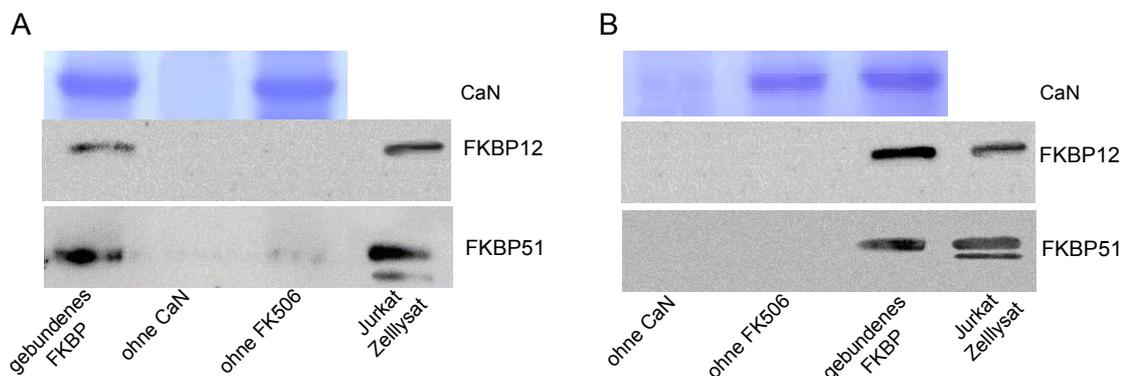


Abb. 4.43: Die FK506-Komplexe mit FKBP12 und 51 aus Jurkat-Zellen interagieren mit CaN

(A) Um FKBP/FK506-Komplexe zu identifizieren, welche in Jurkat-Zellysat mit CaN interagieren, wurde Zellextrakt mit CaN in Anwesenheit von 20 μM FK506 auf einer Ni^{2+} -NTA-Matrix immobilisiert. Die gebundenen Proteine wurden mit Imidazol eluiert und mittels SDS-PAGE sowie Western Blot mit verschiedenen FKBP-Antikörpern analysiert. Als Kontrolle wurden die Ni^{2+} -NTA-Beads mit dem Jurkat-Zellysat ohne CaN inkubiert beziehungsweise mit CaN aber ohne FK506. CaN diente als Ladekontrolle.

(B) Für die Untersuchungen der CaN-Interaktion mit FKBP/FK506-Komplexen unter *in vivo* Bedingungen wurden Jurkat-Zellen in An- und Abwesenheit von 20 μM FK506 für 16 h inkubiert, geerntet und lysiert. Die Analyse erfolgte nun wie unter A beschrieben.

Die physiologische Interaktion von FKBP/FK506-Komplexen mit CaN wurde mit einer Affinitätsmatrix untersucht. An Ni^{2+} -NTA-Sepharose wurde CaN α /CaN B1 durch die His_6 -

fusionierte katalytische Untereinheit gebunden und mit Jurkat-Zellysate in Anwesenheit von 20 μM FK506 inkubiert. Nach verschiedenen Waschschrritten wurden die gebundenen Proteine durch Imidazol eluiert und mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert. Als Kontrollen wurde das Zellysate ohne CaN mit den Ni^{2+} -NTA-Beads inkubiert oder die CaN-beladenen Beads wurden mit Zellysate in Abwesenheit von FK506 inkubiert (Abb. 4.43 A).

Die Western Blots mit unterschiedlichen FKBP-Antikörpern zeigten, dass unter physiologischen Bedingungen neben FKBP12 auch FKBP51 in Anwesenheit von FK506 an CaN binden konnte (Abb. 4.43 A). Andere FKBP konnten durch diese Methode nicht detektiert werden.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde des Weiteren getestet, ob FKBP51 mit FK506 auch in Jurkat-Zellen Komplexe bildet. Für diesen Versuch wurden 20 μM FK506 in die Jurkat-Zellkultur gegeben und für 16 h im Brutschrank inkubiert. Danach wurden die Zellen lysiert und wie im vorhergehenden Experiment auf die mit CaN α /CaN B1 beladenen Ni^{2+} -NTA-Beads gegeben. Die Western Blots gegen verschiedene FKBP zeigen das gleiche Muster. Nur FKBP12 und FKBP51 konnten *in vivo* Komplexe mit FK506 bilden, welche in der Lage waren CaN zu binden (Abb. 4.43 B). Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass neben FKBP12 auch FKBP51 an der Immunsuppression beteiligt ist. Die FKBP12.6, 13 und 52 konnten hierbei nicht detektiert werden, da sie, wie FKBP12.6 und 13, in Jurkat-Zellen in sehr geringer Konzentration vorkommen, oder, wie FKBP52, im Komplex mit FK506 nur eine geringe Affinität zu CaN besitzen (Ergebnisse nicht gezeigt).

Tab. 4.18: Quantitative Analyse der Western Blots der CaN/FKBP/FK506-Affinitätschromatographie

FKBP	FKBP in Jurkat-Zellysate (pmol)	präzipitiertes FKBP (pmol)	präzipitiertes FKBP (%)
FKBP12	19,2	9,17	47,7
FKBP13	3,91	0	0
FKBP51	38,3	3,22	8,41
FKBP52	116	0	0

Die Quantifizierung der Western Blots ergab, dass ungefähr die Hälfte des endogenen FKBP12 mit FK506 an CaN gebunden werden konnte, während es bei FKBP51 nur 8 % waren (Tab. 4.18). Von den präzipitierten FKBP/FK506-Komplexen bestanden ein Drittel aus FKBP51 und der Rest aus FKBP12. Das Ergebnis zeigt, dass auch FKBP51 einen signifikanten Beitrag zur FK506-abhängigen Inhibition des CaN in Jurkat-Zellen leistet.

Die Affinitätsexperimente zeigten, dass FKBP12 und 51 physiologisch mit CaN interagieren, wenn Jurkat-Zellen mit FK506 behandelt wurden. Um die Beiträge der verschiedenen FKBP an der FK506-vermittelten CaN-Inhibition weiter zu unterscheiden, wurde die FKBP12-, 12.6- und 51-Expression in Jurkat-Zellen durch spezifische siRNA reduziert. Anschließend konnte die CaN-Aktivität in den Zelllysaten in Anwesenheit von FK506 mittels eines NFAT Reporter-Gen-Assays bestimmt werden. FKBP12.6 wurde in diesen Versuchen aufgrund seiner großen Homologie zu FKBP12 und seiner ebenso guten Inhibitionskonstante gegenüber CaN im Komplex mit FK506 ebenfalls mitgeführt. Für die Reduzierung der FKBP-Konzentrationen wurden Jurkat-Zellen durch Elektroporation mit den FKBP siRNA's oder einer Kombination aus allen drei siRNA's transfiziert.

Die Wirkung der siRNAs wurde durch Western Blot nachgewiesen und mit *random* RNAi transfizierten Zellen verglichen (Abb. 4.44). Die Ladekontrolle stellte β -Actin dar. Als zusätzliche Kontrolle wurden auch gezeigt, dass die siRNA's die Konzentration der anderen getesteten FKBP nicht beeinflussen. Nach der Transfektion mit der jeweiligen siRNA kann eine Abnahme der Expression des FKBP12, 12.6 oder 51 beobachtet werden.

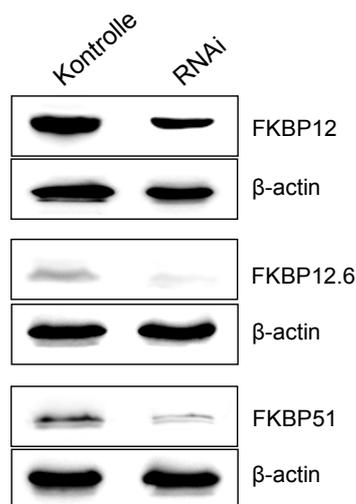


Abb. 4.44: Kontrolle der Wirksamkeit der FKBP-RNAi in Jurkat-Zellen

Die verschiedenen FKBP siRNA's wurden in Jurkat-Zellen transfiziert und die Expression der FKBP nach 10 h durch Western Blot analysiert. Als Kontrolle dienten jeweils mit *random* RNAi transfizierte Zellen. β -Actin wurde als Ladekontrolle verwendet.

Für die NFAT Reporter-Gen-Versuche wurden zusätzlich zu den FKBP siRNA's ein NFAT-Luciferase Reporter-Gen-Plasmid und ein β -Galaktosidase-Plasmid transfiziert. Die β -Galaktosidase wird in den Zellen konstitutiv exprimiert und diente als interner Standard. Nach Zugabe von 20 μ M FK506 wurden diese Zellen mit 2 μ g/ml Ionomycin und 100 ng/ml PMA für 5 h stimuliert und anschließend lysiert. Der Luciferase-Gehalt der Zellen wurde durch Biolumineszenz-Messungen bestimmt.

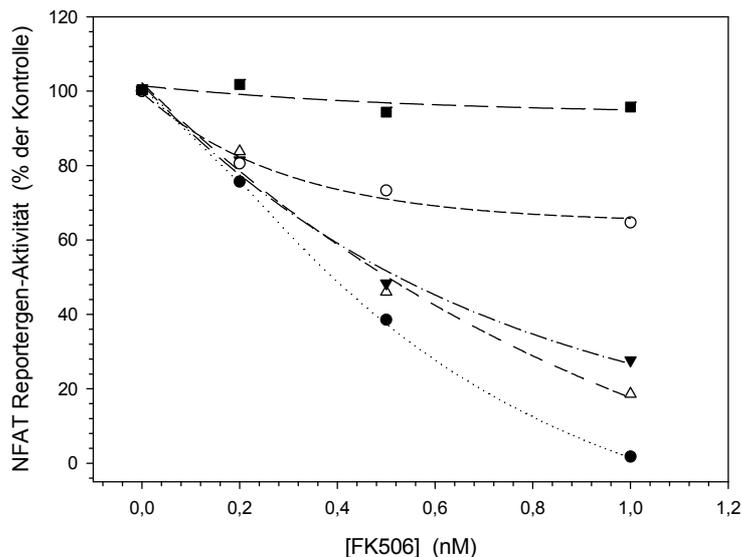


Abb. 4.45: Effekt der FKBP12, FKBP12.6 und FKBP51 siRNA auf die NFAT Reportergen-Aktivität

Die Messungen der NFAT Reportergen-Aktivität wurden mit Hilfe des Luciferase Assay Systems von Promega durchgeführt. Jurkat-Zellen wurden mit FKBP12 (○), FKBP12.6 (▼) oder FKBP51 (△) siRNA transfiziert. Zusätzlich wurden auch alle drei siRNA's in Kombination (■) transfiziert. Mit *random* RNAi transfizierte Zellen (●) dienen als Kontrolle. Der Luciferase-Gehalt der Zellen wurde durch Biolumineszenz-Messung bestimmt. Die Messungen wurden dreimal wiederholt mit einer SD \leq 10 %.

Wie in Abb. 4.45 gezeigt, wurde in Jurkat-Zellen, welche mit der *random* RNAi transfiziert wurden, die CaN-Aktivität und damit auch die NFAT Reportergen-Aktivität in Anwesenheit von FK506 komplett inhibiert. Andererseits konnte CaN durch Zellen, welche mit allen drei siRNA's transfiziert wurden, im getesteten Bereich nicht mehr inhibiert werden. Des Weiteren deuten die Ergebnisse auf einen großen Beitrag des FKBP12 an der FK506-vermittelten CaN-Inhibition hin. Die mit der FKBP12 siRNA transfizierten Jurkat-Zellen reagieren um bis zu 60 % weniger auf FK506 im Vergleich zu den Kontroll-Zellen, während die siRNA's von FKBP12.6 und 51 die NFAT Reportergen Aktivität jeweils um 20 % erhöhten. Neben FKBP12 spielen *in vivo* demnach auch FKBP12.6 und 51 eine Rolle bei der CaN-Inhibition durch FK506.

4.5.1.2 Identifizierung von Aminosäureresten der FKBP für die CaN-Bindung

Die Lösung der Kristallstruktur des CaN/FKBP12/FK506-Komplexes (1tco) gab Aufschluss über die Aminosäuren, welche an der CaN-Bindung beteiligt sind (Griffith et al., 1995). Von besonderer Bedeutung sind Aminosäuren des β -Faltblattes 5 sowie der Loop-Region

zwischen den β -Faltblättern 2 und 3. Daraufhin wurde ein Sequenzalignment des FKBP12 mit den entsprechenden Regionen der anderen FKBP durchgeführt (Abb. 4.46).

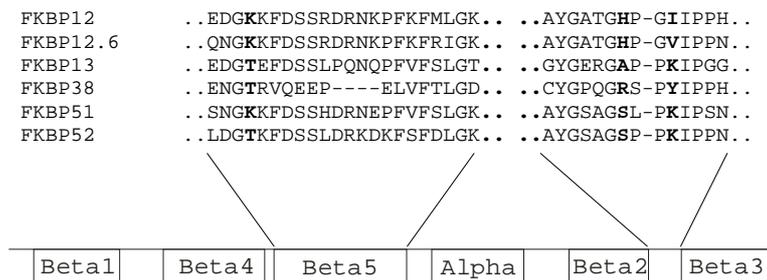


Abb. 4.46: Aminosäure-Sequenzalignment des β -Faltblattes 5 sowie der Loop-Region zwischen β -Faltblatt 2 und 3 der FKBP Domänen von verschiedenen FKBP

Die dargestellten Aminosäuren der FKBP sind wahrscheinlich für die differentielle CaN-Bindung verantwortlich. Die Aminosäuren Lysin 34, Histidin 87 und Isoleucin 90 des FKBP12 sowie die korrespondierenden Aminosäuren der anderen FKBP sind in fett dargestellt.

Die Ergebnisse der Kristallstruktur und des Alignments zusammen ergaben einige Aminosäureaustausche zwischen den FKBP, welche möglicherweise für die sehr unterschiedlichen CaN-Inhibitionskonstanten der FKBP im Komplex mit FK506 verantwortlich sind. Deshalb wurden die Aminosäuren Lysin 34, Histidin 87 und Isoleucin 90 des FKBP12, das FKBP mit der größten Affinität zu CaN im Komplex mit FK506, durch gerichtete Mutagenese verändert und die Auswirkung auf die FK506-Bindung sowie die CaN-Inhibition getestet. Weil FKBP38 im Komplex mit FK506 die niedrigste Affinität zu CaN besitzt, wurden anstelle der Aminosäuren des FKBP12 die korrespondierenden Reste des FKBP38 eingefügt. Neben den FKBP12-Varianten Lysin 34 Threonin, Histidin 87 Arginin und Isoleucin 90 Tyrosin wurde die Isoleucin 90 Lysin-Variante hergestellt, um den Einfluss dieses Aminosäureaustausches, welcher bei FKBP13, 51 und 52 vorhanden ist, zu untersuchen.

Tab. 4.19: Inhibition der PPlase-Aktivität des FKBP12 Wildtyps (WT) sowie der FKBP12-Varianten

FKBP12 Variante	IC ₅₀ (nM)
WT	0,88 ± 0,20
K34T	0,82 ± 0,27
H87R	2,36 ± 0,71
I90Y	1,03 ± 0,26
I90K	2,79 ± 0,53

Um eine mögliche veränderte Bindung der FKBP12-Varianten an FK506 auszuschließen, wurde ihre PPlase-Aktivität in Anwesenheit von FK506 im Vergleich zum Wildtyp bestimmt

Tab. 4.19). Die Varianten Lysin 34 Threonin und Isoleucin 90 Tyrosin haben mit einem IC_{50} -Wert von ungefähr 1 nM eine mit dem Wildtyp sehr ähnliche Inhibitionskonstante. Die PPlase-Aktivität der FKBP12-Varianten Histidin 87 Arginin und Isoleucin 90 Lysin wurde durch FK506 mit einem IC_{50} -Wert von über 2 nM inhibiert. Sie liegen damit etwas über dem Wert des Wildtyps sind aber trotzdem noch vergleichbar und sollten die Bindung an CaN nicht beeinflussen.

Da eine signifikante Beeinflussung der FK506-Bindung durch die eingeführten FKBP12-Mutationen mittels PPlase-Test ausgeschlossen werden konnte, wurde daraufhin die CaN-Inhibition durch die verschiedenen FKBP12-Varianten mit FK506 gemessen. Dadurch konnten genauere Aussagen getroffen werden, welche Aminosäurereste der verschiedenen FKBP die Affinität zu CaN bestimmen. Dafür wurden unterschiedliche Konzentrationen der FKBP12-Varianten mit 10 μ M FK506 und 15 nM CaN A α /CaN B1 10 min bei Raumtemperatur vorinkubiert, um die Bildung der CaN/FKBP/FK506-Komplexe zu gewährleisten. Nach Zugabe von 100 pmol RII-Peptid erfolgte eine Inkubation bei 30°C für 40 min. Auf eine Scintillatorplatte wurden daraufhin 90 μ l der Ansätze pipettiert und erneut 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem Waschen der Platte wurden die Ansätze im β -Counter gemessen.

Aus Abb. 4.47 geht hervor, dass alle FKBP/FK506-Komplexe in der Lage waren, die CaN-Aktivität konzentrationsabhängig zu inhibieren. Ihre Affinitäten zu CaN variierten allerdings stark. Die Histidin 87 Arginin-Variante konnte im Komplex mit FK506 CaN ebenso effektiv inhibieren, wie der FKBP12-Wildtyp. Die anderen FKBP12-Varianten Lysin 34 Threonin, Isoleucin 90 Tyrosin und Isoleucin 90 Lysin haben im Vergleich zum Wildtyp deutlich geringere Affinitäten zu CaN im Komplex zu FK506.

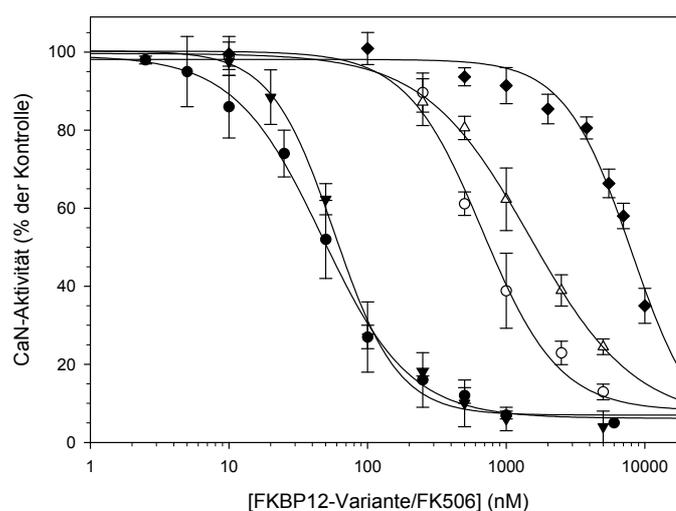


Abb. 4.47: CaN-Inhibition durch FKBP12 Varianten/FK506-Komplexe

Die Inhibition des CaN wurde im RII-Peptid-Test mit 10 μ M FK506 und verschiedenen Konzentrationen FKBP12 WT (●) sowie der FKBP12-Varianten K34T (○), H87R (▼), I90Y (Δ) und I90K (◆) bestimmt. Die Inhibitionskonstanten sind in Tab. 4.19 dargestellt. Die Kontrollwerte ergaben sich aus Messungen ohne FKBP12/FK506. Die Werte \pm SD wurden aus drei voneinander unabhängigen Experimenten ermittelt.

Die Inhibitionskonstanten der FKBP12-Varianten sind in Tab. 4.19 dem Wildtyp gegenübergestellt. Die IC₅₀-Werte des Wildtyps und der H87R-Variante sind mit 47 und 58 nM vergleichbar. Im Gegensatz dazu inhibieren die FKBP12-Varianten Lysin 34 Threonin, Isoleucin 90 Tyrosin und Isoleucin 90 Lysin die CaN Aktivität mit IC₅₀-Werten, die 15-fach, 30-fach beziehungsweise 150-fach niedriger sind im Vergleich zum Wildtyp.

Tab. 4.20: Konstanten der CaN-Inhibition durch die FKBP12-Varianten in Gegenwart von FK506

Die PPlase-Messungen wurden freundlicherweise von Dr. Frank Edlich und Dr. Franziska Jarczowski vorgenommen.

FKBP12 Variante	IC ₅₀ (nM)
WT	47,2 ± 3,12
K34T	676 ± 58,0
H87R	58,1 ± 4,91
I90Y	1460 ± 311
I90K	7980 ± 760

Die Ergebnisse zeigen, dass die Aminosäurereste Lysin 34 und Isoleucin 90 des FKBP12 sowie die korrespondierenden Reste der anderen FKBP für die Interaktion der FKBP/FK506-Komplexe mit CaN verantwortlich sind und die unterschiedlichen Affinitäten zu CaN determinieren.

4.5.2 Beteiligung verschiedener Cyp an der CsA-vermittelten Immunsuppression

Ähnlich wie bei den FKBP gibt es bei den Cyp bislang Hinweise auf CsA-Komplexe mit dem prototypischen Vertreter dieser Gruppe, dem Cyp18, sowie mit Cyp23 und Cyp23a, welche CaN im nanomolaren Bereich inhibieren können (Bram et al., 1993b; Liu et al., 1991). Des Weiteren existieren bisher nur Daten, die zeigen, dass lediglich Cyp18 an der Immunsuppression beteiligt ist (Colgan et al., 2005). Zu allen anderen bekannten Cyp gibt es in Hinsicht auf die CsA-Komplexbildung sowie die Immunsuppression keine Untersuchungen. Aus diesem Grund wurden analog der FKBP-Versuche auch die Cyp auf ihre CsA-Bindung sowie die CaN-Inhibition *in vitro* und *in vivo* analysiert.

4.5.2.1 Identifizierung von CaN-interagierenden Cyp/CsA-Komplexen

Zur Untersuchung, welche Cyp/CsA-Komplexe die CaN-Aktivität inhibieren können, wurde zuerst die Bindung der Cyp an CsA gemessen. Dazu wurden die Aktivität von Cyp18, 18.2a, 22, 23, 23a, 33 und 40 im Protease gekoppelten PPlase-Assay mit CsA gemessen (Tab. 4.21). Es wurden 0,5 mg/ml Chymotrypsin, 1,5 ml 35 mM HEPES/NaOH (pH 7,8) sowie unterschiedliche Konzentrationen Cyp und CsA 5 min vorinkubiert. Nach Zugabe von 40 μ M Substrat wurde die pNA-Freisetzung bei 390 nm gemessen. Cyp18 konnte mit einem IC_{50} -Wert von 2,9 nM am effektivsten durch CsA inhibiert werden. Jedoch wurden die Cyp18.2a, 22, 23 und 23a ebenfalls mit Inhibitionskonstanten unter 10 nM durch CsA inhibiert. Ebenfalls noch im unteren nanomolaren Bereich aber etwas schlechter binden die Cyp33 und Cyp40 an CsA.

Tab. 4.21: Vergleich der Inhibitionskonstanten der PPlase-Aktivität der Cyp mit CsA sowie der CaN-Aktivität durch Cyp/CsA-Komplexe

Die PPlase-Messungen des Cyp18.2a wurden von Dipl.-Biochem. Michaela Frost und die PPlase-Messungen des Cyp 18, 22, 23 und 23a wurden von Suzanne Roß durchgeführt.

Cyp	Inhibition von	
	PPlase-Aktivität mit CsA IC_{50} (nM)	CaN A α /CaN B1-Aktivität mit Cyp18/CsA IC_{50} (nM)
Cyp18	2,91 \pm 0,28	85,4 \pm 5,26
Cyp18.2a	9,83 \pm 0,73	18,9 \pm 2,33
Cyp22	6,74 \pm 0,46	70,0 \pm 6,98
Cyp23	8,42 \pm 0,59	5,01 \pm 0,76
Cyp23a	7,71 \pm 0,43	19,8 \pm 2,12
Cyp33	37,3 \pm 1,17	69,5 \pm 5,67
Cyp40	101 \pm 5,34	138 \pm 6,22

Die Ergebnisse zeigen, dass alle getesteten Cyp CsA sehr fest binden können.

Aus der Literatur war bereits bekannt, dass der Cyp18/CsA-Komplex die CaN-Aktivität sehr effektiv inhibieren kann. Deshalb war es von Interesse, inwiefern andere Cyp/CsA-Komplexe an CaN binden können.

Im RII-Peptid-Test wurden 10 nM CaN α /CaN β 1 mit 150 nM CaM, 10 μ M CsA und unterschiedlichen Konzentrationen an Cyp inkubiert und mit 100 pmol RII-Peptid gemessen. Durch die Auftragung der CaN Aktivität gegen die Cyp/CsA-Konzentrationen, wie in Abb. 4.48 dargestellt, konnten die IC_{50} -Werte berechnet werden (Tab. 4.21). Aus der Abbildung geht hervor, dass alle Cyp im Komplex mit CsA in der Lage sind, die CaN α /CaN β 1-Aktivität konzentrationsabhängig zu inhibieren, allerdings variierten die Inhibitionskonstanten deutlich. Im Gegensatz zu FKBP12 war der prototypische Vertreter der Cyp Cyp18 mit einem IC_{50} von 85 nM nicht der effektivste Inhibitor. Besonders gut konnte Cyp23/CsA mit 5 nM CaN inhibieren, während 27-mal höhere Konzentrationen des Cyp40/CsA-Komplexes für die CaN-Inhibition notwendig sind. Im Vergleich zu Cyp18/CsA zeigte lediglich Cyp40 im Komplex mit CsA eine geringere CaN-Bindung. Im Gegensatz zu den FKBP/FK506-Komplexen inhibieren jedoch alle Cyp/CsA-Komplexe im unteren nanomolaren Bereich.

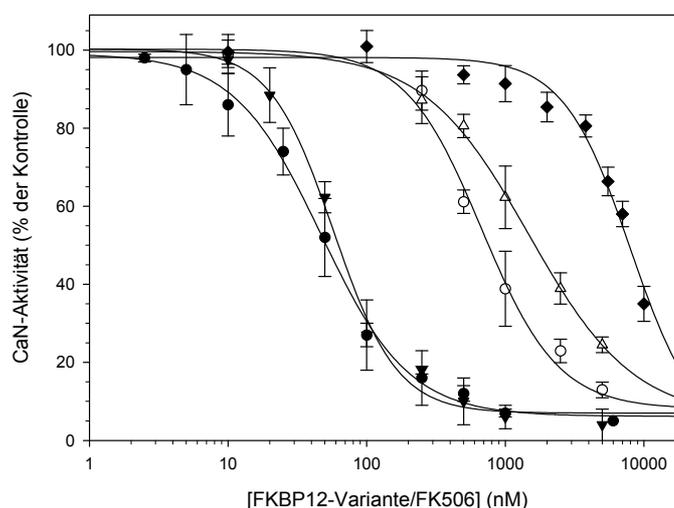


Abb. 4.48: CaN-Inhibition durch Cyp/CsA-Komplexe im RII-Peptid-Test

Die Inhibition des CaN wurde im RII-Peptid-Test mit CsA und verschiedenen Konzentrationen Cyp18 (Δ), Cyp18.2a (\bullet), Cyp22 (\circ), Cyp23 (\square), Cyp23a (\blacksquare), Cyp33 (\blacklozenge) und Cyp40 (\blacktriangledown) bestimmt. Die Inhibitionskonstanten sind in Tab. 4.21 dargestellt. Die Kontrollen wurden ohne Cyp/CsA gemessen. Die Werte setzen sich aus drei unabhängigen Messungen \pm SD zusammen.

Es wurde bereits beschrieben, dass auch Cyp18/CsA die CaN-Aktivität mit dem pNPP als Substrat stimulieren statt inhibieren kann. Deshalb wurde der Einfluss der verschiedenen Cyp/CsA-Komplexe auf die Dephosphorylierung des pNPP als Substrat untersucht. Dafür wurden 45 nM CaN α /CaN β 1 mit 1 μ M CaM, 10 μ M CsA und 3 μ M Cyp für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und mit 10 mM pNPP bei 405 nm gemessen. Wie im RII-Peptid-Test bereits gezeigt, gibt es Unterschiede zwischen den verschiedenen Cyp/CsA-Komplexen.

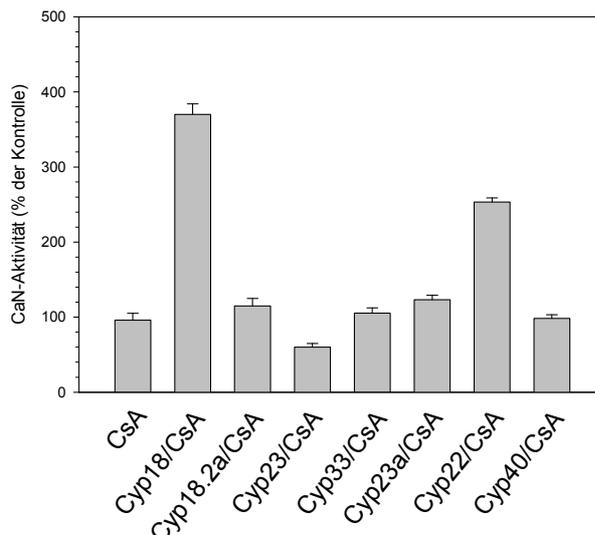


Abb. 4.49: Einfluss der Cyp/CsA-Komplexe auf die CaN-Aktivität im pNPP-Test

Der maximale Einfluss der Cyp/CsA-Komplexe auf die CaN-Aktivität wurde bestimmt. Die Kontroll-Werte ergaben sich aus Messungen ohne die Cyp/CsA-Komplexe. Die dargestellten Werte \pm SD wurden aus drei voneinander unabhängigen Experimenten ermittelt.

Aus Abb. 4.49 ist ersichtlich, dass die CsA-Komplexe mit Cyp18 und Cyp22 mit CaN-Aktivitäten von 370 % und 250 % der Kontrolle, CaN deutlich aktivieren konnten. Beide Aktivierungen konnten konzentrationsabhängig bis zum dargestellten Maximum gesteigert werden. Das zu Cyp18 sehr homologe Cyp18.2a dagegen konnte im Komplex mit CsA die CaN-Aktivität nur geringfügig auf 115 % der Kontrolle erhöhen, während die CsA-Komplexe mit Cyp23, Cyp33 und Cyp40 keine signifikanten Veränderungen aufwiesen. Der Cyp23/CsA-Komplex hingegen inhihierte CaN auf 60 % der Kontrolle.

4.5.2.2 Einfluss der Cyp/CsA-Komplexe auf die zelluläre CaN-Inhibition

Analog zu den FKBP wurde ebenfalls der Einfluss der Cyp/CsA-Komplexe auf die CaN-Aktivität in Zellen untersucht. Bisher war nur bekannt, dass Cyp18 eine Rolle bei der Vermittlung der immunsuppressiven Effekte des CsA besitzt. Zuerst war es deshalb notwendig, die Konzentrationen der Cyp in verschiedenen Zellen zu bestimmen. Nur ausreichend hoch konzentrierte Cyp, die im Komplex mit CsA CaN im nanomolaren Bereich inhibieren, können physiologisch mit CaN interagieren.

Zuerst wurden deshalb die Verteilungen der Cyp in ausgewählten humanen Zelllinien getestet. Die Zellen wurden lysiert, Zelltrümmer wurden abzentrifugiert und die Proteinlösung auf 1 mg/ml eingestellt. Auf ein SDS-Gel wurden neben einer Kontrolle der rekombinaten Proteine 15 μ l der Zelllysate aufgetragen. Auf einem zweiten Gel erfolgte die Auftragung

einer Eichreihe der rekombinant hergestellten Cyp. Die Gele wurden geblottet und mit dem jeweiligen anti-Cyp-Antikörper inkubiert.

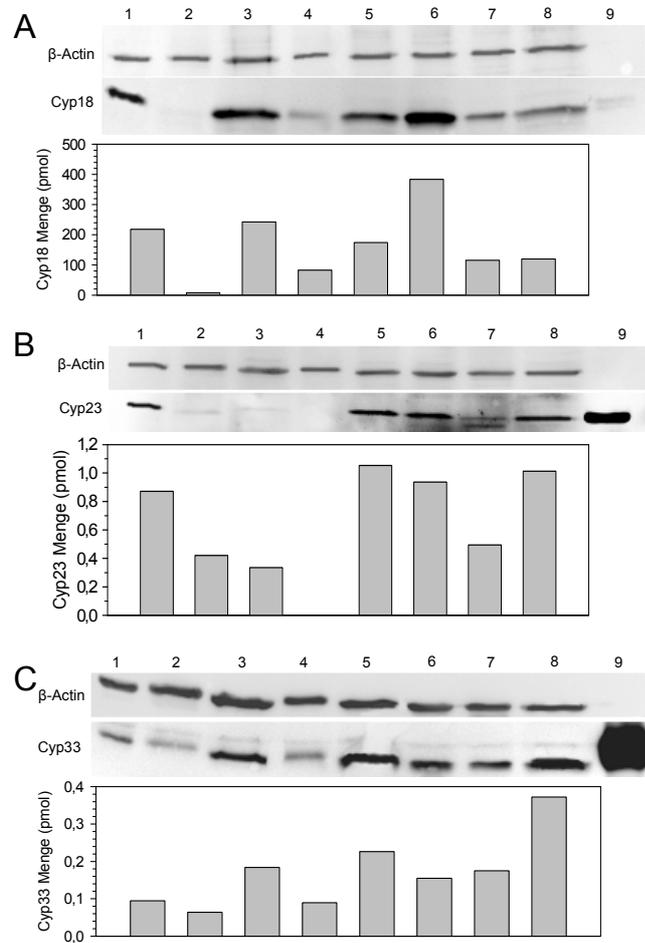


Abb. 4.50: Verteilung von Cyp18, Cyp23 und Cyp33 in ausgewählten humanen Zelllinien

Jeweils 15 µl des 1 mg/ml Zelllysates der humanen Zelllinien (**1**- HT29; **2**- Cyp18 defiziente Jurkat; **3**- Jurkat WT, **4**- HEK 293; **5**- SH-SY5Y; **6**- HeLa; **7**- A431; **8**- MCF-7; **9**- 5 pmol rekombinantes Cyp18, Cyp23 oder Cyp33) wurden auf ein 15 %iges SDS-Gel aufgetragen. Nach dem Blotten wurden die Membranen mit dem jeweiligen anti-Cyp-Antikörper inkubiert. Danach wurden die Blots gestript und mit anti-β-Actin-Antikörper behandelt. Die Blots wurde densitometrisch mit Hilfe der Actin-Banden als Ladekontrolle quantifiziert. Mit Hilfe eines zweiten Gels, auf dem verschiedene Konzentrationen des rekombinanten Proteins aufgetragen wurden, konnten die Cyp-Mengen in den Zellen bestimmt werden.

In Abb. 4.50 sind die Verteilungen von Cyp18, Cyp23 und Cyp33 in verschiedenen humanen Zelllinien dargestellt. Zur genaueren Analyse der Cyp-Mengen in den Zellen wurden die Western Blots als Ladekontrolle im Nachhinein mit anti-β-Actin-Antikörper behandelt. In fast allen humanen Zelllinien konnten Cyp18, Cyp23 und Cyp33 nachgewiesen werden. Cyp18 liegt in sehr hohen Mengen von 380 pmol vor allem in den A431-Zellen vor. Im Vergleich zur Cyp18-Expression wurden ebenfalls die Verteilungen der Cyp23 und 33 in den humanen Zelllinien getestet. Aus Abb. 4.50 geht hervor, dass die Cyp23 Menge mit 1 pmol besonders hoch in SH-SY5Y-Zellen ist. Allerdings wird generell bedeutend weniger Cyp 23 in den Zellen exprimiert als Cyp18. In HEK 293-Zellen konnte kein Cyp23 nachgewiesen werden.

Die Cyp23-Konzentrationen in den Cyp18 defizienten Jurkat- sowie den Wildtyp-Jurkat-Zellen unterscheiden sich kaum.

Da Cyp33 im Komplex mit CsA die CaN-Aktivität *in vitro* in einem ähnlichen Bereich wie Cyp18 inhibieren konnte, wurden die Cyp33-Konzentrationen in den Zelllinien ebenfalls getestet (Abb. 4.50). Die Expressionen des Cyp33 sind in den untersuchten Zelllinien im unteren pmol Bereich und somit deutlich geringer als die Cyp18 und Cyp23-Konzentrationen. Im Vergleich zu den anderen Zelllinien wird Cyp33 in MCF-7-Zellen mit ca. 0,4 pmol am höchsten exprimiert. Aber auch in SH-SY5Y-Zellen ist die Expression verhältnismäßig hoch. Am niedrigsten ist die Cyp33-Konzentration mit 0,07 und 0,08 pmol in Jurkat- und HEK 293-Zellen.

Andere Cyp konnten bisher nicht untersucht werden, da bis jetzt noch keine geeigneten spezifischen Antikörper zur Verfügung stehen.

Des Weiteren wurde getestet, ob es neben Cyp18 auch noch andere Cyp gibt, welche Interaktionspartner für CsA *in vivo* darstellen und dadurch CaN inhibieren können. Zuerst wurden dafür 20 μ M CsA zu Jurkat-Zellen gegeben und für 16 h im Brutschrank inkubiert. Die physiologisch relevante Interaktion von Cyp/CsA-Komplexen mit CaN wurde mit einer Affinitätsmatrix untersucht.

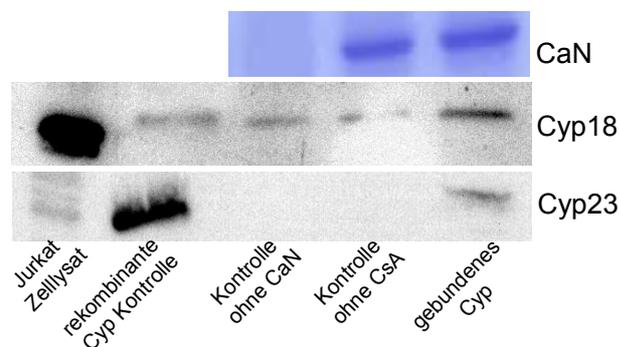


Abb. 4.51: Die CsA-Komplexe mit Cyp18 und 23 interagieren mit CaN in Jurkat-Zellen

Für die Untersuchungen der CaN-Interaktion mit Cyp/CsA-Komplexen unter *in vivo* Bedingungen wurden Jurkat-Zellen in An- und Abwesenheit von CsA für 16 h inkubiert, geerntet und lysiert. CaN wurde an einer Ni^{2+} -NTA-Matrix immobilisiert und anschließend mit 300 μ l Zellextrakt (1 mg/ml) in Anwesenheit von CsA inkubiert. Die gebundenen Proteine wurden mit 250 mM Imidazol eluiert und mittels SDS-PAGE sowie Western Blot mit verschiedenen Cyp-Antikörpern analysiert. Als Kontrolle wurden die Ni^{2+} -NTA-Beads mit dem Jurkat-Zelllysat ohne CaN inkubiert beziehungsweise mit CaN aber ohne CsA. Oben ist ein 15 %iges SDS-Gel mit der CaN-Ladekontrolle zu sehen.

An Ni^{2+} -NTA-Sepharose wurde 500 pmol CaN A α /CaN B1 durch die His₆-fusionierten katalytische Untereinheit gebunden und mit Lysat der CsA behandelten Jurkat-Zellen inkubiert. Nach den Waschschrritten wurden die gebundenen Proteine durch Imidazol eluiert und durch SDS-PAGE und Western Blot analysiert. Als Kontrollen wurde das Zelllysat ohne CaN mit den Ni^{2+} -NTA-Beads inkubiert oder die CaN-beladenen Beads wurden mit Zelllysat in Abwesenheit von CsA inkubiert. Die Western Blots mit unterschiedlichen Cyp-Antikörpern

zeigten, dass neben Cyp18 auch Cyp23 in Anwesenheit von CsA an CaN binden kann (Abb. 4.51).

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass neben Cyp18 auch Cyp23 an der CsA-abhängigen Immunsuppression beteiligt sein könnte. Cyp33 konnte hierbei nicht detektiert werden, da es in Jurkat-Zellen in sehr geringen Konzentrationen vorkommt.

Die Quantifizierung der Western Blots ergab, dass lediglich ein fünfzigstel des endogenen Cyp18 mit CsA an CaN gebunden werden konnte, während es bei Cyp23 20 % waren (Tab. 4.22). Von den präzipitierten Cyp/CsA-Komplexen bestanden jedoch ein sechstel aus Cyp23 und der Rest aus Cyp18. Das Ergebnis zeigt, dass auch Cyp23 einen Beitrag zur CsA-abhängigen Inhibition des CaN in Jurkat-Zellen leisten könnte.

Tab. 4.22: Quantitative Analyse der Western Blots der CaN/Cyp/CsA-Affinitätschromatographie

Cyp	Cyp in 300 µl Jurkat Zelllysate (pmol)	präzipitiertes Cyp (pmol)	präzipitiertes Cyp (%)
Cyp18	3240	68,0	2,10
Cyp23	8,51	1,64	19,2
Cyp33	4,33	0	0

5 Diskussion

5.1 Expression und Reinigung der humanen CaN-Isoformen

Im humanen Genom werden drei verschiedene katalytische Untereinheiten sowie zwei regulatorische Untereinheiten des CaN auf unterschiedlichen Chromosomen kodiert. CaN α und β bilden zusammen mit CaN B1 funktionelle Phosphatasen. Bisher sind jedoch die spezifischen Funktionen und Eigenschaften der Isoformen wenig verstanden. Des Weiteren konnte noch nicht geklärt werden, welche Isoform des CaN B die regulatorische Untereinheit für das humane CaN γ darstellt.

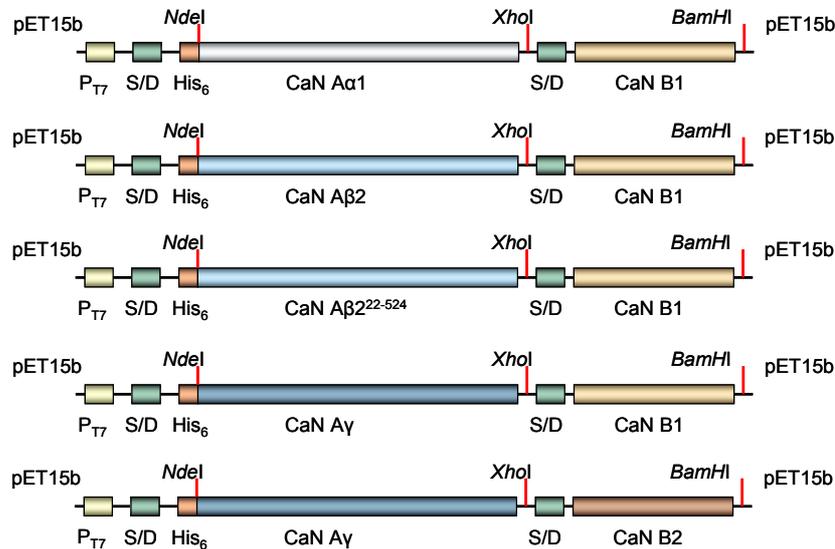


Abb. 5.1: Übersicht aller in der Arbeit klonierten CaN-Konstrukte

Ausgehend von dem Tandemexpressionskonstrukt CaN Aα1/CaN B1 wurden die katalytischen Untereinheiten CaN Aβ2, β²²²⁻⁵²⁴ und γ sowie die Kombination CaN Aγ/CaN B2 in den pET15b-Vektor in dieser Arbeit kloniert. P_{T7}: T7-Promotor, S/D: Shine/Dalgarno-Sequenz, His₆: His-

Ein Ziel der Arbeit war deshalb die Klonierung der drei humanen CaN A-Isoformen als Tandemkonstrukt mit der regulatorischen Untereinheit CaN B (Abb. 5.1). Es sollte sich die Expression und Reinigung der Heterodimere anschließen. Als Ursprung für die Klonierungen diente das Tandemexpressionskonstrukt CaN Aα/CaN B1 (Mondragon et al., 1997). Mittels PCR wurden die beiden katalytischen Untereinheiten β und γ sowie die N-terminal trunkierte β-Isoform CaN Aβ²²²⁻⁵²⁴, welcher die prolinreiche Sequenz fehlt, amplifiziert und anstelle des CaN Aα in den Vektor pET15b ligiert. Die PCR des CaN Aβ erwies sich aufgrund des sehr hohen GC-reichen 5'-Bereiches als sehr schwierig, die Zugabe von 2,5 % DMSO sowie die Verwendung eines optimierten PCR-Protokolls führten jedoch zur Amplifizierung des richtigen PCR-Produktes (Abb. 4.2). Es war bereits bekannt, dass CaN Aα und β mit CaN B1

interagieren. Dagegen ist die regulatorische Untereinheit des CaN $\text{A}\gamma$ jedoch noch nicht identifiziert. Deshalb wurde diese Isoform zusätzlich auch mit CaN B2 überexprimiert. Weil die beiden regulatorischen Untereinheiten *in vivo* am N-terminalen Glycin myristyliert werden (Aitken et al., 1982), wurde die N-Myristyltransferase aus *S. cerevisiae* coexprimiert.

Die Überexpression in *E. coli* BL21 (DE3) und die Reinigung des CaN $\text{A}\alpha$ /CaN B1 erfolgten wie bereits beschrieben (Mondragon et al., 1997) (Abb. 4.3). In der gleichen Weise sollte die Expression und Reinigung der anderen Isoformen durchgeführt werden. Allerdings wurden mit den gewählten Überexpressionsbedingungen nur sehr geringe Proteinausbeuten erhalten, da der Anteil an löslichem Protein niedrig war. Beide CaN-Isoformen neigen zur Bildung von *inclusion bodies*. So ist bereits bekannt, dass die katalytische Untereinheit CaN $\text{A}\alpha$ aufgrund ihrer proteolytischen Instabilität sowie ihrer nicht korrekten Faltung in Abwesenheit der regulatorischen Untereinheit in *E. coli* nicht rekombinant hergestellt werden kann (Mondragon et al., 1997). Nur als Heterodimer mit CaN B1 war es möglich stabiles CaN in ausreichenden Mengen zu erhalten. Die beiden Isoformen CaN $\text{A}\beta$ und γ wurden rekombinant in *E. coli* bisher nicht exprimiert und gereinigt. Die Unterschiede in der Überexpression der CaN-Isoformen könnten durch die Aminosäure-Sequenzen entstehen, welche vor allem an den N- und C-terminalen Bereichen sowie zwischen den Domänen Variabilität aufweisen. So besitzt zum Beispiel CaN $\text{A}\gamma$ mit 7,1 einen deutlich höheren isoelektrischen Punkt als CaN $\text{A}\alpha$ mit 5,6 und 5,8 für CaN $\text{A}\beta$. Auch die prolinreiche Sequenz, welche nur bei CaN $\text{A}\beta$ vorkommt, könnte sich auf die Überexpression und Löslichkeit auswirken. Werden bei der Überexpression von Proteinen *inclusion bodies* gebildet, kann das auf eine Falschfaltung der Proteine durch zu hohe Proteinkonzentrationen innerhalb der Bakterien oder auf für die Bakterien toxische Proteine zurückgeführt werden. Die Tandemexpressionskonstrukte der CaN-Isoformen CaN $\text{A}\beta$ /CaN B1, CaN $\text{A}\beta^{22-524}$ /CaN B1 sowie CaN $\text{A}\gamma$ /CaN B2 wurden deshalb zusammen mit dem Vektor, welcher die N-Myristyltransferase kodiert in BL21(DE3)pLysE-Zellen der Firma Novagen transformiert. Aus der Beschreibung der kompetenten BL21(DE3)pLysE-Zellen ist zu entnehmen, dass das zusätzliche pLysE-Plasmid große Mengen an T7 Lysozym produziert, welches an die T7 RNA-Polymerase bindet und die basale Transkription inhibiert. Es bietet eine sehr gute Kontrolle der Proteinexpression in T7 RNA-Polymerase-basierten Systemen und kontrolliert damit unter anderem auch die Expression von Proteinen, welche zur Bildung von *inclusion bodies* neigen. Des Weiteren wurden diese *E. coli* zur Induktion der Proteinexpression durch IPTG bei niedrigeren Temperaturen von 30°C bei CaN $\text{A}\beta$ / CaN B1 beziehungsweise von 20°C bei den beiden γ -Heterodimeren inkubiert. Eine Erniedrigung der Temperatur während der Expression verlangsamt die Expressionsrate und erhöht damit die Löslichkeit der Proteine sowie die Proteasestabilität. Durch diese Strategien war es möglich CaN $\text{A}\beta$ / CaN B1 sowie CaN $\text{A}\gamma$ / CaN B1 in ausreichenden Mengen zu exprimieren und zu reinigen. Die

Reinigungsvorschrift nach Mondragon et al. wurde aufgrund der Instabilität der beiden Isoformen etwas verändert. Nach dem Aufschluss der Bakterienzellen wurde der Überstand nach der Ultrazentrifugation direkt auf die Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie-Säule aufgetragen. Durch die sehr feste Bindung des CaN B an CaN A mit einem K_d von 10⁻¹³ M war es möglich, das heterodimere Enzym zu reinigen. Es schloss sich eine CaM-Affinitätschromatographie an. Die Überexpression und Reinigung der Variante CaN Aβ²²⁻⁵²⁴/CaN B1 erfolgte analog zu CaN Aβ/CaN B1.

Tab. 5.1: Übersicht über die Überexpression, Reinigung und Ausbeuten der CaN-Isoformen

	CaN Aα/CaN B1	CaN Aβ/CaN B1	CaN Aβ ²²⁻⁵²⁴ / CaN B1	CaN Aγ/CaN B1
Überexpression	BL21(DE3); 1 mM IPTG, 0,2 mM Myristinsäure, 37°C, 3 h	BL21(DE3)pLysE; 1 mM IPTG, 0,2 mM Myristinsäure, 30°C, 4 h	BL21(DE3)pLysE; 1 mM IPTG, 0,2 mM Myristinsäure, 30°C, 4 h	BL21(DE3)pLysE; 1 mM IPTG, 0,2 mM Myristinsäure, 20°C, 5 h
1. Reinigungsschritt	Protaminsulfatfällung	Ni ²⁺ -NTA-Affinitätschromatographie	Ni ²⁺ -NTA-Affinitätschromatographie	Ni ²⁺ -NTA-Affinitätschromatographie
2. Reinigungsschritt	Ammoniumsulfatfällung	CaM-Affinitätschromatographie	CaM-Affinitätschromatographie	CaM-Affinitätschromatographie
3. Reinigungsschritt	Ni ²⁺ -NTA-Affinitätschromatographie			
4. Reinigungsschritt	CaM-Affinitätschromatographie			
Proteinausbeute	5 mg / 6 l-Kultur	2,5 mg / 6 l-Kultur	10 mg / 6 l-Kultur	0,5 mg / 6 l-Kultur

Der Nachweis der Identität der Proteine wurde mittels SDS-PAGE (Abb. 4.3, Abb. 4.4, Abb. 4.5, Abb. 4.23), tryptischem Verdau und anschließender MALDI-TOF-Massenspektrometrie durchgeführt. Die vollständige Myristylierung der Proteine wurde mittels Edman Abbau belegt. Durch die rekombinante Herstellung aller drei humanen CaN A-Isoformen als Heterodimere mit ihrer regulatorischen Untereinheit war es somit erstmals möglich die CaN-Isoformen zu vergleichen und Unterschiede in ihren Funktionen zu analysieren.

Für die vergleichenden Untersuchungen der CaN-Isoformen wurde die Spliceform 1 des CaN Aα gewählt, da in der Literatur alle Charakterisierungen bisher nur mit dieser Form durchgeführt wurden. Außerdem gibt es eine Studie, welche auf die Existenz einer zweiten Spliceform als Protein im Hirn hinwies. Matsui et al. identifizierten zwei unterschiedlich lange

CaN α -Formen im bovinen Hirn, welche nicht durch proteolytischen Abbau entstanden sind (Matsui et al., 1991). Von den drei bekannten Spliceformen des CaN β , welche durch alternatives Splicen entstehen, wurde nur die Spliceform 2 als Protein beschrieben. Die Expression der anderen beiden Formen ist bisher lediglich auf Ebene der mRNA beschrieben worden (Guerini und Klee, 1989; McPartlin et al., 1991). Deshalb wurden in dieser Arbeit CaN α 1 und CaN β 2 für die vergleichenden Untersuchungen verwendet (Abb. 1.5, Abb. 5.1).

Ursprünglich wurde CaN γ als Hoden-spezifisch beschrieben, welches dort mit der regulatorischen Untereinheit CaN B2 interagiert (Liu et al., 2005; Muramatsu und Kincaid, 1992). Die Co-Expressionen des CaN γ mit CaN B1 oder CaN B2 zeigten jedoch, dass nur die ubiquitär-exprimierte regulatorische Untereinheit CaN B1 aktive Dimere mit der γ -Isoform bilden kann (Abb. 4.5). Ausnahmslos führten alle Überexpressionsversuche des CaN γ mit CaN B2 nie zur Bildung eines heterodimeren Komplexes. Es wurden durch die Reinigung über die Ni^{2+} -NTA- und die CaM-Affinitätschromatographie nur geringe Mengen der katalytischen Untereinheit gereinigt. Die regulatorische Untereinheit, welche keine His₆-Fusion besitzt, muss an CaN A gebunden sein, um beide Untereinheiten co-reinigen zu können. Die katalytische Untereinheit des CaN γ allein war jedoch für weitere Versuche ohne die regulatorische Untereinheit zu instabil. Somit stellt wahrscheinlich CaN B1 den nativen Bindepartner für CaN γ dar. Dieses Ergebnis stimmt mit Resultaten einer anderen Arbeitsgruppe überein, wonach CaN γ im Mäuse-Hirn Komplexe mit CaN B1 bildet, welche zu einer funktionstüchtigen Phosphatase führen (Cottrell et al., 2006).

Eine molekular schlüssige Erklärung, warum wahrscheinlich nur CaN B1 an CaN γ bindet, gibt es jedoch nicht. Die Sequenzen der beiden humanen regulatorischen Untereinheiten des CaN sind zu 85 % identisch (Abb. 1.6). So wurde beschrieben, dass die Aminosäuren Valin 115 und Leucin 116 des CaN B eine entscheidende Rolle für die hoch-affine Bindung der regulatorischen Untereinheit an CaN A besitzen und an der Stimulation der Phosphatase-Aktivität beteiligt sind (Watanabe et al., 1996). Es wurde außerdem gezeigt, dass durch die Mutationen einzelner Aminosäurereste im CaN B1 zum Beispiel des Phenylalanin 82 zu Lysin oder des Phenylalanin 153 zu Alanin sowie des Methionin 166 zu Aspartat die Bindung an die katalytische Untereinheit unterbunden wird (Milan et al., 1994). Interessanterweise sind die CaN A-bindenden Aminosäuren des CaN B in beiden Isoformen mit Ausnahme des Methionin 166, an dessen Stelle bei CaN B2 ein Leucin ist, unverändert, so dass vermutlich dieser Aminosäureaustausch oder strukturelle Unterschiede der beiden regulatorischen Untereinheiten eine selektive Bindung des CaN B1 an CaN γ ermöglichen könnten. Vielleicht sind aber auch noch nicht alle Aminosäuren bekannt, welche die Bindung der regulatorischen an die katalytische Untereinheit des CaN vermitteln. Weiterhin liegt das Ca^{2+} -Bindemotiv 3 des CaN B, welches die Aminosäuren 100-112 umfasst, in der Nähe des N-

terminalen Bereich des CaN $\text{A}\alpha$. Außerdem existiert eine Salzbrücke zwischen dem Glutamat 53 des CaN $\text{A}\alpha$ und des Lysin 134 des CaN B. Es wird vermutet, dass über den N-terminalen Bereich sowie die Salzbrücke die aktive Konformation der katalytischen Domäne nach Ca^{2+} -Bindung erreicht wird (Hou et al., 2004). Doch auch diese Aminosäuren sind in beiden CaN B-Isoformen identisch. Es sollte deshalb durch weitere Versuche, wie Co-Immunpräzipitations-Experimente, endgültig geklärt werden, ob das humane CaN $\text{A}\gamma$ und CaN B1 auch *in vivo* funktionell interagieren, die B2 Untereinheit nur in Hoden exprimiert wird und welche katalytische Untereinheit an CaN B2 bindet.

5.2 CaN-Isoformen unterscheiden sich in ihrer Substratspezifität

Obwohl CaN $\text{A}\gamma$ ursprünglich als Hoden-spezifisch beschrieben wurde, gibt es mittlerweile einige Hinweise auf eine ubiquitäre Expression der Isoform. Die Gruppe um Cotrell et al. identifizierten CaN B1 als Bindepartner der γ -Isoform im Hirn der Maus. Daraufhin analysierten sie die mRNA-Expression des CaN $\text{A}\gamma$ und fanden sie in allen Hirnarealen sowie in jedem anderen getesteten Gewebe (Cottrell et al., 2006). Auch andere Arbeitsgruppen konnten die mRNA der γ -Isoform in humanen Hirnarealen nachweisen (Eastwood et al., 2005; Gerber et al., 2003). Allerdings ist das Vorhandensein der mRNA noch kein Hinweis auf die Expression des Proteins, da die Genexpression sowohl auf transkriptionaler als auch auf posttranskriptionaler Ebene reguliert werden kann. In der Niere konnte CaN $\text{A}\gamma$ jedoch als überexprimiertes Protein unter anderem als Ursache für die Entstehung der diabetischen Niere verantwortlich gemacht werden (Gooch et al., 2004a). Da CaN B2 bisher nur als Hoden-spezifisch beschrieben wurde, CaN $\text{A}\gamma$ jedoch mit großer Wahrscheinlichkeit in vielen weiteren Geweben exprimiert wird, liegt die Vermutung nahe, dass CaN B1 tatsächlich der physiologische Bindepartner der CaN A-Isoform ist.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte mittels Isoform-spezifischer Antikörper gezeigt werden, dass CaN $\text{A}\gamma$ in allen getesteten humanen Zelllinien, mit Ausnahme der Retinoblastomazellen Y79, exprimiert wird (Abb. 4.8 C). Eine mögliche Kreuzreaktivität der Antikörper mit den anderen Isoformen konnte ausgeschlossen werden (Abb. 4.9). Damit konnte erstmals das CaN $\text{A}\gamma$ -Protein in humanen Krebszelllinien nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse decken sich mit den mRNA-Expressionen des CaN $\text{A}\gamma$. Der Nachweis des CaN $\text{A}\gamma$ -Proteins in Geweben steht allerdings noch aus. Im Vergleich zu den anderen beiden Isoformen ist die CaN $\text{A}\gamma$ -Expression jedoch meistens geringer. In den Nierenkrebszellen HEK 293 zum Beispiel ist die Menge an CaN $\text{A}\gamma$ mit 5 fmol 26-mal niedriger als die Menge des CaN $\text{A}\alpha$. Des Weiteren ist die Konzentration des CaN $\text{A}\alpha$ in den Neuroblastomazellen SH-SY5Y mit 100 fmol 2,5-mal höher als die des CaN $\text{A}\beta$ mit 40 fmol und 5-mal höher als die

Menge des CaN $\text{A}\gamma$. Die Verteilung deckt sich mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen wonach im Zentralnervensystem die Expression der CaN A-Isoformen folgender Reihenfolge entspricht: CaN $\text{A}\alpha$ > CaN $\text{A}\beta$ > CaN $\text{A}\gamma$ (Gooch, 2006; Usuda et al., 1996).

Tab. 5.2: Verteilung der CaN A-Isoformen in humanen Zelllinien

CaN-Menge (fmol)	Y79	Jurkat	HEK 293	SH-SY5Y	HeLa	A431	MCF-7
CaN $\text{A}\alpha$	32,8	38,3	87,2	117	141	86,0	109
CaN $\text{A}\beta$	42,5	41,8	119	51,8	57,1	28,0	70,6
CaN $\text{A}\gamma$	0	10,0	20,3	5,32	28,5	19,3	31,0

Die Verteilungen von CaN $\text{A}\alpha$ und β sind in der Literatur als ubiquitär beschrieben (Rusnak und Mertz, 2000). Auch in allen getesteten humanen Zelllinien konnten beide Proteine detektiert werden (Abb. 4.8 A, B). Die Ergebnisse mit den Nierenkrebszellen HEK 293, den Retinoblastomazellen Y79, den Neuroblastomazellen SH-SY5Y sowie den Jurkat-T-Zellen decken sich mit bereits publizierten Angaben, wonach beide Isoformen in Geweben wie Niere, Retina, Hirn und im Immunsystem parallel vorkommen, wobei die Expression an CaN $\text{A}\beta$ im Immunsystem jedoch überwiegt, während CaN $\text{A}\alpha$ in der Niere in höheren Konzentrationen exprimiert wird (Gooch, 2006; Gooch et al., 2004a; Jiang et al., 1997; Zhang et al., 1996).

Da durch die einheitliche Verteilung der CaN A-Isoformen in den humanen Zelllinien keine spezifischen Funktionen abgeleitet werden können, wurde die subzelluläre Verteilung der Isoformen in SH-SY5Y-Zellen untersucht (Abb. 4.10). Während bei der Transfektion mit dem Kontrollvektor das rot-fluoreszierende Protein in der gesamten Zelle exprimiert wurde, sind alle CaN A-Isoformen ausschließlich cytoplasmatisch lokalisiert. In der Literatur existieren widersprüchliche Angaben hinsichtlich der subzellulären Lokalisierung von CaN. So konnten im Hirn von Ratten, Rindern und Menschen in Purkinje Zellen und Golgi Zellen unterschiedliche Lokalisierungen gefunden werden. Während sich CaN $\text{A}\alpha$ ausschließlich im Zellkern befindet, war CaN $\text{A}\beta$ nur im Cytoplasma lokalisiert (Usuda et al., 1996). Andere Arbeitsgruppen berichten von einer cytoplasmatischen Lokalisierung von CaN $\text{A}\alpha$ in Kardiomyocyten der Ratte, welches erst nach Stimulation mit Angiotensin II in den Zellkern wandert (Hallhuber et al., 2006). Auch in Zellen der Macula Densa der Niere von Ratten sind CaN $\text{A}\alpha$ und CaN $\text{A}\beta$ co-lokalisiert (Liu et al., 2007). Dagegen zeigten die Ergebnisse der

vorliegenden Arbeit hinsichtlich der zellulären Lokalisierung der CaN A-Isoformen keine Hinweise für Isoform-spezifische Funktionen, so dass die Substratspezifität der Enzyme charakterisiert wurde.

Dazu wurden die rekombinant hergestellten heterodimeren Proteine zuerst auf ihren Gehalt an Sekundärstrukturelementen sowie auf ihre korrekte Faltung mittels Fern-UV-CD-Spektroskopie untersucht. Die CD-Spektren der CaN-Isoformen weisen zwei lokale Minima bei 208 nm und 222 nm auf (Abb. 4.6). Diese Kurvenform ist typisch für Proteine mit einem hohen α -helikalen Anteil. Die Auftragung der molaren Elliptizität gegen die Wellenlänge zeigt, dass das Minimum bei 208 nm bei CaN β /CaN B1 etwas ausgeprägter ist, als bei den anderen beiden Isoformen. Da sich die Kurven in ihrer Form und Ausprägung sehr ähneln, kann von einem gleichen α -helikalen Gehalt sowie einer vergleichbaren Faltung der drei CaN-Isoformen ausgegangen werden. Die ermittelten Spektren sind charakteristisch sowohl für authentisches CaN (Bogumil et al., 2000) als auch für das rekombinante Protein (Hou et al., 2004). Aus dem publizierten Fern-UV-CD-Spektrum des CaN A α /CaN B1, dessen Verlauf dem hier gezeigten Spektrum sehr ähnelt, wurde der prozentuale Anteil der Sekundärstrukturen bestimmt. Demnach besteht das heterodimere Enzym aus CaN A α und CaN B1 zu 23 % aus α -Helices, zu 27,9 % aus β -Faltblättern, zu 22,4 % aus β -turns und 26,7 % sind *random coiled* also unstrukturiert (Hou et al., 2004).

Weiterhin wurde die thermische Stabilität der CaN-Isoformen mittels temperaturabhängiger CD-Spektroskopie ermittelt (Abb. 4.7). Bei einer Wellenlänge von 222 nm ist zu erkennen, dass sich bei steigender Temperatur die Elliptizität bei allen drei CaN-Isoformen von ca. -10000 auf -4000 deg*cm²*dmol⁻¹ erhöht. Diese thermische Denaturierung ist nicht reversibel, da nach Entfaltung des CaN und der Trennung des Dimers die katalytische Untereinheit zur Aggregation neigt. Vor allem bei CaN A α /CaN B1 und CaN A β /CaN B1 sind jeweils zwei Übergangspunkte bei ca. 60°C und 70°C erkennbar. Da bekannt ist, dass die Bindung der regulatorischen Untereinheit des CaN die katalytische Untereinheit stabilisiert (Mondragon et al., 1997), lösen sich vermutlich bei der Denaturierung zuerst die beiden Untereinheiten voneinander. Dies würde eine sofortige Denaturierung der katalytischen Untereinheit zur Folge haben und könnte vielleicht den ersten Übergangspunkt bei 60°C darstellen. Aus Experimenten mit der regulatorischen Untereinheit allein geht hervor, dass CaN B1 stabiler ist und bei 70°C denaturiert. Bei CaN A γ /CaN B1 ist der erste Übergangspunkt nicht eindeutig zu erkennen, so dass sich die beiden Untereinheiten womöglich erst bei höheren Temperaturen voneinander lösen und nachfolgend denaturieren könnten. Diese Hypothese muss jedoch in weiteren Versuchen noch bestätigt werden.

Daraufhin folgte die enzymatische Charakterisierung der drei humanen CaN-Isoformen mit verschiedenen CaN-Substraten, um Isoform-spezifische Substrate zu identifizieren. Zur CaN-Aktivitätsbestimmung werden gewöhnlich die Substrate pNPP, RII-Peptid und Casein

verwendet. Das pNPP ist ein unphysiologisches Phosphatase-Substrat, dessen Dephosphorylierung schnell und sehr gut reproduzierbar bei 405 nm gemessen werden kann. Die Peptid- und Protein-Substrate müssen vor der Verwendung erst mit [γ - ^{33}P] ATP phosphoryliert werden.

Das RII-Peptid stellt einen Teil der RII-Untereinheit der PKA dar. Es ist das am häufigsten verwendete Substrat zur Bestimmung der CaN-Aktivität, weil es leicht herzustellen ist, eine hohe Stabilität sowie eine hohe Spezifität für CaN aufweist.

Zuerst wurde deshalb mit den beiden Substraten pNPP und RII die CaM-Abhängigkeit der drei CaN-Isoformen bestimmt, um die nachfolgenden Messungen mit den optimalen Konzentrationen an CaM durchführen zu können (Abb. 4.11, Abb. 4.13). CaM interagiert nach Ca^{2+} -Bindung mit CaN A und verursacht eine Verdrängung der autoinhibitorischen Domäne vom aktiven Zentrum (Klee et al., 1998). Alle drei Isoformen benötigen die Bindung von CaM zur Ausbildung der vollständigen CaN-Aktivität. Jeweils bei 100 nM CaM war die maximale Aktivierung der CaN-Isoformen erreicht, so dass alle nachfolgenden Messungen bei einer CaM-Sättigung von 150 nM durchgeführt wurden. Sowohl im pNPP-Test als auch mit dem RII-Peptid konnte CaN α /CaN B1 als Isoform mit der höchsten CaM-Aktivierbarkeit bestimmt werden. Die CaM-Aktivierung von CaN β /CaN B1 und CaN γ /CaN ist zwischen den Substraten pNPP und RII-Peptid nicht verändert, während CaN α /CaN B1 eine deutlich stärkere Aktivierung im RII-Test zeigt (Abb. 4.11, Abb. 4.13). Die niedrigere Aktivierung im RII-Test bei der β - und γ - Isoform ist auf eine höhere Basalaktivität zurückzuführen, welche vermutlich durch eine bessere Zugänglichkeit des aktiven Zentrums für das Peptid verursacht wird. Eine Erhöhung der Zugänglichkeit durch proteolytischen Abbau der autoinhibitorischen Domänen und CaM-Bindungsdomäne konnte durch SDS-PAGE, Western Blot und die Interaktion der CaN-Isoformen mittels einer CaM-Sepharose-Chromatographie ausgeschlossen werden. Die EC_{50} -Werte der CaM-Aktivierung sind für CaN β /CaN B1 und CaN γ /CaN B1 niedriger als für α -Isoform, was auf eine bessere Bindung des CaM an beide Isoformen hinweisen könnte. Die verschiedene CaM-Aktivierung der CaN-Isoformen kann zum Beispiel durch die großen C-terminalen Sequenzunterschiede der CaN A-Isoformen entstehen. Die Bereiche vor und nach der autoinhibitorischen Domäne sind sehr heterolog und könnten unterschiedliche Konformationen des gesamten C-terminalen Bereiches verursachen, aufgrund dessen die autoinhibitorischen Domänen auf verschiedene Weise die aktiven Zentren blockieren. So ist die Zugänglichkeit bei CaN β /CaN B1 und CaN γ /CaN B1 für kleinere Substrate nicht blockiert, die CaM-Aktivierung beruht hier wahrscheinlich auf Konformationsänderungen des aktiven Zentrums als Folge der CaM-Bindung. Das könnte auch der Grund für die hohen Basalaktivitäten von CaN β /CaN B1 und CaN γ /CaN B1 im pNPP- und RII-Test sein.

Da Protein-Substrate die wahren Gegebenheiten *in vivo* besser widerspiegeln, wurden die CaN-Isoformen auch mit Casein, DARPP-32, NFAT, Elk-1 und Tau charakterisiert. Casein, ein allgemeines Phosphatase-Substrat, wird in der Literatur neben pNPP und RII-Peptid auch als CaN-Substrat für *in vitro*-Aktivitätsbestimmungen verwendet. NFAT und Elk-1 sind Transkriptionsfaktoren, welche im Immunsystem eine Rolle spielen, während DARPP-32 Signalwege im Gehirn beeinflusst und Tau mit Mikrotubuli im Gehirn assoziiert vorliegt. Bei der Charakterisierung der CaN-Isoformen mit diesen Substraten war es von besonderem Interesse herauszufinden, ob bestimmte Substrate vielleicht nur von einzelnen CaN-Isoformen dephosphoryliert werden können. Dafür wurden mit allen CaN-Substraten die kinetischen Konstanten für die drei CaN-Isoformen bestimmt.

Diese Studie zeigt, dass die verschiedenen CaN-Isoformen unterschiedliche Substratspezifitäten besitzen, jedoch trotzdem in der Lage sind, alle getesteten Substrate zu dephosphorylieren (Abb. 4.12, Abb. 4.14-Abb. 4.21). Einen Überblick der katalytischen Effizienzen der drei CaN-Isoformen für die verschiedenen Substrate liefert die Tab. 5.3.

Hier ist zu sehen, dass das pNPP für alle drei CaN-Isoformen die niedrigste katalytische Effizienz aufweist. Wie aus Tab. 5.4 zu erkennen ist, sind die niedrigen k_{cat}/K_m -Werte auf eine deutlich schlechtere Substratbindung im Vergleich zu den anderen getesteten Substraten zurückzuführen. Dabei wird das kleine artifizielle Substrat pNPP durch CaN $\text{A}\gamma/\text{CaN B1}$ mit $40 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 3-mal schlechter im Vergleich zu den anderen beiden Isoformen dephosphoryliert. Außerdem zeigt Tab. 5.4, dass CaN $\text{A}\alpha/\text{CaN B1}$ und CaN $\text{A}\beta/\text{CaN B1}$ vergleichbare kinetische Konstanten für pNPP besitzen. In der Literatur sind sehr unterschiedliche kinetische Konstanten des CaN für pNPP veröffentlicht. Perrino et al. haben die kinetischen Konstanten von CaN $\text{A}\alpha/\text{CaN B1}$ und CaN $\text{A}\beta/\text{CaN B1}$ verglichen. Sie erhielten K_m -Werte von 45 mM beziehungsweise 83 mM mit pNPP als Substrat (Perrino et al., 2002). Im Vergleich dazu wurden in der vorliegenden Arbeit K_m -Werte für CaN $\text{A}\alpha/\text{CaN B1}$ und CaN $\text{A}\beta/\text{CaN B1}$ von 40 mM und 33 mM berechnet. Dieser Unterschied ist wahrscheinlich auf unterschiedliche Messmethoden und Enzyme zurückzuführen. So verglich die Arbeitsgruppe um Perrino das heterodimere Enzyme CaN $\text{A}\alpha/\text{CaN B1}$ der Ratte mit dem humanen CaN $\text{A}\beta$ im Komplex mit CaN B1 der Ratte. Außerdem wurden die Messungen mit pNPP als Endpunktbestimmungen durchgeführt, während die Werte der vorliegenden Arbeit durch Bestimmung der Anfangsgeschwindigkeiten ermittelt worden sind. Eine andere Arbeit hingegen hat für den humanen CaN $\text{A}\alpha/\text{CaN B1}$ -Komplex einen K_m -Wert von 37 mM publiziert, welcher mit dem Wert von 40 mM aus dieser Arbeit sehr gut übereinstimmt (Mondragon et al., 1997).

CaN besitzt gegenüber dem RII-Phosphopeptid im Durchschnitt 130-mal höhere katalytische Effizienzen im Vergleich zum pNPP als Substrat. Während die k_{cat}/K_m -Werte von CaN $\text{A}\alpha/\text{CaN B1}$ und CaN $\text{A}\beta/\text{CaN B1}$ erneut gut übereinstimmen, dephosphoryliert CaN $\text{A}\gamma/\text{CaN}$

B1 das RII-Phosphopeptid mit $3,5 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ 5-mal schlechter (Tab. 5.3). Werden die K_m und k_{cat} -Werte der CaN-Isoformen verglichen, ist auffällig, dass CaN A β /CaN B1 eine besonders hohe Substrataffinität aufweist, jedoch eine kleinere Wechselzahl besitzt (Tab. 5.4). Die K_m -Werte des CaN A α /CaN B1 für das RII-Phosphopeptid variieren in der Literatur von $20 \text{ }\mu\text{M}$ (Blumenthal et al., 1986) über $32 \text{ }\mu\text{M}$ (Perrino et al., 2002) bis hin zu $372 \text{ }\mu\text{M}$ (Mondragon et al., 1997), während die dazugehörigen k_{cat} -Werte mit $2,7 \text{ s}^{-1}$ (Blumenthal et al., 1986) und $2,3 \text{ s}^{-1}$ (Mondragon et al., 1997) der hier berechneten Wechselzahl entsprechen. Die K_m -Werte sind jedoch untereinander kaum vergleichbar, da zum Beispiel Blumenthal et al. das CaN aus bovinen Herzen gereinigt haben und damit vermutlich eine Mischung aus α - und β -Isoform vermessen haben (Blumenthal et al., 1986).

Tab. 5.3: Vergleich der katalytische Effizienzen der CaN-Heterodimere

Jeder Wert setzt sich aus 3 unabhängigen Messungen zusammen mit $\text{SD} < 10 \%$.

CaN-Isoform	$k_{\text{cat}}/K_m \text{ (mM}^{-1}\text{s}^{-1}\text{)}$						
	pNPP	RII	Casein	NFAT	Elk-1	DARPP-32	Tau
CaN A α /CaN B1	0,108	19,7	1,37	55,1	38,9	104	1,10
CaN A β /CaN B1	0,11	18,0	0,87	52,1	5,90	60,3	0,70
CaN A γ /CaN B1	0,04	3,50	1,21	15,7	18,3	108	0,60

Werden alle Proteinsubstrate verglichen, kann festgestellt werden, dass DARPP-32 für alle drei CaN-Isoformen das beste Substrat darstellt, während Tau und Casein mit deutlich geringerer Effizienz dephosphoryliert werden. Während RII, Casein, Tau, NFAT und Elk-1 hauptsächlich an Serin-Resten phosphoryliert werden, ist DARPP-32 das einzige Threonin-Substrat. Folglich könnten phosphorylierte Threonin-Reste bessere Substrate für CaN darstellen.

Casein weist unter den getesteten CaN-Proteinsubstraten die geringsten katalytischen Effizienzen auf. So wird das Protein im Durchschnitt 79-mal schlechter als DARPP-32 und 36-mal schlechter als NFAT dephosphoryliert (Tab. 5.3). Im Vergleich zu dem Literaturwert von $0,1 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ sind die katalytischen Effizienzen der CaN-Isoformen für Casein in der vorliegenden Arbeit rund 10-mal höher. Diese Differenzen sind wahrscheinlich durch CaN-Präparationen aus verschiedenen Geweben und Spezies beziehungsweise durch unterschiedlich phosphoryliertes Casein verursacht. Während die Gruppe um Wolff und Sved

das bovine CaN aus Hirn reinigten, wurden in dieser Arbeit die humanen CaN-Isoformen rekombinant hergestellt. Weiterhin wurde das Casein durch die Protein-Kinase C phosphoryliert und nicht durch die PKA, so dass eventuell andere Aminosäure-Reste durch CaN dephosphoryliert wurden (Wolff und Sved, 1985).

CaN α /CaN B1 ist die dominierende Tau-Phosphatase, welche das Mikrotubuli-assoziierte Protein mit einer 2-mal höheren katalytischen Effizienz im Vergleich zu den anderen beiden Isoformen dephosphoryliert. In CaN α *knock-out*-Mäusen wird Tau unter anderem am Serin 396 und Serin 404 hyperphosphoryliert (Kayyali et al., 1997). Die Hyperphosphorylierung dieser Serinreste spielt beim Krankheitsverlauf von Alzheimer eine wichtige Rolle und lässt den Schluss zu, dass CaN α eine entscheidende Funktion bei der Dephosphorylierung des Tau-Proteins besitzt. Die katalytischen Effizienzen der CaN-Isoformen für Tau, welche in der vorliegenden Arbeit bestimmt wurden, zeigen allerdings nur relativ geringe Unterschiede in der Tau-Dephosphorylierung. Die an CaN α -defizienten Mäusen gezeigte spezifische Dephosphorylierung des Tau-Proteins durch CaN α konnte somit *in vitro* nicht nachgewiesen werden. Eine mögliche Erklärung könnte die Phosphorylierung zusätzlicher Reste im *in vitro* Phosphorylierungsansatz darstellen, welche auch durch die beiden anderen Isoformen dephosphoryliert werden können. Eine weitere Ursache könnte eine unterschiedliche Lokalisierung der CaN-Isoformen im Hirn darstellen (Usuda et al., 1996). Weiterhin zeigen CaN α *knock-out*-Mäuse negative Effekte auf die Depotenzierung der synaptischen Übertragung im Hippocampus, während die Langzeit-Depression und die Langzeit-Potenzierung im Hirn nicht verändert sind (Kayyali et al., 1997). Die Langzeit-Potenzierung ist abhängig von synergistischen Mechanismen, an denen die Phosphorylierung von CREB und DARPP-32 durch die PKA beteiligt sind. Die in dieser Arbeit gezeigten katalytischen Effizienzen der CaN-Isoformen gegenüber dem Substrat DARPP-32 zeigen, dass CaN α /CaN B1 und CaN γ /CaN B1 DARPP-32 mit vergleichbarer katalytischer Effizienz von 104 und 108 $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ dephosphorylieren können. Im Vergleich dazu besitzt CaN β /CaN B1 nur einen $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ -Wert von 60,3 $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$. Diese Ergebnisse zeigen, dass die γ -Isoform den Verlust von CaN α im Hirn kompensieren könnte und dadurch auch die Langzeit-Potenzierung in CaN α *knock-out*-Mäusen nicht beeinflusst ist. Für diese Hypothese spricht auch die Beteiligung reduzierter CaN γ Expressions-Level an der Ausbildung von Schizophrenie (Eastwood et al., 2005). Denn interessanterweise wird eine veränderte Phosphorylierung des DARPP-32 ebenfalls mit Schizophrenie verbunden (Albert et al., 2002). Verringerte CaN-Aktivität und die damit verbundene permanente DARPP-32-Phosphorylierung, welche zur Inhibition der PP1 und der erhöhten Expression CREB-abhängiger Gene führt, könnte unter anderem eine Ursache für Schizophrenie sein (Svenningsson et al., 2003).

Im Vergleich zu den hier gezeigten katalytischen Konstanten der CaN-Isoformen für DARPP-32 wurde in der Literatur ein k_{cat} -Wert von $0,2 \text{ s}^{-1}$ und ein K_{m} -Wert von $1,6 \mu\text{M}$ beschrieben, welche sehr gut mit den in dieser Arbeit berechneten Werten von $0,23 \text{ s}^{-1}$ beziehungsweise $2,2 \mu\text{M}$ für CaN $\text{A}\alpha/\text{CaN B1}$ übereinstimmen (King et al., 1984). Perrino et al. veröffentlichten für CaN $\text{A}\alpha/\text{CaN B1}$ eine Substrataffinität für DARPP-32 von $6,2 \mu\text{M}$ und für CaN $\text{A}\beta/\text{CaN B1}$ von $21 \mu\text{M}$ (Perrino et al., 2002). Allerdings verwendete diese Arbeitsgruppe CaN aus Ratte sowie ein Peptid welches von der DARPP-32-Phosphorylierungsstelle abgeleitet worden ist.

Im Gegensatz zur vermuteten Funktion von CaN $\text{A}\gamma$ bei der DARPP-32-Dephosphorylierung, besitzt die γ -Isoform eine 3-mal niedrigere katalytische Effizienz für das Substrat NFAT im Vergleich zu den anderen CaN-Isoformen (Tab. 5.3). Die K_{m} - und k_{cat} -Werte für NFAT zeigen, dass CaN $\text{A}\alpha/\text{CaN B1}$ mit $2,04 \mu\text{M}$ die niedrigste Substrataffinität besitzt, während CaN $\text{A}\beta/\text{CaN B1}$ mit $0,69 \mu\text{M}$ NFAT 3-mal besser binden kann (Tab. 5.4). CaN $\text{A}\gamma/\text{CaN B1}$ weist mit $0,2 \text{ s}^{-1}$ auch die niedrigste Wechselzahl auf. Die Analyse der NFAT Reportergen-Aktivität mit SH-SY5Y-Zellen, welche mit den verschiedenen CaN-Isoformen transfiziert wurden, ergab deutlichere Unterschiede in der Substratspezifität (Abb. 4.18).

Tab. 5.4: K_{m} - und k_{cat} -Werte der CaN-Heterodimere für die verschiedenen Substrate

Jeder Wert setzt sich aus 3 unabhängigen Messungen zusammen mit SD < 10 %.

CaN-Isoform	pNPP		R11		NFAT		DARPP-32	
	K_{m} (μM)	k_{cat} (s^{-1})						
CaN $\text{A}\alpha/\text{CaN B1}$	39600	4,31	136	2,76	2,04	0,11	2,22	0,23
CaN $\text{A}\beta/\text{CaN B1}$	33300	3,70	16,7	0,36	0,69	0,04	0,70	0,04
CaN $\text{A}\gamma/\text{CaN B1}$	117000	2,23	246	0,87	1,27	0,02	0,94	0,13

CaN $\text{A}\alpha$ dephosphoryliert NFAT 1,5-fach effizienter als CaN $\text{A}\beta$, während CaN $\text{A}\gamma$ keinen Effekt auf die NFAT-Aktivität im zellulären System besitzt. Die Differenzen zu den *in vitro*-Messungen lassen sich durch unterschiedlich verwendete NFAT-Isoformen erklären. Während *in vitro* die kinetischen Konstanten mit einer verkürzten Form des NFATc1 bestimmt wurden, erfolgten die NFAT Reportergen-Aktivitäts-Messungen mit endogenem NFAT. Die Dephosphorylierung des NFAT spielt *in vivo* eine sehr wichtige Rolle bei der antigenspezifischen Immunantwort. Eine veränderte Immunantwort geht zurück auf eine

defekte NFAT-Aktivierung, welche in CaN α -defizienten T-Zellen beobachtet wurde (Zhang et al., 1996). CaN β -defiziente Mäuse zeigen Defekte in der T-Zell-Entwicklung, welche ebenfalls auf das Ausbleiben der NFAT-Aktivierung zurückzuführen sind (Bueno et al., 2002a). Eine Analyse der Expressions-Muster der CaN-Isoformen deutet auf eine besondere Rolle von CaN β im Immunsystem hin, da sie die dominierende Isoform in B- und T-Zellen, sowie in Milz und Thymus ist (Bueno et al., 2002a). Im Herzen wurde CaN β als Regulator der Hypertrophie in Kardiomyocyten in Verbindung gebracht (Bueno et al., 2002c). Im Immunsystem und im Herzen konnte somit bereits gezeigt werden, dass beide Isoformen trotz ähnlicher katalytischer Konstanten für NFAT unterschiedliche Funktionen besitzen. (Bueno et al., 2002a; Bueno et al., 2002c; Zhang et al., 1996). Zusammen mit den hier vorliegenden Aktivitätsmessungen spielen sowohl CaN α als auch CaN β eine wichtige Rolle bei der Dephosphorylierung von NFAT. Im Gegensatz dazu gibt es für das CaN γ keine Hinweise auf eine Funktion in NFAT-Signalwegen.

Der Transkriptionsfaktor Elk-1 wird 7-mal effizienter durch CaN α /CaN B1 im Vergleich zu CaN β /CaN B1 dephosphoryliert. Die katalytische Effizienz des CaN γ /CaN B1 für Elk-1 liegt mit $18,3 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ um die Hälfte unter CaN α /CaN B1 (Tab. 5.3). Die Präferenz des Elk-1 für CaN α konnte durch die Messungen der Elk-1 Reporter-Gen-Aktivität bestätigt werden (Abb. 4.20). Nach der Phosphorylierung durch MAP-Kinasen am Serin 383 initiiert Elk-1 die Transkription von Genen, deren Produkte wiederum Gene von Wachstumsfaktoren induzieren (Gille et al., 1995; Janknecht et al., 1993; Marais et al., 1993). Da CaN die Dephosphorylierung des phosphorylierten Elk-1 katalysiert, bewirkt der Ca^{2+} -Einstrom aus intrazellulären Speichern einen negativen Effekt auf die Induktion Elk-1-abhängiger Gene (Sugimoto et al., 1997). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit weisen darauf hin, dass in Geweben mit CaN β als dominierender CaN-Isoform der cytosolische Ca^{2+} -Einstrom geringere Auswirkungen auf die Transkriptionsaktivität des Elk-1 besitzt als in Geweben mit hoher CaN α -Expression. Die Substrat-Selektivität sowie die Expressionsmuster können demzufolge die Ca^{2+} -abhängige Genexpression bestimmen.

Der Vergleich der kinetischen Konstanten der CaN-Isoformen zeigt unterschiedliche Substratpräferenzen, welche zu distinkten spezifischen Funktionen der Isoformen beitragen können. Obwohl die Aktivitäten der Isoformen sich teilweise deutlich unterscheiden, waren jedoch alle Isoformen in der Lage, die getesteten Substrate zu dephosphorylieren. Die Identifizierung von Substraten, welche ausschließlich nur durch eine Isoform dephosphoryliert werden, bleibt ein Ziel weiterer Arbeiten.

Obwohl die katalytischen Zentren der drei CaN-Isoformen sehr homolog sind, zeigen die Isoformen unterschiedliche Substratspezifitäten. Diese Tatsache könnte ein Hinweis auf sekundäre Bindestellen der CaN-Isoformen innerhalb der Substrate sein, welche die kinetischen Konstanten der Isoformen für die jeweiligen Substrate beeinflussen. Von einigen

CaN-Substraten sind solche Bindestellen bereits bekannt. CaN bindet zum Beispiel über zwei unterschiedliche Motive an die regulatorische Domäne des NFAT. So wird die CaN-Interaktion mit den verschiedenen NFAT-Isoformen durch die unterschiedlichen Sequenzen der sogenannten LxVP-Motive und PxlIT-Motive innerhalb der NFAT geregelt (Luo et al., 1996; Martinez-Martinez et al., 2006).

LxVP-Motiv	
NFATc3	QFLSVPSP
DARPP-32	QF SVPAP
RII	DL DVP IR

PxlIT-Motiv	
NFATc3	PSIQIT
Tresk	PQIVID
Elk-1	PSISVD

Abb. 5.2: CaN-Erkennungssequenzen in unterschiedlichen Substraten

Die Erkennungssequenzen des CaN im NFATc3 und Tresk sind bereits beschrieben. Sie leiten sich von den allgemeinen Motiven LxVP und PxlIT der NFAT-Proteine ab. Durch einen Aminosäuresequenz-Vergleich konnten ähnliche Motive in anderen CaN-Substraten wie DARPP-32, RII und Elk-1 gefunden werden. Die Aminosäuren, welche den allgemeinen Erkennungssequenzen entsprechen sind rot gekennzeichnet.

Beide Motive wurden seit ihrer Entdeckung für eine Vielzahl weiterer Proteine als CaN-Bindestellen beschrieben (Abb. 5.2). Das PxlIT-CaN-Bindemotiv ist bisher in NFATc1-c4, im humanen K⁺-Kanal TRESK, in AKAP79, in einigen CaN-Substraten der Hefe, wie Crz1p, und Slm1p sowie in Virusproteinen, wie dem p12^l Protein des humanen T-Lymphotropen Virus und dem A238L des Afrikanischen Schweinefieber-Virus identifiziert worden (Dell'Acqua et al., 2002; Kim et al., 2003; Li et al., 2007; Martinez-Martinez et al., 2006). Die zweite CaN-Bindesequenz LxVP existiert in allen C-terminalen Bereichen der regulatorischen Domänen der NFAT-Proteine (Martinez-Martinez et al., 2006). Neuere Arbeiten zeigen jedoch, dass Proteine in denen einzelne Reste der allgemeinen Sequenzmotive PxlIT und LxVP ausgetauscht sind, ebenfalls mit hoher Affinität mit CaN interagieren können. So bindet TRESK, welches das PxlIT-Motiv nur in einer abgewandelten Form besitzt, mit einem K_d von 10 µM an CaN. So ist es möglich, dass sekundäre CaN-Bindestellen in ähnlicher Form wie bei NFAT auch in anderen Substraten vorkommen. Wie in Abb. 5.2 dargestellt ist, besitzen DARPP-32 und Elk-1 ebenfalls Sequenzmotive, die den bereits bekannten sekundären CaN-Bindestellen ähneln. So wäre es möglich, dass die CaN-Isoformen die sekundären Bindemotive mit unterschiedlicher Affinität binden. Außerdem kann nicht ausgeschlossen werden, dass noch weitere Motive die CaN-Bindung an die Substrate regulieren und damit die Spezifität der CaN-Isoformen bestimmen können.

5.3 Die prolinreiche Sequenz des CaN A β beeinflusst die katalytischen Konstanten

Die kinetischen Analysen der CaN-vermittelten Dephosphorylierung verschiedener Substrate weist nicht nur auf Unterschiede der CaN-Isoformen hinsichtlich der Substratspezifität hin, sondern auch im Hinblick auf die Wechselzahl und die Substratbindung. Obwohl CaN A α /CaN B1 und CaN A β /CaN B1 für NFAT und RII vergleichbare katalytische Effizienzen besitzen, unterscheiden sich die k_{cat} und K_m -Werte deutlich. Bei allen Substraten bei denen eine k_{cat} - und K_m -Wert-Bestimmung möglich war, zeigt CaN A β /CaN B1 bessere Bindungsaffinitäten als die α und γ -Isoform. Im Vergleich mit CaN A α /CaN B1 wurde für CaN A β /CaN B1 zum Beispiel ein 3-mal niedrigerer K_m -Wert mit NFAT und DARPP-32 berechnet, mit dem RII-Peptid war die Substratbindung sogar 7-mal höher. Gegenüber CaN A γ /CaN B1 sind die K_m -Werte des CaN A β /CaN B1 für das RII-Peptid und für NFAT 15-mal beziehungsweise 2-mal niedriger. Mit Ausnahme des NFAT besitzt CaN A β /CaN B1 für alle getesteten Peptid- und Proteinsubstrate die niedrigste Wechselzahl (Tab. 5.3). Da keine signifikanten Unterschiede zwischen CaN A α /CaN B1 und CaN A β /CaN B1 hinsichtlich der kinetischen Konstanten für das kleine, artifizielle Substrat pNPP beobachtet wurden, könnte das ein Hinweis auf mögliche sekundäre Bindestellen des CaN A β an die Substrate sein, welche bei der Erkennung der Proteinsubstrate eine Rolle spielen. Aminosäure-Sequenzanalysen der drei humanen CaN A-Isoformen zeigen, dass die katalytischen Domänen hoch konserviert sind, während die *N*- und *C*-terminalen Bereiche der Isoformen sehr unterschiedlich sind (Abb. 1.4). Der *N*-terminale Bereich des CaN A β weist eine für die CaN A-Isoformen einzigartige strukturelle Besonderheit auf. Er beinhaltet 11 aufeinander folgende Prolinreste. Zur Struktur dieses *N*-Terminus können keine Aussagen getroffen werden, da bisher nur die α -Isoform kristallisiert wurde. Durch molekulare Modellierung wurde auf eine PPII geschlossen (Kelly et al., 2001). Polyprolin-Motive sind aus einer Vielzahl von Proteinen bekannt und spielen eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion, der Zellmigration, der Transkription, der Immunantwort sowie als DNA-Bindemotiv (Cohen et al., 1995; Hicks und Hsu, 2004; Pawson, 1995). Weiterhin bilden Polyproline Erkennungsstellen für Protein-Protein-Interaktionen. So binden unter anderem die SH3- und WW-Domänen prolinreiche Sequenzen (Kelly et al., 2001; Ren et al., 1993). Um einen möglichen Einfluss des *N*-terminalen Polyprolin-Motives von CaN A β auf die vergleichsweise hohen Substrat-Affinitäten dieser Isoform zu untersuchen, wurde eine verkürzte Variante des CaN A β hergestellt. Dem CaN A β^{22-524} /CaN B1 fehlt der prolinreiche *N*-terminale Bereich, die funktionalen Domänen sind aber nicht verändert. Die Klonierung und Reinigung der Variante erfolgte nach der gleichen Reinigungsstrategie wie beim CaN A β /CaN B1. Die vergleichende Analyse der beiden CaN β -Varianten mittels Fern-UV-CD-Spektroskopie zeigte, dass das

CaN A β ²²⁻⁵²⁴/CaN B1 trotz der fehlenden 21 N-terminalen Aminosäuren eine ähnliche Struktur wie das CaN A β /CaN B1 aufweist (Abb. 4.24). Die prolinreiche Sequenz hat demnach keinen Einfluss auf die Faltung des Proteins. Auch die Spektren der thermischen Denaturierung der Variante zeigen die für CaN A β /CaN B1 typischen Übergangspunkte bei 60°C und 70°C (Abb. 4.25).

Auch die Untersuchungen zur subzellulären Verteilung zeigten keine Unterschiede in der Lokalisierung der beiden CaN A β -Varianten. So wies das CaN A β ²²⁻⁵²⁴ ebenfalls eine cytoplasmatische Lokalisierung auf (Abb. 4.26). Der prolinreiche N-terminale Bereich des CaN A β ist folglich nicht für die subzelluläre Lokalisierung dieser CaN A-Isoform verantwortlich.

Die enzymologische Charakterisierung des CaN A β ²²⁻⁵²⁴/CaN B1 erfolgte im ersten Schritt über die Bestimmung der CaM-Abhängigkeit mit den Substraten pNPP und RII (Abb. 4.27, Abb. 4.29). Trotz einer höheren Basalaktivität des CaN A β ²²⁻⁵²⁴/CaN B1 ohne CaM in beiden Assays im Vergleich zu CaN A β /CaN B1 sind die maximalen Aktivierungen der beiden Varianten durch CaM ähnlich. Die Ergebnisse der CD-Spektroskopie sowie die Untersuchungen der subzellulären Lokalisierung und der CaM-Abhängigkeit zeigen, dass die grundlegenden Eigenschaften der verkürzten β -Isoform nicht verändert sind und eine weiterführende Charakterisierung hinsichtlich der Ermittlung der kinetischen Konstanten erfolgen konnten.

Tab. 5.5: Vergleich der kinetischen Konstanten des CaN A β ²²⁻⁵²⁴/ CaN B1 gegenüber CaN A β /CaN B1

Jeder Wert setzt sich aus 3 unabhängigen Messungen zusammen mit SD < 10 %.

Substrat	CaN-Isoform	K _m (μM)	k _{cat} (s ⁻¹)	k _{cat} /K _m (mM ⁻¹ s ⁻¹)
pNPP	CaN A β /CaN B1	33300	3,72	0,11
	CaN A β ²²⁻⁵²⁴ /CaN B1	35200	6,36	0,18
RII	CaN A β /CaN B1	16,7	0,31	18,0
	CaN A β ²²⁻⁵²⁴ /CaN B1	125	2,09	16,7
DARPP-32	CaN A β /CaN B1	0,70	0,04	60,3
	CaN A β ²²⁻⁵²⁴ /CaN B1	6,93	0,53	76,6
NFAT	CaN A β /CaN B1	0,69	0,04	52,1
	CaN A β ²²⁻⁵²⁴ /CaN B1	2,62	0,18	67,9

Die Bestimmung der kinetischen Konstanten des CaN A β ²²⁻⁵²⁴/CaN B1 erfolgte mit den Substraten pNPP, RII, DARPP-32 und NFAT (Tab. 5.5). Diese Messungen zeigen, dass CaN A β ²²⁻⁵²⁴/CaN B1 im Vergleich zu CaN A β /CaN B1 deutlich geringere Substrataffinitäten aufweist, während jedoch die Reaktionsgeschwindigkeiten und damit die Wechselzahlen zunehmen. Im Gegensatz dazu verändern sich die katalytischen Effizienten nur geringfügig. Fehlt der *N*-terminale Bereich des CaN A β sind die kinetischen Konstanten mit denen des CaN A α /CaN B1 vergleichbar. Dagegen hat das prolinreiche Motiv des CaN A β nur einen sehr geringen Einfluss auf den K_m -Wert, wenn pNPP als Substrat verwendet wird. Die Substrataffinitäten der Varianten sind mit 33 mM für den Wildtyp und 35 mM für die Variante vergleichbar. Im Unterschied dazu erhöht sich der K_m -Wert des CaN A β ²²⁻⁵²⁴/CaN B1 im Vergleich zum CaN A β /CaN B1 um das 8-fache mit dem RII-Peptid, um das 10-fache mit DARPP-32 und um das 4-fache mit NFAT. Die prolinreiche Sequenz des CaN A β hat demzufolge nur einen Einfluss auf die Interaktion mit Peptid- und Proteinsubstraten. Die Wechselzahlen jedoch sind durch die Deletion der PPII bei allen Substraten um mindestens das Doppelte erhöht (Tab. 5.5).

Die Ergebnisse zeigen, dass der prolinreiche *N*-terminale Bereich des CaN A β die Substratbindung und die Reaktionsgeschwindigkeit bestimmt und somit auch Substratpräferenzen sowie spezifische physiologische Funktionen in der Zelle beeinflussen könnte. Der molekulare Mechanismus, wie diese Sequenz die kinetischen Konstanten beeinflusst ist noch nicht geklärt. Durch die Kristallstruktur des CaN A α im Komplex mit CaN B1 ist bekannt, dass der *N*-terminale Bereich der katalytischen Untereinheit keinen direkten Kontakt zur katalytischen Domäne und Substratbindungsregion besitzt (Huai et al., 2002). Jedoch zeigt die Kristallstruktur, dass der *N*-terminale Bereich eines CaN A-Moleküls mit dem aktiven Zentrum eines zweiten CaN A-Moleküls in der asymmetrischen Einheit interagiert. Jedoch ist die biologische Relevanz dieser Beobachtung noch nicht geklärt und die Frage, ob die Interaktion nicht durch die Kristallisierung verursacht ist, bleibt weiterhin offen (Huai et al., 2002). Andererseits konnte mittels proteolytischem Verdau des CaN gezeigt werden, dass ohne den *N*-terminalen Bereich CaN A α seine Phosphatase-Aktivität verliert. Diese Tatsache spricht wiederum für eine Beteiligung des *N*-terminalen Bereiches von CaN an der Regulation des aktiven Zentrums (Hubbard und Klee, 1989). So lange es jedoch noch keine Daten über die Struktur des CaN A β gibt, kann der Mechanismus der Regulierung der Substratbindung und der Reaktionsgeschwindigkeit durch das Polyprolin-Motiv des CaN A β nicht abschließend geklärt werden. Durch molekulare Modellierung wurde entdeckt, dass eine PPII genau die zentrale Helix von CaM umfasst und deshalb vielleicht die 11 Prolinreste des CaN A β die Interaktion von CaM mit dem CaM-Bindungsmotiv des CaN A β beeinflussen könnte (Guerini und Klee, 1989). In der vorliegenden Arbeit wurde

durch thermische Denaturierung und Aktivitätsmessungen jedoch gezeigt, dass beide CaN A β -Varianten im Komplex mit CaN B1 ähnliche Affinitäten zu CaM besitzen.

Eine weitere Studie wiederum vermutete, dass auf Grundlage der Interaktion des *N*-terminalen Bereiches von CaN A α mit CaN B auch das Polyprolin-Motiv des CaN A β die Bindung an CaN B regulieren könnte. Unterstützt wird diese Hypothese durch die ähnlichen zentralen Helices von CaM und CaN B, so dass die *N*-Termini der CaN-Isoformen nicht nur durch CaM sondern auch über CaN B die Aktivität von CaN beeinflussen könnten und damit auch für die Unterschiede der kinetischen Konstanten verantwortlich sein könnten (Perrino et al., 2002). So wäre es möglich das die PPII die Bindung des CaN B an die katalytische Untereinheit verstärken könnte, da sowohl die B-Untereinheit als auch die PPII die K_m -Werte des CaN gegenüber verschiedenen Substraten verringern (Perrino et al., 1995).

5.4 Einfluss von FKBP12/FK506 und Cyp18/CsA auf die Aktivität der CaN-Isoformen

Weiterhin wurden die Inhibitionen der CaN-Isoformen durch die Immunsuppressiven-Komplexe FKBP12/FK506 und Cyp18/CsA unter Verwendung verschiedener Substrate charakterisiert. Die Medikamente FK506 und CsA werden Patienten nach Organtransplantationen verabreicht. Die Inhibierung des CaN im Immunsystem und die damit verbundene Inaktivität des NFAT führen dazu, dass die T-Zellen nicht proliferieren und die Organabstoßung verhindert wird. Da CaN jedoch ubiquitär verbreitet ist, haben diese Medikamente zahlreiche Nebenwirkungen zum Beispiel am Herzen und an der Niere. Auch die Inhibition der PPlase-Aktivitäten der Cyp und FKBP spielen bei den Nebenwirkungen eine Rolle. Ein Ziel der Arbeit war es deshalb, die Inhibitionskonstanten der drei humanen CaN-Isoformen mit unterschiedlichen Substraten zu vergleichen, um mögliche Ansatzpunkte für neue immunsuppressive Strategien zu erhalten.

In den Tabellen 5.6 und 5.7 sind die IC_{50} -Werte der CaN-Inhibition mit verschiedenen Substraten dargestellt. Hier ist zu erkennen, dass CaN unter Verwendung des RII-Peptids schlechter inhibiert wird, als mit Elk-1, DARPP-32 und Tau. Die größten Unterschiede zwischen den inhibierenden Komplexen sind mit NFAT zu sehen. Mit NFAT als Substrat werden die CaN-Isoformen durch FKBP12/FK506 deutlich effektiver inhibiert als mit Cyp18/CsA, obwohl auch CsA ein potentes Immunsuppressivum ist. Dabei ist auffällig, dass CaN A α /CaN B1 durch FKBP12/FK506 in allen Fällen besser inhibiert werden kann als mit Cyp18/CsA. Die CaN-Isoformen werden durch Cyp18/CsA am effizientesten mit DARPP-32 inhibiert, während der FKBP12/FK506-Komplex die höchste Affinität aufweist, wenn Elk-1 als

Substrat verwendet wurde. Das könnte darauf hinweisen, dass Threonin-Substrate wahrscheinlich viel schlechter dephosphoryliert werden in Anwesenheit von bereits geringen Mengen an Cyp18/CsA im Vergleich zu Serin-Substraten. Im Vergleich der Isoformen untereinander sind die größten Unterschiede der Inhibition durch Cyp18/CsA mit DARPP-32 als Substrat sichtbar. CaN A β /CaN B1 wird 15-mal besser inhibiert als CaN A α /CaN B1.

Tab. 5.6: Vergleich der Inhibitionskonstanten der CaN-Isoformen mit FKBP12/FK506

Jeder Wert setzt sich aus 3 unabhängigen Messungen zusammen mit SD < 10 %.

FKBP12/FK506 IC ₅₀ (nM)	RII	Elk-1	DARPP-32	Tau	NFAT
CaN A α /B1	47,3	18,1	29,1	18,2	16,1
CaN A β /B1	34,3	12,6	58,9	42,2	7,25
CaN A β ²²⁻⁵²⁴ /B1	15,5	nicht bestimmt	11,2	nicht bestimmt	36,5
CaN A γ /B1	25,4	10,6	16,1	15,9	4,38

Die Unterschiede zwischen den beiden immunsuppressiven Komplexen bei der CaN-Inhibition könnten durch verschiedene Bindestellen der Komplexe an CaN verursacht werden. Beide Komplexe sind keine Inhibitoren des aktiven Zentrums von CaN, sondern inhibieren die Phosphatase-Aktivität allosterisch und nicht-kompetitiv. Deshalb ist die Zugänglichkeit für Proteine und Polypeptide stark eingeschränkt (Jin und Harrison, 2002).

Diese Tatsache liefert auch eine Erklärung, weshalb die CaN-Aktivität mit dem kleinen artifiziellen Substrat pNPP in Anwesenheit von FKBP12/FK506 oder Cyp18/CsA aktiviert wird. Durch sterische Hinderungen nach der Bindung der Komplexe an CaN wird zwar die Zugänglichkeit des aktiven Zentrums für große Substrate versperrt, kleine Moleküle, wie das pNPP, können jedoch besser dephosphoryliert werden (Huai et al., 2002; Swanson et al., 1992). Das zeigen auch die kinetischen Konstanten, welche für CaN A α /CaN B1 in Anwesenheit der Komplexe aus FKBP12/FK506 und Cyp18/CsA bestimmt wurden. In Anwesenheit der Komplexe erhöhten sich die Wechselzahl und die Substrataffinität des CaN für pNPP. Damit verbesserte die katalytische Effizienz sich deutlich (

Abb. 4.34). Eine Erklärung dafür könnten die Konformationsänderungen im aktiven Zentrum darstellen. Des Weiteren ist es möglich, dass Tyrosin-Substrate, wie pNPP, nach Komplexbindung und Konformationsänderungen besser dephosphoryliert werden. Es ist bereits

bekannt, das die Serin/Threonin-Phosphatase CaN auch phospho-Tyrosin-Reste dephosphorylieren kann. Bisher sind allerdings noch keine physiologischen Substrate identifiziert worden (Chernoff et al., 1984).

Tab. 5.7: Vergleich der Inhibitionskonstanten der CaN-Isoformen mit Cyp18/CsA

Jeder Wert setzt sich aus 3 unabhängigen Messungen zusammen mit SD < 10 %.

Cyp18/CsA IC₅₀ (nM)	RII	EIk-1	DARPP-32	Tau	NFAT
CaN Aα/B1	80,2	63,4	36,1	36,5	43,3
CaN Aβ/B1	57,4	54,3	2,39	26,4	97,3
CaN Aβ²²⁻⁵²⁴/B1	60,9	nicht bestimmt	63,4	nicht bestimmt	290
CaN Aγ/B1	78,2	43,7	7,27	6,33	111

Obwohl beide Medikamente, die chemisch nicht miteinander verwandt sind, mit PPlasen große immunsuppressive Komplexe bilden, sind diese Komplexe strukturell sehr verschieden. Trotzdem binden sie an ähnliche Stellen am CaN und wirken damit in der gleichen Weise (Griffith et al., 1995; Jin und Harrison, 2002). Beide Komplexe interagieren mit der CaN B-Bindungsstelle des CaN A sowie mit Resten des CaN B über Wasserstoffbrücken und van der Waals-Kräfte. Dabei interagieren viele Aminosäuren des CaN mit beiden Komplexen, es gibt aber auch Reste, welche nur FKBP/FK506 oder Cyp18/CsA binden. Röntgenkristallstrukturen zeigen, dass sowohl FKBP12/FK506 als auch Cyp18/CsA scheinbar keine größeren Änderungen der Konformation des CaN induzieren. Nur eine Verlagerung der Helix der CaN-B-Bindungsdomäne in Richtung der Immunophiline konnte beobachtet werden (Ke und Huai, 2003). Die sterische Hinderung des Zugangs zum aktiven Zentrum des CaN ist jedoch bei den Komplexen durch ihre unterschiedliche Bindung und den unterschiedlichen Raumbedarf verschieden (Abb. 5.3). So ist es vorstellbar, dass verschiedene Substrate in Anwesenheit des FKBP12/FK506- oder Cyp18/CsA-Komplexes unterschiedlich gut binden können. Obwohl die Inhibitionskonstanten für alle getesteten Substrate mit Cyp18/CsA schlechter sind, müsste der Cyp18/CsA-Komplex aufgrund seines größeren Raumbedarfs den Zugang zum aktiven Zentrum stärker behindern als FKBP12/FK506 (Abb. 5.3). Folglich könnten noch weitere Ursachen für die unterschiedlichen Zugänglichkeiten des CaN nach der Bindung der Komplexe existieren.

Aus den Tabellen 5.6 und 5.7 geht weiterhin hervor, dass der FKBP12/FK506-Komplex, mit Ausnahme des NFAT, im Vergleich zum Wildtyp besser an das verkürzte CaN A β^{22-524} /CaN B1 binden kann. Der N-terminale Bereich des CaN A β , welcher mit CaN B interagieren könnte, scheint demnach die Bindung des FKBP12/FK506-Komplexes zu beeinflussen. Da aber die kinetischen Konstanten durch die PPII ebenfalls verändert werden, könnte auch eine Konformationsänderung des CaN-Heterodimers die Ursache für die höhere Affinität darstellen.

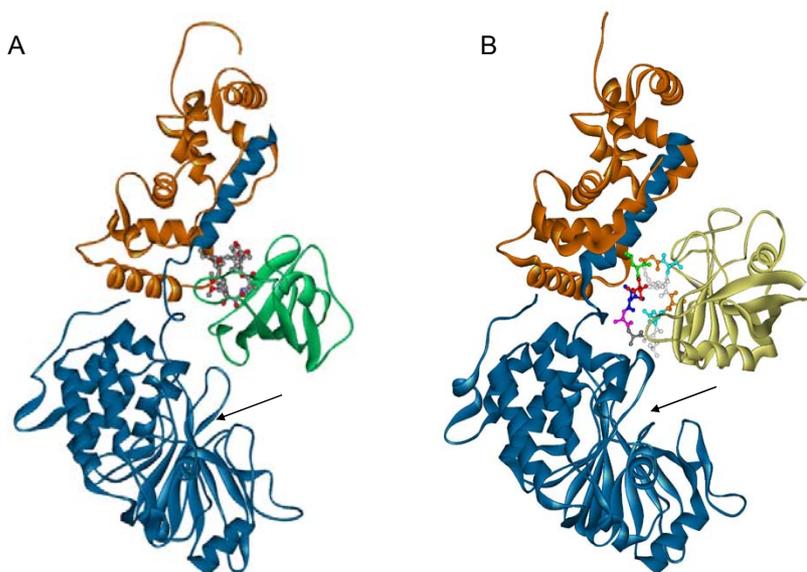


Abb. 5.3: Tertiärstruktur der Immunophilin/Immunsuppressiva-Komplexe mit CaN

(A) CaN A α /CaN B1/FKBP12/FK506-Komplex (PDB: 1tco); (B) CaN A α /CaN B1/Cyp18/CsA (PDB: 1mf8)
FK506 und CsA sind als Kugel-Stab-Modell dargestellt, CaN A α ist blau, CaN B1 ist orange, FKBP12 ist grün und Cyp18 ist gelb. Das aktive Zentrum des CaN A α ist durch einen Pfeil gekennzeichnet.

Die FKBP12/FK506- und Cyp18/CsA-Komplexe besitzen teilweise überlappende Binderegionen am CaN mit den sekundären Bindemotiven der Substrate. Mittels eines Screenings einer Peptidbibliothek wurde das Peptid VIVIT, abgeleitet vom PxlIT-Motiv des NFAT, als eine optimale Bindesequenz für CaN mit einem K_d von 0,5 μ M bestimmt (Aramburu et al., 1999; Li et al., 2007). Über VIVIT-Bindestudien konnte die Interaktionsstelle des Peptids im CaN identifiziert werden. Die Bindung von NFAT an CaN erfolgt demnach an die β -Faltblätter 11-14 des CaN A α und umfasst somit viele Aminosäuren aus dem C-terminalen Bereich der katalytischen Untereinheit und der CaN B-Bindedomäne (Li et al., 2004). In unmittelbarer räumlicher Nähe befinden sich auch die Bindestellen für die Immunophilin/Immunsuppressiva-Komplexe. Cyp18/CsA benötigt unter anderem die Aminosäuren 314, 315, 341-345, sowie 351-362 des CaN A für die Interaktion, während FKBP12/FK506 an die Reste 312-314, 341 sowie 344-362 des CaN A bindet (Ke und Huai,

2003). Beide Komplexe könnten demnach mit sekundären Bindestellen der CaN-Substrate am CaN kompetitieren. Dieser Effekt ist möglicherweise von den CaN-Isoformen und dem jeweiligen sekundären Bindemotiv des Substrates abhängig. Somit könnten die uneinheitlichen Inhibitionsmuster, welche durch die CaN-Isoformen mit verschiedenen Substraten in Abhängigkeit von FKBP12/FK506 und Cyp18/CsA bestimmt wurden, vielleicht erklärt werden.

5.5 Identifizierung an der Immunsuppression beteiligter Immunophiline

Ein ebenfalls sehr interessanter Aspekt innerhalb der CaN-Forschung ist die Frage, ob neben den prototypischen Vertretern der PPIasen, dem FKBP12 und dem Cyp18, auch andere Vertreter dieser Familie die immunsuppressive Wirkung von FK506 und CsA *in vivo* vermitteln können und damit als Immunophiline wirken. Von den 16 bislang identifizierten humanen FKBP gab es in der Literatur bislang nur Hinweise auf FK506-Komplexe mit FKBP12 und FKBP12.6, die CaN im nanomolaren Bereich inhibieren (Lam et al., 1995; Liu et al., 1991). Des Weiteren gab es bisher nur Daten, die zeigten, dass lediglich FKBP12 und vermutlich auch FKBP12.6 an der Immunsuppression beteiligt sind (Bram et al., 1993a; Lam et al., 1995; Xu et al., 2002). Es gibt aber auch andere FKBP, die im menschlichen Körper weit verbreitet sind und in hohen Konzentrationen exprimiert werden, wie zum Beispiel FKBP13, FKBP51 und FKBP52. Aus diesem Grund ist das Interesse an der Untersuchung des Einflusses weiterer FKBP in der Immunsuppression groß.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die CaN-Inhibition durch FK506 in Jurkat-Zellen durch mindestens drei FKBP/FK506-Komplexe vermittelt wird. Dabei konnte mittels NFAT Reporter-Gen-Test gezeigt werden, dass der FKBP12/FK506-Komplex einen Anteil von 60 % an der FK506-vermittelten CaN-Inhibition besitzt. Obwohl FKBP12 bisher als einziges FKBP, welches die FK506-Effekte vermittelt, eindeutig beschrieben wurde, konnte erstmals gezeigt werden, dass die FK506-Komplexe mit FKBP12.6 und FKBP51 auch an der Inhibition der CaN-Aktivität *in vivo* beteiligt sind. Genau wie die Deletion des FKBP12.6 erhöhte auch die Deletion des FKBP51 die NFAT-Reporter-Gen-Aktivität in Anwesenheit von FK506 um 20 % (Abb. 4.45). Damit konnte der bereits vermutete Effekt des FKBP12.6 in der Immunsuppression bestätigt werden. Der Beitrag des FKBP51 an der CaN-Inhibition kann durch die hohen Konzentrationen in Zellen sowie den relativ niedrigen IC_{50} -Wert von 744 nM im RII-Test erklärt werden. In der Literatur war bisher nur ein Wert von 5 μ M für FKBP51 beschrieben (Baughman et al., 1995; Baughman et al., 1997). Der 7-fach höhere Wert der Literatur kann vermutlich auf die Verwendung von FKBP51 als GST-Fusion zurückgeführt werden, welches möglicherweise die affine CaN-Interaktion stört. Aufgrund ihrer bis zu

350-fach höheren IC_{50} -Werte im RII-Test sind die FKBP13, FKBP38 und FKBP52 in Anwesenheit von ausreichenden Mengen an FKBP12, FKBP12.6 oder FKBP51 nicht in der Lage im Komplex mit FK506 die CaN-Inhibition in der Zelle zu vermitteln (Abb. 4.38). Die CaN/FKBP/FK506-Affinitäts-Chromatographie-Experimente bestätigen die Ergebnisse der siRNA-Versuche (Abb. 4.43, Tab. 4.18). FKBP12, und FKBP51 aus Jurkat-Zellen binden in Anwesenheit von FK506 an CaN, welches an Ni^{2+} -NTA-Sepharose immobilisiert wurde. Da PPIase-Messungen zeigten, dass alle FKBP im unteren nanomolaren Bereich durch FK506 inhibiert werden können (Tab. 4.17), wird die CaN-Inhibition in der Zelle demnach nicht durch die Formierung der FKBP/FK506-Komplexe bestimmt, sondern wird durch die Expressionslevel der FKBP in der Zelle und die Affinität der FK506-Komplexe zu CaN bestimmt. Deshalb wurde die Verteilung der FKBP12, 51 und 52 in humanen Zelllinien analysiert. Diese Untersuchungen zeigten, dass der relativ große Beitrag des FKBP51/FK506-Komplexes an der CaN-Inhibition in Jurkat-Zellen durch die hohe Expression des FKBP51 in diesen Zellen verursacht wird (Abb. 4.42). So beschrieben bereits andere Arbeitsgruppen FKBP51 als eine T-Zell-spezifische PPIase (Baughman et al., 1995; Baughman et al., 1997). In anderen Geweben weicht das Muster der CaN-Inhibition aufgrund unterschiedlicher FKBP-Konzentrationen ab. Zum Beispiel wird FKBP12 in der Milz in 3-mal höheren Konzentrationen als FKBP51 exprimiert (Baughman et al., 1997; Lam et al., 1995). Deshalb ist dort vermutlich der Anteil der FKBP12/FK506-Komplexe an der CaN-Inhibition deutlich höher. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass FKBP51 in SH-SY5Y-Zellen in sehr geringen Mengen vorkommt. Es ist bereits bekannt, dass FKBP12 und FKBP12.6 in hohen Konzentrationen in Hirngeweben exprimiert werden, während FKBP51 im Hirn keine große Rolle spielt (Lam et al., 1995). Im Hirn vermitteln demnach wahrscheinlich FKBP12 und FKBP12.6 die CaN-Inhibition. Im Gegensatz dazu ist die Expression von FKBP51 im Herzen sehr hoch, so dass dort FKBP51 an der unerwünschten CaN-Inhibition beiträgt (Baughman et al., 1997).

Das Medikament Rapamycin wird ebenfalls für die Immunsuppression eingesetzt. Der FKBP/Rapamycin-Komplex interagiert mit dem *mammalian target of rapamycin* (mTOR) und bewirkt dadurch einen Zellzyklus-Arrest (Fruman et al., 1994). Bisher wurde für den FKBP12/Rapamycin-Komplex jedoch keine CaN-Inhibition beschrieben (Liu et al., 1991). Dennoch ist es möglich, dass Rapamycin mit anderen FKBP Komplexe bildet, welche Affinität zu CaN aufweisen. Deshalb wurde die CaN-Aktivität im RII-Test in Anwesenheit verschiedener FKBP/Rapamycin-Komplexe gemessen. Obwohl alle FKBP, mit Ausnahme des FKBP38, Rapamycin sehr fest binden können (Edlich et al., 2005; Peattie et al., 1992; Yeh et al., 1995), zeigt die vorliegende Analyse, dass alle FKBP/Rapamycin-Komplexe keinen Einfluss auf die CaN-Aktivität besitzen (Abb. 4.41).

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, welche Cyp die immunsuppressive Wirkung des CsA vermitteln können. *In vivo* konnte bisher nur der Cyp18/CsA-Komplex als immunsuppressiv beschrieben werden, da CsA keine Wirkung in Cyp18-defizienten Mäusen besaß (Colgan et al., 2005). Neuere Ergebnisse aus unserer Arbeitsgruppe mit Cyp18-defizienten Jurkat-Zellen zeigen, dass neben Cyp18 auch andere Cyp zur Immunsuppression beitragen müssen (persönliche Kommunikation mit Dr. Frank Erdmann). So kann eine mögliche Rolle des Cyp23 bei der CsA-vermittelten Immunsuppression nicht ausgeschlossen werden (Bram et al., 1993a). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass alle getesteten Cyp durch CsA mit IC₅₀-Werten im unteren nanomolaren Bereich inhibiert werden konnten (Tab. 4.21). Ebenso sind alle Cyp/CsA-Komplexe in der Lage CaN im RII-Test zu inhibieren (

Abb. 4.48). Besonders effektiv war die CaN-Inhibition durch CsA-Komplexe mit Cyp18.2a, Cyp23 und Cyp23a. Die Inhibitionskonstanten für Cyp18 und 23 stimmen gut mit bereits publizierten Werten überein (Price et al., 1991; Swanson et al., 1992). Weiterhin wurden die Verteilungen des Cyp18, Cyp23 und Cyp33 in humanen Zellen analysiert (Abb. 4.50). Dabei ist auffällig, dass die Cyp18-Expression im Vergleich zu den anderen beiden Cyp sehr hoch ist. Cyp18 ist ein ubiquitäres Protein, welches in besonders hohen Konzentrationen vor allem im Hirn aber auch in der Milz, Niere und im Thymus exprimiert wird (Kung et al., 2001; Ryffel et al., 1991). Die CaN/Cyp/CsA-Affinitätsexperimente zeigen eindeutig, dass sowohl Cyp18 als auch Cyp23 aus Jurkat-Zellen in Anwesenheit von CsA CaN binden können (Abb. 4.51). Jedoch konnten lediglich 2,1 % des gesamten Cyp18 im Jurkat-Zelllysat präzipitiert werden, was aufgrund der sehr hohen Cyp18-Menge in Jurkat-Zellen mit der limitierenden CaN-Konzentration in dem Versuch erklärt werden kann. Physiologisch ist das Verhältnis der Expression von Cyp18 zu CaN noch größer.

Es kann zusammengefasst werden, dass FKBP12, FKBP12.6 und FKBP51 die immunsuppressiven Effekte des FK506 in Jurkat-Zellen vermitteln, während CaN *in vivo* durch die CsA-Komplexe mit Cyp18 und Cyp23 inhibiert wird. Die anderen FKBP/FK506- und Cyp/CsA- sowie alle FKBP/Rapamycin-Komplexe spielen wahrscheinlich keine Rolle bei der CaN-Inhibition.

Es war bereits bekannt, dass die FKBP12/FK506- und Cyp18/CsA-Komplexe im pNPP-Test die CaN-Aktivität erhöhen. Deshalb wurde die CaN-Aktivität gegenüber pNPP auch mit den anderen FKBP/FK506- und Cyp/CsA-Komplexen bestimmt. Die Messungen der CaN-Aktivität in Anwesenheit der FKBP/FK506- und Cyp/CsA-Komplexe im pNPP-Test zeigen, dass neben FKBP12/FK506 und Cyp18/CsA auch FKBP52/FK506, Cyp23a/CsA und Cyp22/CsA CaN aktivieren können (Abb. 4.39, Abb. 4.49). Die FK506-Komplexe mit FKBP12.6, 13, 38, 51 sowie der CsA-Komplex mit Cyp23 zeigen eine geringe Inhibition der Phosphatase-Aktivität.

Die unterschiedlichen Effekte der FKBP/FK506-Komplexe auf die CaN-Aktivität im pNPP-Test könnten durch strukturelle Unterschiede des Loops zwischen den β -Faltblättern 4 und 5 in den FKBP-Domänen erklärt werden. Dieser Loop ist nur 8 Å vom aktiven Zentrum des CaN entfernt und könnte Wasserstoffbrücken mit dem NO₂-Rest des pNPP bilden (Abb. 5.4). Neben der sterischen Hinderung der Zugänglichkeit des aktiven Zentrums des CaN durch die Komplex-Bindung, können die Immunophilin/Immunsuppressiven-Komplexen jedoch auch Konformationsänderungen im aktiven Zentrum bewirken. Die Änderung der Konformation könnte daraufhin einen aktivierenden oder inhibierenden Effekt auf die CaN-Aktivität im pNPP-Test auslösen.

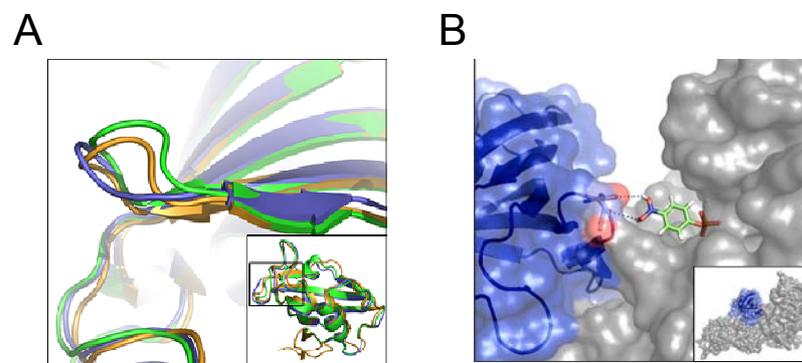


Abb. 5.4: Struktur des Loops zwischen den β -Faltblättern 4 und 5 in der FKBP-Domäne

(A) Dreidimensionale Darstellung der Strukturen des FKBP12 (1fkj, grün), FKBP12.6 (1c9h, blau) und der N-terminalen FKBP-Domäne des FKBP52 (1q1c, gelb) mittels der Pymol Software. Das kleine Bild zeigt, welcher Ausschnitt der FKBP-Domänen vergrößert wurde.

(B) 3D-Darstellung der Oberfläche des CaN/FK506/FKBP12-Komplexes (1tco). CaN ist in grau gezeigt, während FKBP12 blau ist. Die Aminosäurereste des Loops zwischen den β -Faltblättern 4 und 5 können mit pNPP interagieren, welches als Stabmodell dargestellt ist. Das kleine Bild zeigt den gesamten CaN/FK506/FKBP12-Komplex.

Weiterhin konnte anhand des FKBP12/FK506-Komplexes gezeigt werden, dass die Immunophilin/Immunsuppressiva-Komplexe auch in Abwesenheit von CaM mit CaN interagieren können (Abb. 4.40). Das Risiko einer kurzzeitigen CaN-Aktivität nach Anstieg von Ca²⁺ in Anwesenheit von ausreichend hohen Konzentrationen an FK506 kann somit ausgeschlossen werden, da der FKBP/FK506-Komplex bereits das inaktive CaN bindet. Die Bindung des FKBP12/FK506-Komplexes an CaN erfolgte jedoch mit höherer Affinität in Anwesenheit von CaM. Vermutlich stört die autoinhibitorische Domäne, welche im inaktiven CaN das aktive Zentrum blockiert die Interaktion der Komplexe mit CaN.

5.6 Die Aminosäurereste K34 und I90 des FKBP12 vermitteln die differentielle CaN-Inhibition

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit sollte klären, welche Aminosäuren für die unterschiedlichen CaN-Affinitäten der verschiedenen FKBP/FK506-Komplexe verantwortlich sind. Durch die Kristallstrukturanalyse des CaN/FKBP12/FK506-Komplexes sowie mittels eines Sequenzvergleichs wurden drei Aminosäurereste identifiziert, welche wahrscheinlich an der Interaktion beteiligt sind (Abb. 4.46). Daraufhin wurden vier Punktmutationen in die Sequenz des FKBP12 eingeführt, welches die höchste Inhibitionskonstante für CaN im Komplex mit FK506 besitzt. Anstelle der Aminosäuren Lysin 34, Histidin 87 und Isoleucin 90 wurden Reste aus FKBP38 und FKBP52 eingeführt, welche eine deutlich geringere Affinität zu CaN im Komplex mit FK506 aufwiesen. Es entstanden die FKBP12-Varianten Lysin 34 Threonin, Histidin 87 Arginin, Isoleucin 90 Tyrosin und Isoleucin 90 Lysin. Diese drei Aminosäurereste der FKBP-Domäne stellen die variabelsten Positionen der CaN-Bindungsregion dar. Zum Beispiel existiert der Lysin-Rest, welcher im FKBP12 das Lysin 34 darstellt, in allen FKBP mit hoher Affinität zu CaN, wie FKBP12.6 und FKBP51. Die FKBP mit höheren Inhibitionskonstanten im Komplex mit FK506 besitzen an dieser Stelle ein Threonin. Das Threonin nimmt bedeutend weniger Platz ein als Lysin und ihm fehlt die positive Ladung. Im CaN/FKBP12/FK506-Komplex interagiert das Lysin 34 über van der Waals-Kräfte mit dem Tyrosin 159 und dem Phenylalanin 160 des CaN A (Ke und Huai, 2003). Die CaN-Aktivitätsmessungen im RII-Test mit dieser FKBP12-Variante ergaben einen 14-fach höheren IC_{50} -Wert im Vergleich zum Wildtyp. Das Isoleucin, welches sich bei FKBP12 an Position 90 befindet, ist eine weitere sehr variable Position innerhalb der FKBP-Domänen, welche für die CaN-Bindung wichtig ist. Die Aminosäurereste Prolin 344 und Methionin 347 des CaN A interagieren mit dem Isoleucin 90 des FKBP12 (Ke und Huai, 2003). Im FKBP38, dem FKBP mit der geringsten Affinität zu CaN im Komplex mit FK506, ist das Isoleucin gegen ein Tyrosin ausgetauscht. Die Mutation des Isoleucin 90 im FKBP12 zu Tyrosin resultiert in einer 30-fach erhöhten Inhibitionskonstante mit FK506 im RII-Test. Die FKBP13, 51 und 52 besitzen statt des Isoleucin ein Lysin. Die Isoleucin 90 Lysin-Variante inhibiert die CaN-Aktivität 170-mal schlechter im Komplex mit FK506 im Vergleich zum Wildtyp. Die raumfüllenden Aminosäuren Tyrosin und Lysin an dieser Stelle könnte die Position des Loops zwischen den β -Faltblättern 2 und 3 des FKBP verändern. Dadurch könnte die Interaktionen des Prolin 88 des FKBP12 mit dem Threonin 351 und dem Prolin 355 des CaN A und dem Leucin 159 des CaN B beeinflusst werden. Im Gegensatz zu den FKBP12-Varianten Lysin 34 Threonin und Isoleucin 90 Tyrosin inhibiert die Histidin 87 Arginin-Variante die CaN-Aktivität vergleichbar gut wie der Wildtyp. Dieses Beispiel zeigt, dass diese Position in den FKBP vermutlich keine Rolle bei der CaN-Interaktion spielt. Somit zeigen

unsere Untersuchungen, dass die Reste Lysin 34 und Isoleucin 90 des FKBP12 sowie die korrespondierenden Reste der anderen FKBP zu den differentiellen Bindekonstanten beitragen.

6 Zusammenfassung

Im humanen Genom werden drei Isoformen der katalytischen Untereinheit der Ca^{2+} /CaM-abhängigen Proteinphosphatase CaN kodiert, welche mit der regulatorischen Untereinheit CaN B Heterodimere bilden. Obwohl die physiologische Rolle von CaN intensiv untersucht wurde, ist bisher wenig über die spezifischen Funktionen der einzelnen Isoformen von CaN A bekannt. Deshalb war es Ziel der Arbeit die drei humanen CaN A-Isoformen mit CaN B zu klonieren, zu exprimieren und zu reinigen. Die CaN-Isoformen sollten anschließend erstmals vergleichend charakterisiert werden, um auf spezifische physiologische Funktionen der einzelnen Isoformen schließen zu können.

- Die DNA der drei CaN A-Isoformen α , β und γ wurden als Tandemexpressionskonstrukte mit CaN B1 in den Vektor pET15b kloniert.
- Die heterodimeren Enzyme wurden mittels Ni^{2+} -NTA- und CaM-Affinitätschromatographie in katalytisch aktiver Form zur Homogenität gereinigt. Es konnten durchschnittlich Ausbeuten von 5 mg CaN $\text{A}\alpha$ /CaN B1, 2,5 mg CaN $\text{A}\beta$ /CaN B1 und erstmals auch 0,5 mg CaN $\text{A}\gamma$ /CaN B1 aus 6 l Kultur erreicht werden.
- Erstmals wurden die drei CaN-Isoformen mit verschiedenen Substraten vergleichend charakterisiert. Dabei konnten unterschiedliche Substratspezifitäten ermittelt werden.

CaN $\text{A}\alpha$ /CaN B1 dephosphoryliert den Transkriptionsfaktor Elk-1 7-mal effizienter als CaN $\text{A}\beta$ /CaN B1 und doppelt so gut wie CaN $\text{A}\gamma$ /CaN B1. Diese Präferenzen konnten durch Messungen der Elk-1-Reportergen-Aktivität in SH-SY5Y-Zellen, welche mit den unterschiedlichen CaN-Isoformen transfiziert wurden, bestätigt werden.

CaN $\text{A}\alpha$ /CaN B1 stellt ebenfalls die beste Tau-Phosphatase dar. Die katalytischen Effizienzen der anderen Isoformen sind ca. 2-mal niedriger.

Die katalytischen Effizienzen gegenüber dem RII-Peptid und dem Transkriptionsfaktor NFAT sind für CaN $\text{A}\alpha$ /CaN B1 sowie CaN $\text{A}\beta$ /CaN B1 vergleichbar, wohingegen CaN $\text{A}\gamma$ /CaN B1 einen 5-fach bzw. 3,5-fach niedrigeren k_{cat}/K_m -Wert besitzt.

Dagegen weist CaN $\text{A}\gamma$ /CaN B1 die höchste katalytische Effizienz gegenüber DARPP-32 auf. Die katalytische Effizienz des CaN $\text{A}\alpha$ /CaN B1 gegenüber

DARPP-32 liegt etwas unter der des CaN $\text{A}\gamma/\text{CaN B1}$, während CaN $\text{A}\beta/\text{CaN B1}$ einen 2-mal niedrigeren k_{cat}/K_m -Wert besitzt.

CaN $\text{A}\alpha/\text{CaN B1}$ und CaN $\text{A}\gamma/\text{CaN B1}$ dephosphorylieren Casein mit ähnlichen Effizienzen. Dagegen ist der k_{cat}/K_m -Wert des CaN $\text{A}\beta/\text{CaN B1}$ ca. 1,5-mal niedriger.

Gegenüber pNPP besitzen CaN $\text{A}\alpha/\text{CaN B1}$ und CaN $\text{A}\beta/\text{CaN B1}$ vergleichbare katalytische Effizienzen. Im Gegensatz dazu ist der k_{cat}/K_m -Wert des CaN $\text{A}\gamma/\text{CaN B1}$ 2-fach geringer.

DARPP-32 wird durch alle CaN-Isoformen am effizientesten dephosphoryliert. Die niedrigsten katalytischen Effizienzen der Proteinsubstrate wurden mit Casein und Tau bestimmt.

- In den getesteten humanen Zelllinien werden alle CaN A-Isoformen exprimiert. Dabei konnte die Expression von CaN $\text{A}\gamma$ erstmals auch auf Proteinebene in verschiedenen Zelllinien nachgewiesen werden.
- Die DNA der drei CaN A-Isoformen wurde in den pmaxFP-Red-C-Vektor kloniert und in Neuroblastomazellen transfiziert. Diese Versuche zeigten, dass alle CaN A-Isoformen cytoplasmatisch lokalisiert sind.

Die enzymatische Charakterisierung zeigte, dass CaN $\text{A}\beta/\text{CaN B1}$ die höchsten Substrataffinitäten aufwies. Diese Isoform besitzt als markantes Merkmal eine Polyprolin-Sequenz im N-terminalen Bereich. Deshalb wurde eine um dieses Motiv verkürzte Variante des CaN $\text{A}\beta$ im Komplex mit CaN B1 exprimiert, gereinigt und charakterisiert.

- Die DNA der Variante CaN $\text{A}\beta^{22-524}$ wurde zusammen mit der DNA des CaN B1 in den Vektor pET15 kloniert.
- Mittels Ni^{2+} -NTA- und CaM-Affinitätschromatographie konnten durchschnittlich 10 mg des CaN $\text{A}\beta^{22-524}/\text{CaN B1}$ aus 6 l Kultur gereinigt werden.
- CaN $\text{A}\beta/\text{CaN B1}$ und die Variante CaN $\text{A}\beta^{22-524}/\text{CaN B1}$ besaßen vergleichbare thermische Stabilitäten und CaM-Bindekonstanten.
- Die enzymkinetische Charakterisierung der verkürzten Variante im Vergleich zum Wildtyp zeigte, dass das prolinreiche-Motiv die Substratbindung beeinflusst.

Die katalytischen Effizienzen der beiden CaN β -Varianten im RII-Test sind vergleichbar, jedoch unterscheiden sich deren K_m - und k_{cat} -Werte deutlich. Ohne das *N*-terminale Polyprolin-Motiv ist die Substrataffinität um das 7-fache niedriger, während die Wechselzahl gleichzeitig um das 7-fache erhöht ist.

Wie bereits beim RII-Peptid, ist die Substrataffinität des CaN $A\beta^{22-524}$ /CaN B1 gegenüber NFAT und DARPP-32 deutlich erniedrigt, während die katalytischen Effizienzen der beiden CaN β -Varianten vergleichbar sind.

Dagegen hat der *N*-terminale Bereich keinen Einfluss auf die Substrataffinität zum pNPP. Im Vergleich zum Wildtyp besitzt CaN $A\beta^{22-524}$ /CaN B1 jedoch eine höhere Wechselzahl und damit eine bessere katalytische Effizienz.

Die Substanzen FK506 und CsA stellen wichtige immunsuppressive Medikamente dar. Ein weiteres Ziel der Arbeit war zu untersuchen, welche FKBP und welche Cyp in der Lage sind, die immunsuppressiven Effekte von FK506 und CsA zu vermitteln.

- Alle getesteten FKBP konnten durch FK506 im nanomolaren Bereich inhibiert werden.
- Die Inhibition der CaN-Aktivität im RII-Test erfolgte mit den FK506-Komplexen aus FKBP12, FKBP12.6 und FKBP51 im nanomolaren Bereich, während die Komplexe des FKBP13, FKBP38 und FKBP52 erst im mikromolaren Bereich inhibierten.
- Mutationsanalysen ergaben, dass die korrespondierenden Aminosäuren zum Lysin 34 und Isoleucin 90 des FKBP12 für die differentielle CaN-Bindung verantwortlich sind.
- In Jurkat-Zellen interagiert neben FKBP12 auch das FKBP51 mit CaN, wenn die Zellen mit FK506 behandelt wurden.
- NFAT-Reporter-Experimente mit Jurkat-Zellen, welche vorher mit siRNA des FKBP12, FKBP12.6 und FKBP51 transfiziert wurden, zeigten, dass FKBP12 zu 60 % und FKBP12.6 und FKBP51 jeweils zu 20 % an der FK506-vermittelten Immunsuppression beteiligt sind.
- Damit konnte in dieser Arbeit erstmals gezeigt werden, dass auch FKBP12.6 und FKBP51 zur immunsuppressiven Wirkung von FK506 beitragen können.
- Alle untersuchten Cyp konnten durch CsA im niedrig nanomolaren Bereich inhibiert werden. Die CaN-Inhibitionsmessungen der CsA-Komplexe des Cyp18, Cyp18.2a,

Cyp22, Cyp23, Cyp23a, Cyp33, Cyp40 zeigten, dass alle Komplexe CaN im unteren nanomolaren Bereich inhibieren.

- Co-Präzipitationsexperimente zeigten weiterhin, dass sowohl Cyp18 als auch Cyp23 an der CsA-vermittelten CaN-Inhibition in Jurkat-Zellen beteiligt sind und somit eine Rolle in der Immunsuppression spielen könnten.

7 Literaturverzeichnis

- Aitken, A., Cohen, P., Santikarn, S., Williams, D. H., Calder, A. G., Smith, A. & Klee, C. B. (1982). Identification of the NH₂-terminal blocking group of calcineurin B as myristic acid. *FEBS Letters* 150, 314-8.
- Aitken, A., Klee, C. B. & Cohen, P. (1984). The structure of the B subunit of calcineurin. *European Journal of Biochemistry* 139, 663-71.
- Albert, K. A., Hemmings, H. C., Jr., Adamo, A. I., Potkin, S. G., Akbarian, S., Sandman, C. A., Cotman, C. W., Bunney, W. E., Jr. & Greengard, P. (2002). Evidence for decreased DARPP-32 in the prefrontal cortex of patients with schizophrenia. *Archives of General Psychiatry* 59, 705-12.
- Alberts, A. S., Montminy, M., Shenolikar, S. & Feramisco, J. R. (1994). Expression of a peptide inhibitor of protein phosphatase 1 increases phosphorylation and activity of CREB in NIH 3T3 fibroblasts. *Molecular and Cellular Biology* 14, 4398-407.
- Alonso, A., Sasin, J., Bottini, N., Friedberg, I., Friedberg, I., Osterman, A., Godzik, A., Hunter, T., Dixon, J. & Mustelin, T. (2004). Protein tyrosine phosphatases in the human genome. *Cell* 117, 699-711.
- Aramburu, J., Rao, A. & Klee, C. B. (2000). Calcineurin: From structure to function. *Current Topics in Cellular Regulation*, Vol 36 36, 237-295.
- Aramburu, J., Yaffe, M. B., Lopez-Rodriguez, C., Cantley, L. C., Hogan, P. G. & Rao, A. (1999). Affinity-driven peptide selection of an NFAT inhibitor more selective than cyclosporin A. *Science* 285, 2129-33.
- Barford, D. (1996). Molecular mechanisms of the protein serine/threonine phosphatases. *Trends in Biochemical Sciences* 21, 407-12.
- Baughman, G., Wiederrecht, G. J., Campbell, N. F., Martin, M. M. & Bourgeois, S. (1995). FKBP51, a novel T-cell-specific immunophilin capable of calcineurin inhibition. *Molecular and Cellular Biology* 15, 4395-402.
- Baughman, G., Wiederrecht, G. J., Chang, F., Martin, M. M. & Bourgeois, S. (1997). Tissue distribution and abundance of human FKBP51, and FK506-binding protein that can mediate calcineurin inhibition. *Biochemical & Biophysical Research Communications* 232, 437-43.
- Baumgartel, K., Genoux, D., Welzl, H., Tweedie-Cullen, R. Y., Koshibu, K., Livingstone-Zatchej, M., Mamie, C. & Mansuy, I. M. (2008). Control of the establishment of aversive memory by calcineurin and Zif268. *Nature Neuroscience* 11, 572-8.
- Baumgrass, R., Weiwad, M., Erdmann, F., Liu, J. O., Wunderlich, D., Grabley, S. & Fischer, G. (2001). Reversible inhibition of calcineurin by the polyphenolic aldehyde gossypol. *Journal of Biological Chemistry* 276, 47914-21.
- Baumgrass, R., Zhang, Y., Erdmann, F., Thiel, A., Weiwad, M., Radbruch, A. & Fischer, G. (2004). Substitution in position 3 of cyclosporin A abolishes the cyclophilin-mediated gain-of-function mechanism but not immunosuppression. *Journal of Biological Chemistry* 279, 2470-9.
- Beals, C. R., Sheridan, C. M., Turck, C. W., Gardner, P. & Crabtree, G. R. (1997). Nuclear Export of Nf-Atc Enhanced by Glycogen Synthase Kinase-3. *Science* 275, 1930-1933.
- Berg, K. J., Forre, O., Bjerkhoel, F., Amundsen, E., Djoseland, O., Rugstad, H. E. & Westre, B. (1986). Side effects of cyclosporin A treatment in patients with rheumatoid arthritis. *Kidney International* 29, 1180-7.
- Bialojan, C. & Takai, A. (1988). Inhibitory effect of a marine-sponge toxin, okadaic acid, on protein phosphatases. Specificity and kinetics. *Biochemical Journal* 256, 283-90.
- Biedler, J. L., Helson, L. & Spengler, B. A. (1973). Morphology and growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture. *Cancer Research* 33, 2643-52.
- Blumenthal, D. K., Takio, K., Hansen, R. S. & Krebs, E. G. (1986). Dephosphorylation of cAMP-dependent protein kinase regulatory subunit (type II) by calmodulin-dependent protein phosphatase. Determinants of substrate specificity. *Journal of Biological Chemistry* 261, 8140-5.
- Bogumil, R., Namgaladze, D., Schaarschmidt, D., Schmachtel, T., Hellstern, S., Mutzel, R. & Ullrich, V. (2000). Inactivation of calcineurin by hydrogen peroxide and phenylarsine oxide. Evidence for a dithiol-disulfide equilibrium and implications for redox regulation. *European Journal of Biochemistry* 267, 1407-15.

- Bootman, M. D., Collins, T. J., Peppiatt, C. M., Prothero, L. S., MacKenzie, L., De Smet, P., Travers, M., Tovey, S. C., Seo, J. T., Berridge, M. J., Ciccolini, F. & Lipp, P.** (2001). Calcium signalling - an overview. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 12, 3-10.
- Bourajaj, M., Armand, A. S., da Costa Martins, P. A., Weijs, B., van der Nagel, R., Heeneman, S., Wehrens, X. H. & De Windt, L. J.** (2008). NFATc2 is a necessary mediator of calcineurin-dependent cardiac hypertrophy and heart failure. *Journal of Biological Chemistry* 283, 22295-303.
- Bradford, M. M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-54.
- Bram, R. J., Hung, D. T., Martin, P. K., Schreiber, S. L. & Crabtree, G. R.** (1993a). Identification of the Immunophilins Capable of Mediating Inhibition of Signal-Transduction by Cyclosporine-a and Fk506 - Roles of Calcineurin Binding and Cellular Location. *Molecular and Cellular Biology* 13, 4760-4769.
- Bram, R. J., Hung, D. T., Martin, P. K., Schreiber, S. L. & Crabtree, G. R.** (1993b). Identification of the immunophilins capable of mediating inhibition of signal transduction by cyclosporin A and FK506: roles of calcineurin binding and cellular location. *Molecular and Cellular Biology* 13, 4760-9.
- Brasier, A. R. & Ron, D.** (1992). Luciferase reporter gene assay in mammalian cells. *Methods in Enzymology* 216, 386-97.
- Brill, G. M., Premachandran, U., Karwowski, J. P., Henry, R., Cwik, D. K., Traphagen, L. M., Humphrey, P. E., Jackson, M., Clement, J. J., Burren, N. S., Kadam, S., Chen, R. H. & McAlpine, J. B.** (1996). Dibefurin, a novel fungal metabolite inhibiting calcineurin phosphatase activity. *Journal of Antibiotics* 49, 124-8.
- Brunner, T., Yoo, N. J., LaFace, D., Ware, C. F. & Green, D. R.** (1996). Activation-induced cell death in murine T cell hybridomas. Differential regulation of Fas (CD95) versus Fas ligand expression by cyclosporin A and FK506. *International Immunology* 8, 1017-26.
- Buchholz, M. & Ellenrieder, V.** (2007). An emerging role for Ca^{2+} /calcineurin/NFAT signaling in cancerogenesis. *Cell Cycle* 6, 16-9.
- Bueno, O. F., Brandt, E. B., Rothenberg, M. E. & Molkentin, J. D.** (2002a). Defective T cell development and function in calcineurin A beta -deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 9398-403.
- Bueno, O. F., van Rooij, E., Molkentin, J. D., Doevendans, P. A. & De Windt, L. J.** (2002b). Calcineurin and hypertrophic heart disease: novel insights and remaining questions. *Cardiovascular Research* 53, 806-821.
- Bueno, O. F., Wilkins, B. J., Tymitz, K. M., Glascock, B. J., Kimball, T. F., Lorenz, J. N. & Molkentin, J. D.** (2002c). Impaired cardiac hypertrophic response in calcineurin A beta-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 4586-4591.
- Cardenas, M. E., Muir, R. S., Breuder, T. & Heitman, J.** (1995). Targets of immunophilin-immunosuppressant complexes are distinct highly conserved regions of calcineurin A. *EMBO Journal* 14, 2772-83.
- Casolaro, V., Georas, S. N., Song, Z. & Ono, S. J.** (1996). Biology and genetics of atopic disease. *Current Opinion in Immunology* 8, 796-803.
- Castigli, E., Chatila, T. A. & Geha, R. S.** (1993). A protein of the AP-1 family is a component of nuclear factor of activated T cells. *Journal of Immunology* 150, 3284-90.
- Chang, C. P., McDill, B. W., Neilson, J. R., Joist, H. E., Epstein, J. A., Crabtree, G. R. & Chen, F.** (2004). Calcineurin is required in urinary tract mesenchyme for the development of the pyeloureteral peristaltic machinery. *Journal of Clinical Investigation* 113, 1051-8.
- Chernoff, J., Sells, M. A. & Li, H. C.** (1984). Characterization of phosphotyrosyl-protein phosphatase activity associated with calcineurin. *Biochemical & Biophysical Research Communications* 121, 141-8.
- Chow, C. W., Rincon, M., Cavanagh, J., Dickens, M. & Davis, R. J.** (1997). Nuclear accumulation of NFAT4 opposed by the JNK signal transduction pathway. *Science* 278, 1638-41.
- Coghlan, V. M., Perrino, B. A., Howard, M., Langeberg, L. K., Hicks, J. B., Gallatin, W. M. & Scott, J. D.** (1995). Association of protein kinase A and protein phosphatase 2B with a common anchoring protein. *Science* 267, 108-11.
- Cohen, G. B., Ren, R. B. & Baltimore, D.** (1995). Modular binding domains in signal transduction proteins. *Cell* 80, 237-248.
- Cohen, P.** (1989). The structure and regulation of protein phosphatases. *Annual Review of Biochemistry* 58, 453-508.
- Cohen, P.** (2000). The regulation of protein function by multisite phosphorylation--a 25 year update. *Trends in Biochemical Sciences* 25, 596-601.

- Cohen, P.** (2001). The role of protein phosphorylation in human health and disease. The Sir Hans Krebs Medal Lecture. *European Journal of Biochemistry* 268, 5001-10.
- Cohen, P.** (2002). Protein kinases - the major drug targets of the twenty-first century? *Nature Reviews Drug Discovery* 1, 309-315.
- Colgan, J., Asmal, M., Yu, B. & Luban, J.** (2005). Cyclophilin A-deficient mice are resistant to immunosuppression by cyclosporine. *Journal of Immunology* 174, 6030-8.
- Cottrell, J. R., Li, B. & Gerber, D. J.** (2006). Calcineurin Agamma is expressed in the brain and forms a functional phosphatase. *Georgia World Congress*
- Cubellis, M. V., Cailleux, F., Blundell, T. L. & Lovell, S. C.** (2005). Properties of polyproline II, a secondary structure element implicated in protein-protein interactions. *Proteins* 58, 880-92.
- Cvetkovic, M., Mann, G. N., Romero, D. F., Liang, X. G., Ma, Y., Jee, W. S. & Epstein, S.** (1994). The deleterious effects of long-term cyclosporine A, cyclosporine G, and FK506 on bone mineral metabolism in vivo. *Transplantation* 57, 1231-7.
- Dave, V., Childs, T., Xu, Y., Ikegami, M., Besnard, V., Maeda, Y., Wert, S. E., Neilson, J. R., Crabtree, G. R. & Whitsett, J. A.** (2006). Calcineurin/Nfat signaling is required for perinatal lung maturation and function. *Journal of Clinical Investigation* 116, 2597-609.
- Davis, H. P. & Squire, L. R.** (1984). Protein synthesis and memory: a review. *Psychological Bulletin* 96, 518-59.
- Dawson, T. M., Steiner, J. P., Dawson, V. L., Dinerman, J. L., Uhl, G. R. & Snyder, S. H.** (1993). Immunosuppressant FK506 enhances phosphorylation of nitric oxide synthase and protects against glutamate neurotoxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90, 9808-12.
- de la Pompa, J. L., Timmerman, L. A., Takimoto, H., Yoshida, H., Elia, A. J., Samper, E., Potter, J., Wakeham, A., Marengere, L., Langille, B. L., Crabtree, G. R. & Mak, T. W.** (1998). Role of the NF-ATc transcription factor in morphogenesis of cardiac valves and septum. *Nature* 392, 182-6.
- Dell'Acqua, M. L., Dodge, K. L., Tavalin, S. J. & Scott, J. D.** (2002). Mapping the protein phosphatase-2B anchoring site on AKAP79. Binding and inhibition of phosphatase activity are mediated by residues 315-360. *Journal of Biological Chemistry* 277, 48796-802.
- Dodge, K. L. & Scott, J. D.** (2003). Calcineurin anchoring and cell signaling. *Biochemical & Biophysical Research Communications* 311, 1111-1115.
- Duina, A. A., Chang, H. C., Marsh, J. A., Lindquist, S. & Gaber, R. F.** (1996). A cyclophilin function in Hsp90-dependent signal transduction. *Science* 274, 1713-5.
- Dunn, S. E., Burns, J. L. & Michel, R. N.** (1999). Calcineurin is required for skeletal muscle hypertrophy. *Journal of Biological Chemistry* 274, 21908-21912.
- Eastwood, S. L., Burnet, P. W. & Harrison, P. J.** (2005). Decreased hippocampal expression of the susceptibility gene PPP3CC and other calcineurin subunits in schizophrenia. *Biological Psychiatry* 57, 702-10.
- Edlich, F., Weiwad, M., Erdmann, F., Fanghanel, J., Jarczowski, F., Rahfeld, J. U. & Fischer, G.** (2005). Bcl-2 regulator FKBP38 is activated by Ca²⁺/calmodulin. *EMBO Journal* 24, 2688-99.
- Edlich, F., Weiwad, M., Wildemann, D., Jarczowski, F., Kilka, S., Moutty, M. C., Jahreis, G., Lucke, C., Schmidt, W., Striggow, F. & Fischer, G.** (2006). The specific FKBP38 inhibitor N-(N',N'-dimethylcarboxamidomethyl)cycloheximide has potent neuroprotective and neurotrophic properties in brain ischemia. *Journal of Biological Chemistry* 281, 14961-70.
- Enz, A., Shapiro, G., Chappuis, A. & Dattler, A.** (1994). Nonradioactive assay for protein phosphatase 2B (calcineurin) activity using a partial sequence of the subunit of cAMP-dependent protein kinase as substrate. *Analytical Biochemistry* 216, 147-53.
- Enz, A., Zenke, G. & Pombovillar, E.** (1997). 7-Oxa[2.2.1]Bicycloheptane-2,3-Dicarboxylic Acid Derivatives as Phosphatase Inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 7, 2513-2518.
- Feske, S., Okamura, H., Hogan, P. G. & Rao, A.** (2003). Ca²⁺/calcineurin signalling in cells of the immune system. *Biochemical & Biophysical Research Communications* 311, 1117-1132.
- Fischer, G. & Aumuller, T.** (2003). Regulation of peptide bond cis/trans isomerization by enzyme catalysis and its implication in physiological processes. *Reviews of Physiology, Biochemistry & Pharmacology* 148, 105-50.
- Fischer, G., Bang, H. & Mech, C.** (1984). Nachweis einer Enzymkatalyse für die cis-trans-Isomerisierung der Peptidbindung in prolinhaltigen Peptiden. *Biomedica Biochimica Acta* 43, 1101-11.
- Foster, T. C., Sharrow, K. M., Masse, J. R., Norris, C. M. & Kumar, A.** (2001). Calcineurin links Ca²⁺ dysregulation with brain aging. *Journal of Neuroscience* 21, 4066-73.
- Fruman, D. A., Burakoff, S. J. & Bierer, B. E.** (1994). Immunophilins in protein folding and immunosuppression. *FASEB Journal* 8, 391-400.

- Fruman, D. A., Pai, S. Y., Burakoff, S. J. & Bierer, B. E.** (1995). Characterization of a mutant calcineurin A alpha gene expressed by EL4 lymphoma cells. *Molecular and Cellular Biology* 15, 3857-63.
- Gaestel, M., Benndorf, R., Hayess, K., Priemer, E. & Engel, K.** (1992). Dephosphorylation of the small heat shock protein hsp25 by calcium/calmodulin-dependent (type 2B) protein phosphatase. *Journal of Biological Chemistry* 267, 21607-11.
- Gerber, D. J., Hall, D., Miyakawa, T., Demars, S., Gogos, J. A., Karayiorgou, M. & Tonegawa, S.** (2003). Evidence for association of schizophrenia with genetic variation in the 8p21.3 gene, PPP3CC, encoding the calcineurin gamma subunit. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 8993-8.
- Giard, D. J., Aaronson, S. A., Todaro, G. J., Arnstein, P., Kersey, J. H., Dosik, H. & Parks, W. P.** (1973). In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *Journal of the National Cancer Institute* 51, 1417-23.
- Gill, S. C. & von Hippel, P. H.** (1989). Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Analytical Biochemistry* 182, 319-26.
- Gille, H., Kortenjann, M., Thomae, O., Moomaw, C., Slaughter, C., Cobb, M. H. & Shaw, P. E.** (1995). ERK phosphorylation potentiates Elk-1-mediated ternary complex formation and transactivation. *EMBO Journal* 14, 951-62.
- Goldfeld, A. E., Tsai, E., Kincaid, R., Belshaw, P. J., Schrieber, S. L., Strominger, J. L. & Rao, A.** (1994). Calcineurin mediates human tumor necrosis factor alpha gene induction in stimulated T and B cells. *Journal of Experimental Medicine* 180, 763-8.
- Gomez del Arco, P., Martinez-Martinez, S., Maldonado, J. L., Ortega-Perez, I. & Redondo, J. M.** (2000). A role for the p38 MAP kinase pathway in the nuclear shuttling of NFATp. *Journal of Biological Chemistry* 275, 13872-8.
- Gooch, J. L.** (2006). An emerging role for calcineurin Aalpha in the development and function of the kidney. *American Journal of Physiology Renal Physiology* 290, F769-76.
- Gooch, J. L., Barnes, J. L., Garcia, S. & Abboud, H. E.** (2003). Calcineurin is activated in diabetes and is required for glomerular hypertrophy and ECM accumulation. *American Journal of Physiology Renal Physiology* 284, F144-54.
- Gooch, J. L., Pergola, P. E., Guler, R. L., Abboud, H. E. & Barnes, J. L.** (2004a). Differential expression of calcineurin A isoforms in the diabetic kidney. *Journal of the American Society of Nephrology* 15, 1421-9.
- Gooch, J. L., Toro, J. J., Guler, R. L. & Barnes, J. L.** (2004b). Calcineurin A-alpha but not A-beta is required for normal kidney development and function. *American Journal of Pathology* 165, 1755-65.
- Goto, S., Yamamoto, H., Fukunaga, K., Iwasa, T., Matsukado, Y. & Miyamoto, E.** (1985). Dephosphorylation of microtubule-associated protein 2, tau factor, and tubulin by calcineurin. *Journal of Neurochemistry* 45, 276-83.
- Graef, I. A., Chen, F., Chen, L., Kuo, A. & Crabtree, G. R.** (2001). Signals transduced by Ca(2+)/calcineurin and NFATc3/c4 pattern the developing vasculature. *Cell* 105, 863-75.
- Graham, F. L., Smiley, J., Russell, W. C. & Nairn, R.** (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *Journal of General Virology* 36, 59-74.
- Greenwood, I. A., Ledoux, J., Sanguinetti, A., Perrino, B. A. & Leblanc, N.** (2004). Calcineurin A alpha but not A beta augments I-CI(Ca) in rabbit pulmonary artery smooth muscle cells. *Journal of Biological Chemistry* 279, 38830-38837.
- Griffith, J. P., Kim, J. L., Kim, E. E., Sintchak, M. D., Thomson, J. A., Fitzgibbon, M. J., Fleming, M. A., Caron, P. R., Hsiao, K. & Navia, M. A.** (1995). X-ray structure of calcineurin inhibited by the immunophilin-immunosuppressant FKBP12-FK506 complex. *Cell* 82, 507-22.
- Gualberto, A., Marquez, G., Carballo, M., Youngblood, G. L., Hunt, S. W., Baldwin, A. S. & Sobrino, F.** (1998). P53 Transactivation of the Hiv-1 Long Terminal Repeat Is Blocked by Pd 144795, a Calcineurin-Inhibitor with Anti-Hiv Properties. *Journal of Biological Chemistry* 273, 7088-7093.
- Guerini, D. & Klee, C. B.** (1989). Cloning of human calcineurin A: evidence for two isozymes and identification of a polyproline structural domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86, 9183-7.
- Hallhuber, M., Burkard, N., Wu, R., Buch, M. H., Engelhardt, S., Hein, L., Neyses, L., Schuh, K. & Ritter, O.** (2006). Inhibition of nuclear import of calcineurin prevents myocardial hypertrophy. *Circulation Research* 99, 626-35.
- 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, 758-60.

- Hashimoto, Y., Perrino, B. A. & Soderling, T. R. (1990). Identification of an autoinhibitory domain in calcineurin. *Journal of Biological Chemistry* 265, 1924-7.
- Heit, J. J., Apelqvist, A. A., Gu, X., Winslow, M. M., Neilson, J. R., Crabtree, G. R. & Kim, S. K. (2006). Calcineurin/NFAT signalling regulates pancreatic beta-cell growth and function. *Nature* 443, 345-9.
- Hemmings, H. C., Jr., Greengard, P., Tung, H. Y. & Cohen, P. (1984). DARPP-32, a dopamine-regulated neuronal phosphoprotein, is a potent inhibitor of protein phosphatase-1. *Nature* 310, 503-5.
- Herskovits, J. S., Burgess, C. C., Obar, R. A. & Vallee, R. B. (1993). Effects of mutant rat dynamin on endocytosis. *Journal of Cell Biology* 122, 565-78.
- Hicks, J. M. & Hsu, V. L. (2004). The extended left-handed helix: a simple nucleic acid-binding motif. *Proteins* 55, 330-8.
- Hong, F., Lee, J., Song, J. W., Lee, S. J., Ahn, H., Cho, J. J., Ha, J. & Kim, S. S. (2002). Cyclosporin A blocks muscle differentiation by inducing oxidative stress and inhibiting the peptidyl-prolyl-cis-trans isomerase activity of cyclophilin A: cyclophilin A protects myoblasts from cyclosporin A-induced cytotoxicity. *FASEB Journal* 16, 1633-5.
- Hotte, M., Thuault, S., Dineley, K. T., Hemmings, H. C., Jr., Nairn, A. C. & Jay, T. M. (2007). Phosphorylation of CREB and DARPP-32 during late LTP at hippocampal to prefrontal cortex synapses in vivo. *Synapse* 61, 24-8.
- Hou, Q., Yi, X., Jiang, G. & Wei, Q. (2004). The salt bridge of calcineurin is important for transferring the effect of CNB binding to CNA. *FEBS Letters* 577, 294-8.
- Huai, Q., Kim, H. Y., Liu, Y., Zhao, Y., Mondragon, A., Liu, J. O. & Ke, H. (2002). Crystal structure of calcineurin-cyclophilin-cyclosporin shows common but distinct recognition of immunophilin-drug complexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 12037-42.
- Hubbard, M. J. & Klee, C. B. (1987). Calmodulin binding by calcineurin. Ligand-induced renaturation of protein immobilized on nitrocellulose. *Journal of Biological Chemistry* 262, 15062-70.
- Hubbard, M. J. & Klee, C. B. (1989). Functional domain structure of calcineurin A: mapping by limited proteolysis. *Biochemistry* 28, 1868-74.
- Ingebritsen, T. S. & Cohen, P. (1983). Protein phosphatases: properties and role in cellular regulation. *Science* 221, 331-8.
- Jain, J., Loh, C. & Rao, A. (1995). Transcriptional regulation of the IL-2 gene. *Current Opinion in Immunology* 7, 333-42.
- Jain, J., McCaffrey, P. G., Miner, Z., Kerppola, T. K., Lambert, J. N., Verdine, G. L., Curran, T. & Rao, A. (1993). The T-cell transcription factor NFATp is a substrate for calcineurin and interacts with Fos and Jun. *Nature* 365, 352-5.
- Janknecht, R., Ernst, W. H., Pingoud, V. & Nordheim, A. (1993). Activation of ternary complex factor Elk-1 by MAP kinases. *EMBO Journal* 12, 5097-104.
- Jiang, H., Xiong, F., Kong, S., Ogawa, T., Kobayashi, M. & Liu, J. O. (1997). Distinct tissue and cellular distribution of two major isoforms of calcineurin. *Molecular Immunology* 34, 663-9.
- Jin, F. Z., Lian, M. L., Wang, X. & Wei, Q. (2005). Studies of the anticancer effect of calcineurin B. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 27, 199-210.
- Jin, L. & Harrison, S. C. (2002). Crystal structure of human calcineurin complexed with cyclosporin A and human cyclophilin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 13522-13526.
- Kakalis, L. T., Kennedy, M., Sikkink, R., Rusnak, F. & Armitage, I. M. (1995). Characterization of the calcium-binding sites of calcineurin B. *FEBS Letters* 362, 55-8.
- Kay, B. K., Williamson, M. P. & Sudol, M. (2000). The importance of being proline: the interaction of proline-rich motifs in signaling proteins with their cognate domains. *FASEB Journal* 14, 231-41.
- Kayyali, U. S., Zhang, W., Yee, A. G., Seidman, J. G. & Potter, H. (1997). Cytoskeletal changes in the brains of mice lacking calcineurin A alpha. *Journal of Neurochemistry* 68, 1668-78.
- Ke, H. & Huai, Q. (2003). Structures of calcineurin and its complexes with immunophilin-immunosuppressants. *Biochemical & Biophysical Research Communications* 311, 1095-102.
- Kelly, M. A., Chellgren, B. W., Rucker, A. L., Troutman, J. M., Fried, M. G., Miller, A. F. & Creamer, T. P. (2001). Host-guest study of left-handed polyproline II helix formation. *Biochemistry* 40, 14376-83.
- Kennedy, M. T., Brockman, H. & Rusnak, F. (1996). Contributions of myristoylation to calcineurin structure/function. *Journal of Biological Chemistry* 271, 26517-21.
- Kim, S. J., Ding, W., Albrecht, B., Green, P. L. & Lairmore, M. D. (2003). A conserved calcineurin-binding motif in human T lymphotropic virus type 1 p12l functions to modulate nuclear factor of activated T cell activation. *Journal of Biological Chemistry* 278, 15550-7.

- Kincaid, R. L., Giri, P. R., Higuchi, S., Tamura, J., Dixon, S. C., Marietta, C. A., Amorese, D. A. & Martin, B. M.** (1990). Cloning and characterization of molecular isoforms of the catalytic subunit of calcineurin using nonisotopic methods. *Journal of Biological Chemistry* 265, 11312-9.
- Kincaid, R. L., Nightingale, M. S. & Martin, B. M.** (1988). Characterization of a cDNA clone encoding the calmodulin-binding domain of mouse brain calcineurin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85, 8983-7.
- King, M. M. & Huang, C. Y.** (1984). The calmodulin-dependent activation and deactivation of the phosphoprotein phosphatase, calcineurin, and the effect of nucleotides, pyrophosphate, and divalent metal ions. Identification of calcineurin as a Zn and Fe metalloenzyme. *Journal of Biological Chemistry* 259, 8847-56.
- King, M. M., Huang, C. Y., Chock, P. B., Nairn, A. C., Hemmings, H. C., Jr., Chan, K. F. & Greengard, P.** (1984). Mammalian brain phosphoproteins as substrates for calcineurin. *Journal of Biological Chemistry* 259, 8080-3.
- Kingsbury, T. J. & Cunningham, K. W.** (2000). A conserved family of calcineurin regulators. *Genes & Development* 14, 1595-604.
- Klee, C. B., Crouch, T. H. & Krinks, M. H.** (1979). Calcineurin: a calcium- and calmodulin-binding protein of the nervous system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76, 6270-3.
- Klee, C. B., Draetta, G. F. & Hubbard, M. J.** (1988). Calcineurin. *Advances in Enzymology & Related Areas of Molecular Biology* 61, 149-200.
- Klee, C. B. & Krinks, M. H.** (1978). Purification of cyclic 3',5'-nucleotide phosphodiesterase inhibitory protein by affinity chromatography on activator protein coupled to Sepharose. *Biochemistry* 17, 120-6.
- Klee, C. B., Ren, H. & Wang, X.** (1998). Regulation of the calmodulin-stimulated protein phosphatase, calcineurin. *Journal of Biological Chemistry* 273, 13367-70.
- Kung, L., Batiuk, T. D., Palomo-Pinon, S., Noujaim, J., Helms, L. M. & Halloran, P. F.** (2001). Tissue distribution of calcineurin and its sensitivity to inhibition by cyclosporine. *American Journal of Transplantation* 1, 325-33.
- Laemmli, U. K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-5.
- Lai, M. M., Burnett, P. E., Wolosker, H., Blackshaw, S. & Snyder, S. H.** (1998). Cain, a novel physiologic protein inhibitor of calcineurin. *Journal of Biological Chemistry* 273, 18325-31.
- Lam, E., Martin, M. M., Timerman, A. P., Sabers, C., Fleischer, S., Lukas, T., Abraham, R. T., O'Keefe, S. J., O'Neill, E. A. & Wiederrecht, G. J.** (1995). A novel FK506 binding protein can mediate the immunosuppressive effects of FK506 and is associated with the cardiac ryanodine receptor. *Journal of Biological Chemistry* 270, 26511-22.
- Lautermilch, N. J. & Spitzer, N. C.** (2000). Regulation of calcineurin by growth cone calcium waves controls neurite extension. *Journal of Neuroscience* 20, 315-25.
- Lee, J. P., Palfrey, H. C., Bindokas, V. P., Ghadge, G. D., Ma, L., Miller, R. J. & Roos, R. P.** (1999). The role of immunophilins in mutant superoxide dismutase-1-linked familial amyotrophic lateral sclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 3251-6.
- Li, H., Rao, A. & Hogan, P. G.** (2004). Structural delineation of the calcineurin-NFAT interaction and its parallels to PP1 targeting interactions. *Journal of Molecular Biology* 342, 1659-74.
- Li, H., Zhang, L., Rao, A., Harrison, S. C. & Hogan, P. G.** (2007). Structure of calcineurin in complex with PVIVIT peptide: portrait of a low-affinity signalling interaction. *Journal of Molecular Biology* 369, 1296-306.
- Li, W. & Handschumacher, R. E.** (2002). Identification of two calcineurin B-binding proteins: tubulin and heat shock protein 60. *Biochimica et Biophysica Acta* 1599, 72-81.
- Lian, Q., Ladner, C. J., Magnuson, D. & Lee, J. M.** (2001). Selective changes of calcineurin (protein phosphatase 2B) activity in Alzheimer's disease cerebral cortex. *Experimental Neurology* 167, 158-65.
- Lieberman, D. N. & Mody, I.** (1994). Regulation of NMDA channel function by endogenous Ca(2+)-dependent phosphatase. *Nature* 369, 235-9.
- Lim, H. W. & Molkenin, J. D.** (1999). Calcineurin and human heart failure. *Nature Medicine* 5, 246-247.
- Lin, X. & Barber, D. L.** (1996). A calcineurin homologous protein inhibits GTPase-stimulated Na-H exchange. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 12631-6.

- Liu, H., Ye, W., Guan, G., Dong, Z., Jia, Z. & Yang, T. (2007). Developmental regulation of calcineurin isoforms in the rodent kidney: association with COX-2. *American Journal of Physiology Renal Physiology* 293, F1898-904.
- 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, 807-15.
- Liu, J. O. (2003). Endogenous protein inhibitors of calcineurin. *Biochemical & Biophysical Research Communications* 311, 1103-1109.
- Liu, L., Zhang, J., Yuan, J., Dang, Y., Yang, C., Chen, X., Xu, J. & Yu, L. (2005). Characterization of a human regulatory subunit of protein phosphatase 3 gene (PPP3RL) expressed specifically in testis. *Molecular Biology Reports* 32, 41-5.
- Luban, J., Bossolt, K. L., Franke, E. K., Kalpana, G. V. & Goff, S. P. (1993). Human immunodeficiency virus type 1 Gag protein binds to cyclophilins A and B. *Cell* 73, 1067-78.
- Luo, C., Shaw, K. T., Raghavan, A., Aramburu, J., Garcia-Cozar, F., Perrino, B. A., Hogan, P. G. & Rao, A. (1996). Interaction of calcineurin with a domain of the transcription factor NFAT1 that controls nuclear import. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 8907-12.
- MacKintosh, C., Beattie, K. A., Klumpp, S., Cohen, P. & Codd, G. A. (1990). Cyanobacterial microcystin-LR is a potent and specific inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A from both mammals and higher plants. *FEBS Letters* 264, 187-92.
- Malleret, G., Haditsch, U., Genoux, D., Jones, M. W., Bliss, T. V., Vanhose, A. M., Weitlauf, C., Kandel, E. R., Winder, D. G. & Mansuy, I. M. (2001). Inducible and reversible enhancement of learning, memory, and long-term potentiation by genetic inhibition of calcineurin. *Cell* 104, 675-86.
- Manicassamy, S., Gupta, S., Huang, Z., Molkentin, J. D., Shang, W. & Sun, Z. (2008). Requirement of calcineurin a beta for the survival of naive T cells. *Journal of Immunology* 180, 106-12.
- Mansuy, I. M., Mayford, M., Jacob, B., Kandel, E. R. & Bach, M. E. (1998). Restricted and regulated overexpression reveals calcineurin as a key component in the transition from short-term to long-term memory. *Cell* 92, 39-49.
- Marais, R., Wynne, J. & Treisman, R. (1993). The SRF accessory protein Elk-1 contains a growth factor-regulated transcriptional activation domain. *Cell* 73, 381-93.
- Martin, B. A., Oxhorn, B. C., Rossow, C. R. & Perrino, B. A. (2001). A cluster of basic amino acid residues in calcineurin b participates in the binding of calcineurin to phosphatidylserine vesicles. *Journal of Biochemistry* 129, 843-9.
- Martinez-Martinez, S., Rodriguez, A., Lopez-Maderuelo, M. D., Ortega-Perez, I., Vazquez, J. & Redondo, J. M. (2006). Blockade of NFAT activation by the second calcineurin binding site. *Journal of Biological Chemistry* 281, 6227-35.
- Mathieu, F., Miot, S., Etain, B., El Khoury, M.-A., Chevalier, F., Bellivier, F., Leboyer, M., Giros, B. & Tzavara, E. T. (2008). Association between the PPP3CC gene, coding for the calcineurin gamma catalytic subunit, and bipolar disorder. *Behavioral and Brain Functions* 4.
- Matsui, H., Etoh, S., Nishio, H., Tokuda, M., Itano, T. & Hatase, O. (1991). Identification of two calcineurin alpha isoforms in bovine brain by two different monoclonal antibodies. *International Journal of Biochemistry* 24, 1119-25.
- McCaffrey, P. G., Kim, P. K., Valge-Archer, V. E., Sen, R. & Rao, A. (1994). Cyclosporin A sensitivity of the NF-kappa B site of the IL2R alpha promoter in untransformed murine T cells. *Nucleic Acids Research* 22, 2134-42.
- McPartlin, A. E., Barker, H. M. & Cohen, P. T. (1991). Identification of a third alternatively spliced cDNA encoding the catalytic subunit of protein phosphatase 2B beta. *Biochimica et Biophysica Acta* 1088, 308-10.
- Medyouf, H. & Ghysdael, J. (2008). The calcineurin/NFAT signaling pathway: a novel therapeutic target in leukemia and solid tumors. *Cell Cycle* 7, 297-303.
- Meinhart, A., Kamenski, T., Hoepfner, S., Baumli, S. & Cramer, P. (2005). A structural perspective of CTD function. *Genes and Development* 19, 1401-15.
- Milan, D., Griffith, J., Su, M., Price, E. R. & McKeon, F. (1994). The latch region of calcineurin B is involved in both immunosuppressant-immunophilin complex docking and phosphatase activation. *Cell* 79, 437-47.
- Miskin, J. E., Abrams, C. C., Goatley, L. C. & Dixon, L. K. (1998). A viral mechanism for inhibition of the cellular phosphatase calcineurin. *Science* 281, 562-5.
- Mittal, C. K. & Jadhav, A. L. (1994). Calcium-dependent inhibition of constitutive nitric oxide synthase. *Biochemical & Biophysical Research Communications* 203, 8-15.

- Miyata, K., Omori, N., Uchino, H., Yamaguchi, T., Isshiki, A. & Shibasaki, F. (2001). Involvement of the brain-derived neurotrophic factor/TrkB pathway in neuroprotective effect of cyclosporin A in forebrain ischemia. *Neuroscience* 105, 571-8.
- Miyazaki, T., Kanou, Y., Murata, Y., Ohmori, S., Niwa, T., Maeda, K., Yamamura, H. & Seo, H. (1996). Molecular cloning of a novel thyroid hormone-responsive gene, ZAK1-4, in human skin fibroblasts. *Journal of Biological Chemistry* 271, 14567-71.
- Molkentin, J. D., Lu, J. R., Antos, C. L., Markham, B., Richardson, J., Robbins, J., Grant, S. R. & Olson, E. N. (1998). A Calcineurin-Dependent Transcriptional Pathway for Cardiac Hypertrophy. *Cell* 93, 215-228.
- Mondragon, A., Griffith, E. C., Sun, L., Xiong, F., Armstrong, C. & Liu, J. O. (1997). Overexpression and purification of human calcineurin alpha from *Escherichia coli* and assessment of catalytic functions of residues surrounding the binuclear metal center. *Biochemistry* 36, 4934-42.
- Moorhead, G. B. G., Trinkle-Mulcahy, L. & Uike-Lemee, A. (2007). Emerging roles of nuclear protein phosphatases. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 8, 234-244.
- Mukherji, M., Bell, R., Supekova, L., Wang, Y., Orth, A. P., Batalov, S., Miraglia, L., Huesken, D., Lange, J., Martin, C., Sahasrabudhe, S., Reinhardt, M., Natt, F., Hall, J., Mickanin, C., Labow, M., Chanda, S. K., Cho, C. Y. & Schultz, P. G. (2006). Genome-wide functional analysis of human cell-cycle regulators. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 14819-24.
- Mullis, K. B. & Faloona, F. A. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology* 155, 335-50.
- Muramatsu, T. & Kincaid, R. L. (1992). Molecular cloning and chromosomal mapping of the human gene for the testis-specific catalytic subunit of calmodulin-dependent protein phosphatase (calcineurin A). *Biochemical & Biophysical Research Communications* 188, 265-71.
- Neilson, J. R., Winslow, M. M., Hur, E. M. & Crabtree, G. R. (2004). Calcineurin B1 is essential for positive but not negative selection during thymocyte development. *Immunity* 20, 255-66.
- Nichols, R. A., Suplick, G. R. & Brown, J. M. (1994). Calcineurin-mediated protein dephosphorylation in brain nerve terminals regulates the release of glutamate. *Journal of Biological Chemistry* 269, 23817-23.
- Ochiai, T., Nakajima, K., Nagata, M., Hori, S., Asano, T. & Isono, K. (1987). Studies of the induction and maintenance of long-term graft acceptance by treatment with FK506 in heterotopic cardiac allotransplantation in rats. *Transplantation* 44, 734-8.
- Offner, G., Hoyer, P. F., Brodehl, J. & Pichlmayr, R. (1987). Cyclosporin A in paediatric kidney transplantation. *Pediatric Nephrology* 1, 125-30.
- Parsons, J. N., Wiederrecht, G. J., Salowe, S., Burbaum, J. J., Rokosz, L. L., Kincaid, R. L. & O'Keefe, S. J. (1994). Regulation of calcineurin phosphatase activity and interaction with the FK-506/FK-506 binding protein complex. *Journal of Biological Chemistry* 269, 19610-6.
- Parsons, S. A., Wilkins, B. J., Bueno, O. F. & Molkentin, J. D. (2003). Altered skeletal muscle phenotypes in calcineurin Aalpha and Abeta gene-targeted mice. *Molecular and Cellular Biology* 23, 4331-43.
- Pawson, T. (1995). Protein modules and signalling networks. *Nature* 373, 573-580.
- Peattie, D. A., Harding, M. W., Fleming, M. A., DeCenzo, M. T., Lippke, J. A., Livingston, D. J. & Benasutti, M. (1992). Expression and characterization of human FKBP52, an immunophilin that associates with the 90-kDa heat shock protein and is a component of steroid receptor complexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, 10974-8.
- Perrino, B. A., Fong, Y. L., Brickey, D. A., Saitoh, Y., Ushio, Y., Fukunaga, K., Miyamoto, E. & Soderling, T. R. (1992). Characterization of the phosphatase activity of a baculovirus-expressed calcineurin A isoform. *Journal of Biological Chemistry* 267, 15965-9.
- Perrino, B. A., Ng, L. Y. & Soderling, T. R. (1995). Calcium Regulation of Calcineurin Phosphatase Activity by Its B Subunit and Calmodulin - Role of the Autoinhibitory Domain. *Journal of Biological Chemistry* 270, 340-346.
- Perrino, B. A., Wilson, A. J., Ellison, P. & Clapp, L. H. (2002). Substrate selectivity and sensitivity to inhibition by FK506 and cyclosporin A of calcineurin heterodimers composed of the alpha or beta catalytic subunit. *European Journal of Biochemistry* 269, 3540-8.
- Polli, J. W., Billingsley, M. L. & Kincaid, R. L. (1991). Expression of the calmodulin-dependent protein phosphatase, calcineurin, in rat brain: developmental patterns and the role of nigrostriatal innervation. *Brain Research. Developmental Brain Research* 63, 105-19.
- Pratt, W. B. & Toft, D. O. (1997). Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. *Endocrine Reviews* 18, 306-60.

- Price, E. R., Zydowsky, L. D., Jin, M. J., Baker, C. H., McKeon, F. D. & Walsh, C. T. (1991). Human cyclophilin B: a second cyclophilin gene encodes a peptidyl-prolyl isomerase with a signal sequence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88, 1903-7.
- Ranger, A. M., Grusby, M. J., Hodge, M. R., Gravallesse, E. M., Delabrousse, F. C., Hoey, T., Mickanin, C., Baldwin, H. S. & Glimcher, L. H. (1998). The Transcription Factor Nf-Atc Is Essential for Cardiac Valve Formation. *Nature* 392, 186-190.
- Rao, A., Luo, C. & Hogan, P. G. (1997). Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. *Annual Review of Immunology* 15, 707-47.
- Reid, T. W., Albert, D. M., Rabson, A. S., Russell, P., Craft, J., Chu, E. W., Tralka, T. S. & Wilcox, J. L. (1974). Characteristics of an established cell line of retinoblastoma. *Journal of the National Cancer Institute* 53, 347-60.
- Reiter, T. A., Abraham, R. T., Choi, M. & Rusnak, F. (1999). Redox regulation of calcineurin in T-lymphocytes. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* 4, 632-44.
- Ren, R., Mayer, B. J., Cicchetti, P. & Baltimore, D. (1993). Identification of a ten-amino acid proline-rich SH3 binding site. *Science* 259, 1157-61.
- Rosen, M. K. & Schreiber, S. L. (1992). Natural Products as Probes of Cellular Function: Studies of Immunophilins. *Angewandte Chemie: International Edition* 31, 384-400.
- Ross, R. A., Spengler, B. A. & Biedler, J. L. (1983). Coordinate morphological and biochemical interconversion of human neuroblastoma cells. *Journal of the National Cancer Institute* 71, 741-7.
- Rothermel, B., Vega, R. B., Yang, J., Wu, H., Bassel-Duby, R. & Williams, R. S. (2000). A protein encoded within the Down syndrome critical region is enriched in striated muscles and inhibits calcineurin signaling. *Journal of Biological Chemistry* 275, 8719-25.
- Ruff, V. A. & Leach, K. L. (1995). Direct Demonstration of Nfat(P) Dephosphorylation and Nuclear Localization in Activated Ht-2 Cells Using a Specific Nfat(P) Polyclonal Antibody. *Journal of Biological Chemistry* 270, 22602-22607.
- Rusnak, F. & Mertz, P. (2000). Calcineurin: Form and function. *Physiological Reviews* 80, 1483-1521.
- Ryffel, B., Woerly, G., Greiner, B., Haendler, B., Mihatsch, M. J. & Foxwell, B. M. (1991). Distribution of the cyclosporine binding protein cyclophilin in human tissues. *Immunology* 72, 399-404.
- Scherer, W. F., Syverton, J. T. & Gey, G. O. (1953). Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses. IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix. *Journal of Experimental Medicine* 97, 695-710.
- Schneider, U., Schwenk, H. U. & Bornkamm, G. (1977). Characterization of EBV-genome negative "null" and "T" cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma. *International Journal of Cancer* 19, 621-6.
- Schreiber, S. L. & Crabtree, G. R. (1992). The mechanism of action of cyclosporin A and FK506. *Immunology Today* 13, 136-42.
- Scott, J. E., Ruff, V. A. & Leach, K. L. (1997). Dynamic Equilibrium between Calcineurin and Kinase Activities Regulates the Phosphorylation State and Localization of the Nuclear Factor of Activated T-Cells. *Biochemical Journal* 324, 597-603.
- Sharma, R. K., Desai, R., Waisman, D. M. & Wang, J. H. (1979). Purification and subunit structure of bovine brain modulator binding protein. *Journal of Biological Chemistry* 254, 4276-82.
- Shibasaki, F., Hallin, U. & Uchino, H. (2002). Calcineurin as a multifunctional regulator. *Journal of Biochemistry* 131, 1-15.
- Shibasaki, F., Kondo, E., Akagi, T. & McKeon, F. (1997). Suppression of Signalling through Transcription Factor Nf-at by Interactions between Calcineurin and Bcl-2. *Nature* 386, 728-731.
- Shibasaki, F., Price, E. R., Milan, D. & McKeon, F. (1996). Role of kinases and the phosphatase calcineurin in the nuclear shuttling of transcription factor NF-AT4. *Nature* 382, 370-3.
- Shou, W., Aghdasi, B., Armstrong, D. L., Guo, Q., Bao, S., Charng, M. J., Mathews, L. M., Schneider, M. D., Hamilton, S. L. & Matzuk, M. M. (1998). Cardiac defects and altered ryanodine receptor function in mice lacking FKBP12. *Nature* 391, 489-92.
- Soule, H. D., Vazquez, J., Long, A., Albert, S. & Brennan, M. (1973). A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *Journal of the National Cancer Institute* 51, 1409-16.
- Stewart, A. A., Ingebritsen, T. S., Manalan, A., Klee, C. B. & Cohen, P. (1982). Discovery of a Ca²⁺- and calmodulin-dependent protein phosphatase: probable identity with calcineurin (CaM-BP80). *FEBS Letters* 137, 80-4.

- Sugimoto, T., Stewart, S. & Guan, K. L.** (1997). The calcium/calmodulin-dependent protein phosphatase calcineurin is the major Elk-1 phosphatase. *Journal of Biological Chemistry* 272, 29415-8.
- Sullivan, E., Hemsley, P. & Pickard, A.** (1997). Development of a Scintillation Proximity Assay for Calcineurin Phosphatase Activity. *Journal of Biomolecular Screening* 2, 19-23.
- Sun, L., Zhu, L. L., Zaidi, N., Yang, G., Moonga, B. S., Abe, E., Iqbal, J., Epstein, S., Blair, H. C., Huang, C. L. & Zaidi, M.** (2007). Cellular and molecular consequences of calcineurin A alpha gene deletion. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1116, 216-26.
- Svenningsson, P., Tzavara, E. T., Carruthers, R., Rachleff, I., Wattler, S., Nehls, M., McKinzie, D. L., Fienberg, A. A., Nomikos, G. G. & Greengard, P.** (2003). Diverse psychotomimetics act through a common signaling pathway. *Science* 302, 1412-5.
- Swanson, S. K., Born, T., Zydowsky, L. D., Cho, H., Chang, H. Y., Walsh, C. T. & Rusnak, F.** (1992). Cyclosporin-mediated inhibition of bovine calcineurin by cyclophilins A and B. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, 3741-5.
- Takahashi, N., Hayano, T. & Suzuki, M.** (1989). Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase is the cyclosporin A-binding protein cyclophilin. *Nature* 337, 473-5.
- Teigelkamp, S., Achsel, T., Mundt, C., Gothel, S. F., Cronshagen, U., Lane, W. S., Marahiel, M. & Luhrmann, R.** (1998). The 20kD protein of human [U4/U6.U5] tri-snRNPs is a novel cyclophilin that forms a complex with the U4/U6-specific 60kD and 90kD proteins. *RNA* 4, 127-41.
- Tendron, A., Decramer, S., Justrabo, E., Gouyon, J. B., Semama, D. S. & Gilbert, T.** (2003). Cyclosporin A administration during pregnancy induces a permanent nephron deficit in young rabbits. *Journal of the American Society of Nephrology* 14, 3188-96.
- Tocci, M. J., Matkovich, D. A., Collier, K. A., Kwok, P., Dumont, F., Lin, S., Degudicibus, S., Siekierka, J. J., Chin, J. & Hutchinson, N. I.** (1989). The immunosuppressant FK506 selectively inhibits expression of early T cell activation genes. *Journal of Immunology* 143, 718-26.
- Tonks, N. K.** (2006). Protein tyrosine phosphatases: from genes, to function, to disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 7, 833-846.
- Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J.** (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76, 4350-4.
- Tsuboi, A., Masuda, E. S., Naito, Y., Tokumitsu, H., Arai, K. & Arai, N.** (1994). Calcineurin potentiates activation of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor gene in T cells: involvement of the conserved lymphokine element 0. *Molecular Biology of the Cell* 5, 119-28.
- Ueki, K., Muramatsu, T. & Kincaid, R. L.** (1992). Structure and expression of two isoforms of the murine calmodulin-dependent protein phosphatase regulatory subunit (calcineurin B). *Biochemical & Biophysical Research Communications* 187, 537-43.
- Usuda, N., Arai, H., Sasaki, H., Hanai, T., Nagata, T., Muramatsu, T., Kincaid, R. L. & Higuchi, S.** (1996). Differential subcellular localization of neural isoforms of the catalytic subunit of calmodulin-dependent protein phosphatase (calcineurin) in central nervous system neurons: immunohistochemistry on formalin-fixed paraffin sections employing antigen retrieval by microwave irradiation. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 44, 13-8.
- Van Duyne, G. D., Standaert, R. F., Karplus, P. A., Schreiber, S. L. & Clardy, J.** (1991). Atomic structure of FKBP-FK506, an immunophilin-immunosuppressant complex. *Science* 252, 839-42.
- Varadaraj, K. & Skinner, D. M.** (1994). Cytoplasmic Localization of Transcripts of a Complex G+C-Rich Crab Satellite DNA. *Chromosoma* 103, 423-431.
- Von Kleist, S., Chany, E., Burtin, P., King, M. & Fogh, J.** (1975). Immuno Histology of the Antigen Pattern of a Continuous Cell Line from a Human Colon Tumor. *Journal of the National Cancer Institute* 55, 555-560.
- Wallace, R. W., Lynch, T. J., Tallant, E. A. & Cheung, W. Y.** (1979). Purification and characterization of an inhibitor protein of brain adenylate cyclase and cyclic nucleotide phosphodiesterase. *Journal of Biological Chemistry* 254, 377-82.
- Wang, H., Zhou, C. L., Lei, H., Zhang, S. D., Zheng, J. & Wei, Q.** (2008a). Kaempferol: A new immunosuppressant of calcineurin. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life*. 60, 549-54
- Wang, H. G., Pathan, N., Ethell, I. M., Krajewski, S., Yamaguchi, Y., Shibasaki, F., McKeon, F., Bobo, T., Franke, T. F. & Reed, J. C.** (1999). Ca²⁺-induced apoptosis through calcineurin dephosphorylation of BAD. *Science* 284, 339-43.

- Wang, J. H. & Desai, R.** (1976). A brain protein and its effect on the Ca²⁺-and protein modulator-activated cyclic nucleotide phosphodiesterase. *Biochemical & Biophysical Research Communications* 72, 926-32.
- Wang, M. G., Yi, H., Guerini, D., Klee, C. B. & McBride, O. W.** (1996a). Calcineurin A alpha (PPP3CA), calcineurin A beta (PPP3CB) and calcineurin B (PPP3R1) are located on human chromosomes 4, 10q21-->q22 and 2p16-->p15 respectively. *Cytogenetics and Cell Genetics* 72, 236-41.
- Wang, X. T., Culotta, V. C. & Klee, C. B.** (1996b). Superoxide Dismutase Protects Calcineurin from Inactivation. *Nature* 383, 434-437.
- Wang, Y. L., Wang, Y., Tong, L. & Wei, Q.** (2008b). Overexpression of calcineurin B subunit (CnB) enhances the oncogenic potential of HEK293 cells. *Cancer Science*.
- Watanabe, Y., Perrino, B. A., Chang, B. H. & Soderling, T. R.** (1995). Identification in the calcineurin A subunit of the domain that binds the regulatory B subunit. *Journal of Biological Chemistry* 270, 456-60.
- Watanabe, Y., Perrino, B. A. & Soderling, T. R.** (1996). Activation of calcineurin A subunit phosphatase activity by its calcium-binding B subunit. *Biochemistry* 35, 562-6.
- Wera, S. & Neyts, J.** (1994). Calcineurin as a possible new target for treatment of Parkinson's disease. *Medical Hypotheses* 43, 132-4.
- Wolff, D. J. & Sved, D. W.** (1985). The divalent cation dependence of bovine brain calmodulin-dependent phosphatase. *Journal of Biological Chemistry* 260, 4195-202.
- Xin, H. B., Senbonmatsu, T., Cheng, D. S., Wang, Y. X., Copello, J. A., Ji, G. J., Collier, M. L., Deng, K. Y., Jeyakumar, L. H., Magnuson, M. A., Inagami, T., Kotlikoff, M. I. & Fleischer, S.** (2002). Oestrogen protects FKBP12.6 null mice from cardiac hypertrophy. *Nature* 416, 334-8.
- Xu, X., Su, B., Barndt, R. J., Chen, H., Xin, H., Yan, G., Chen, L., Cheng, D., Heitman, J., Zhuang, Y., Fleischer, S. & Shou, W.** (2002). FKBP12 is the only FK506 binding protein mediating T-cell inhibition by the immunosuppressant FK506. *Transplantation* 73, 1835-8.
- Yeh, W. C., Bierer, B. E. & McKnight, S. L.** (1995). Rapamycin inhibits clonal expansion and adipogenic differentiation of 3T3-L1 cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 11086-90.
- Yeo, H., Beck, L. H., Thompson, S. R., Farach-Carson, M. C., McDonald, J. M., Clemens, T. L. & Zayzafoon, M.** (2007). Conditional disruption of calcineurin B1 in osteoblasts increases bone formation and reduces bone resorption. *Journal of Biological Chemistry* 282, 35318-27.
- Zhang, B. W., Zimmer, G., Chen, J., Ladd, D., Li, E., Alt, F. W., Wiederrecht, G., Cryan, J., O'Neill, E. A., Seidman, C. E., Abbas, A. K. & Seidman, J. G.** (1996). T cell responses in calcineurin A alpha-deficient mice. *Journal of Experimental Medicine* 183, 413-20.
- Zhang, Y., Kim, Y., Genoud, N., Gao, J., Kelly, J. W., Pfaff, S. L., Gill, G. N., Dixon, J. E. & Noel, J. P.** (2006). Determinants for dephosphorylation of the RNA polymerase II C-terminal domain by Scp1. *Molecular Cell* 24, 759-70.
- Zhu, D., Cardenas, M. E. & Heitman, J.** (1995). Myristoylation of calcineurin B is not required for function or interaction with immunophilin-immunosuppressant complexes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry* 270, 24831-8.
- Zhuo, M., Zhang, W., Son, H., Mansuy, I., Sobel, R. A., Seidman, J. & Kandel, E. R.** (1999). A selective role of calcineurin alpha in synaptic depotentiation in hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 4650-5.
- Zydowsky, L. D., Etzkorn, F. A., Chang, H. Y., Ferguson, S. B., Stolz, L. A., Ho, S. I. & Walsh, C. T.** (1992). Active site mutants of human cyclophilin A separate peptidyl-prolyl isomerase activity from cyclosporin A binding and calcineurin inhibition. *Protein Science* 1, 1092-9.

Danksagung:

An dieser Stelle möchte ich mich bei Prof. Dr. Gunter Fischer für die Möglichkeit der Anfertigung dieser Arbeit in seiner Arbeitsgruppe, die sehr guten Arbeitsbedingungen sowie dem Interesse am Fortgang der Arbeit bedanken.

Meinem Betreuer, Dr. Matthias Weiwad, danke ich recht herzlich für die sehr gute Betreuung und Zusammenarbeit. Nur durch die vielen nützlichen Ratschläge und Tips sowie durch die ständige Diskussionsbereitschaft, durch seine Geduld und Unterstützung konnte diese Arbeit entstehen.

Dr. Frank Erdmann gilt mein Dank für die Diskussionsbereitschaft, für die zahlreichen experimentellen Ratschläge sowie das kritische Lesen der vorliegenden Arbeit.

Weiterhin bin ich Martina Heidler für die stete Hilfsbereitschaft, die vielen wertvollen Hinweise vor allem im Bereich der Zellbiologie sowie für die zahlreichen kleinen Dinge im Labor und das freundliche Laborklima dankbar.

Frau Hella Klemens danke ich für die freundliche und stets sehr gute Zusammenarbeit im Bezug auf die Protein-Reinigungen, für ihr immer positives Denken und die zahlreichen kleinen Dinge, welche mir den Laboralltag sehr erleichterten.

Michaela Frost, Suzanne Roß, Dr. Frank Edlich und Dr. Franziska Jarczowski danke ich für die gute Zusammenarbeit in den CaN/Cyp- bzw. CaN/FKBP-Projekten.

Alexander Migdoll danke ich für die geleistete Unterstützung während seiner Diplomarbeit.

Allen Mitarbeitern der Forschungsstelle danke ich für die Zusammenarbeit und für die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Meinen Eltern und meinem Freund danke ich von ganzem Herzen für die immer währende liebevolle und moralische Unterstützung während der letzten Jahre.

Selbständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die hier angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommene Stellen sind als solche gekennzeichnet. Die Arbeit wurde noch keiner Prüfungskommission vorgelegt.

Halle, August 2008

Susann Kilka

Lebenslauf

Susann Kilka

Geburtsdatum: 27.07.1979

Geburtsort: Leipzig

Familienstand: ledig

Kinder: keine

Staatsangehörigkeit: deutsch

- 04.2004 - 08.2008 Max-Planck-Forschungsstelle Enzymologie der Proteinfaltung in Halle:
Doktorarbeit
Titel: *Vergleichende Charakterisierung der humanen Calcineurin-Isoformen*
- 04.2003 - 03.2004 Max-Planck-Forschungsstelle Enzymologie der Proteinfaltung in Halle:
Diplomarbeit
Titel: *Untersuchungen zum Einfluss der Calcineurin-Aktivität auf Signalwege in Säugerzellen*
Abschluss: Diplom-Biologe
- 10.2000 - 03.2003 Universität Leipzig, Fakultät für Biowissenschaften:
Hauptstudium der Biologie
- 10.1998 - 10.2000 Universität Leipzig, Fakultät für Biowissenschaften:
Grundstudium der Biologie
- 09.1992 - 07.1998 Max-Klinger-Gymnasium Leipzig:
Gymnasium
Abschluss: allgemeine Hochschulreife
- 09.1986 - 07.1992 92. POS Leipzig:
Grundschule

