

**„ANALYSE DES MINERALOKORTIKOID-REZEPTOR-
CALCINEURIN-SIGNALNETZWERKES“**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I - Biowissenschaften

der Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg

vorgelegt

von Frau Anja Seiferth

geb. am: 12.07.1983 in Berlin-Lichtenberg

Gutachter

1. Prof. Dr. M. Schutkowski
2. Prof. Dr. M. Gekle
3. Prof. Dr. med. A. Kurtz

Halle (Saale), 05.09.2013

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	I
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	IV
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	VI
TABELLENVERZEICHNIS	VII
1. EINLEITUNG	1
1.1 VORWORT	1
1.2 CHARAKTERISIERUNG DES MINERALOKORTIKOID-REZEPTORS	1
1.2.1 Vorkommen und allgemeine Wirkungen des Mineralokortikoid-Rezeptors <i>in vivo</i>	2
1.2.2 Struktureller Aufbau des Mineralokortikoid-Rezeptors	2
1.2.3 Selektivität des Mineralokortikoid-Rezeptors	4
1.2.4 Physiologische Mineralokortikoid-Rezeptor/Aldosteron Wirkungen	4
Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS)	5
1.2.5 Pathophysiologische Mineralokortikoid-Rezeptor/Aldosteron-Wirkungen	6
1.2.6 Nicht-genotrope Mineralokortikoid-Rezeptor/Aldosteron-Wirkungen	7
1.3 CHARAKTERISIERUNG DER PROTEIN-PHOSPHATASE CALCINEURIN	10
1.3.1 Vorkommen und allgemeine Wirkung von Calcineurin <i>in vivo</i>	10
1.3.2 Struktureller Aufbau	11
1.3.3 Mechanismus der Calcineurin-Aktivierung	13
1.3.4 Physiologische Calcineurin-Wirkungen	14
1.3.4.1 Calcineurin und CREB	14
1.3.4.2 Calcineurin und NFAT	14
1.3.4.3 Calcineurin und MEF2	16
1.3.4.4 Regulation der Calcineurin-Aktivität durch interagierende Proteine	17
1.3.5 Pathophysiologische Calcineurin Wirkungen	18
1.4 ZIELSTELLUNG DER ARBEIT	20
Analyse des Mineralokortikoid-Rezeptor-Calcineurin-Signalnetzwerkes	20
2. MATERIAL & METHODEN	22
2.1. CHEMIKALIEN	22
2.1.1 Lösungen und Puffer	22
2.2. BAKTERIENKULTIVIERUNG	22
2.2.1. <i>Escherichia coli</i>	22
2.2.2 Dauerhafte Lagerung von Bakterien	23
2.3 ZELLKULTUR	23

2.3.1 Humane embryonale Nierenzellen - HEK293-Zellen	23
2.3.2 Einfrieren und Auftauen von HEK293-Zellen	24
2.4 PLASMIDE	24
2.4.1 Transfektion von Plasmid-DNA in humane Zellen	25
2.4.2 Transfektion von siRNA in humane Zellen	25
2.5. MOLEKULARBIOLOGISCHES ARBEITEN MIT RNA	27
2.5.1 Isolieren von RNA	27
2.5.2 Bestimmen von RNA- bzw. DNA-Konzentrationen	27
2.6 MOLEKULARBIOLOGISCHES ARBEITEN MIT DNA	27
2.6.1 Isolieren von Plasmid-DNA	27
2.6.2 Sequenzierung	27
2.6.3 Primer-Design	27
2.6.4 Reverse Transkriptionsreaktion	28
2.6.5 Polymerase-Ketten-Reaktion	30
2.6.6 Auftrennen von DNA-Fragmenten mittels Agarose-Gelelektrophorese	31
2.6.7 Quantitative Real-time PCR	32
2.6.8 Aufreinigung und Isolierung von DNA-Fragmenten	33
2.6.9 Herstellung eines pMEF2-SEAP-Plasmides	34
2.6.9.1 Oligohybridisierung	34
2.6.10 Auftrennen und Isolieren von DNA-Fragmenten mittels PAGE-Gelelektrophorese	35
2.6.11 DNA-Fällung	35
2.6.12 Spezifische Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen	36
2.6.13 Ligation von DNA-Fragmenten	36
2.6.14 Chemische Transformation von <i>E. coli</i>	37
2.7. PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN	37
2.7.1 Isolation von Proteinen von HEK293-Zellen	37
2.7.2 Isolierung von Zytosol- und Zellkernfraktion von HEK293-Zellen	37
2.7.3 Proteinbestimmung	38
2.7.3.1 BCA (Bicinchoninsäure)-Assay	38
2.7.3.2 Bradford-Assay	38
2.7.4 Herstellen von Proteinlysaten aus HEK293-Zellen	38
2.7.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	38
2.7.6 Westernblot-Analysen	39
2.8 Co-IMMUNOPRÄZIPITATION	42
2.9 SEAP-REPORTERGEN-ASSAY	42
2.10 IMMUNFLUORESCENZ	44
2.11 STATISTISCHE ANALYSE	45

3. ERGEBNISSE	46
3.1. EINFLUSS DES AKTIVIERTEN MINERALOKORTIKOID-REZEPTORS AUF DIE EXPRESSION DER KATALYTISCHEN CALCINEURIN-ISOFORMEN PP2BA-A UND PP2BA-B.....	46
3.2. HERUNTERREGULATION DER KATALYTISCHEN CALCINEURIN-ISOFORMEN PP2BA-A UND PP2BA-B DURCH siRNA .	47
3.3 ANALYSE DES EINFLUSSES DES AKTIVIERTEN MINERALOKORTIKOID-REZEPTORS UND CALCINEURINS AUF DIE TRANSKRIPTIONSAKTIVITÄT VERSCHIEDENER ZYTOSOLISCHER SIGNALWEGE	51
3.3.1 <i>Einfluss des Mineralokortikoid-Rezeptors und Calcineurins auf die CREB-</i> <i>Transkriptionsaktivierung</i>	51
3.3.2 <i>Einfluss von Mineralokortikoid-Rezeptor und Calcineurin auf die MEF2-</i> <i>Transkriptionsaktivierung</i>	53
3.3.2.1 Konstruktion eines MEF2-SEAP-Plasmides.....	53
3.3.2.2 Stimulation der MEF2-Transkriptionsaktivität durch aktivierten Mineralokortikoid-Rezeptor	54
3.3.3 <i>Einfluss von Mineralokortikoid-Rezeptor und Calcineurin auf die NFAT-</i> <i>Transkriptionsaktivierung</i>	56
3.3.4 <i>Mechanistische Analyse der MR-induzierten MEF2- und NFAT-Transkriptionsaktivität</i>	58
3.3.4.1 Dosis-Wirkungsbeziehung der MR-vermittelten MEF2- und NFAT-Transkriptionsregulation im Vergleich zur klassischen GRE-Aktivierung.....	58
3.3.4.2 Einfluss der MR-Domänen auf die MEF2-/NFAT-Transkriptionsaktivität	59
3.3.4.3 Einfluss von HSP90 auf die MR-induzierte MEF2-/NFAT-Transkriptionsaktivität.....	60
3.4 ANALYSE DER MR-PP2B INTERAKTION	61
3.5 ANALYSE DES MINERALOKORTIKOID-REZEPTOR EINFLUSSES AUF DIE SUBZELLULÄRE LOKALISATION DES CALCINEURINS	65
3.5.1 Analyse von Zellkern- und Zytosolfraktion.....	65
3.5.2 Immunfluoreszenz.....	68
3.6 EINFLUSS DER MINERALOKORTIKOID-REZEPTOR INDUZierten PP2BA-ABHÄNGIGEN GENEXPRESSION	72
3.7 ROLLE ENDOGENER INHIBITOREN DES CALCINEURIN	73
4. DISKUSSION	75
4.1 ROLLE VON ENDOGENEN CALCINEURIN-INHIBITOREN.....	76
4.2 ANALYSE DER NICHT-GENOTROPEN MR-INDUZierten WECHSELWIRKUNG ÜBER CALCINEURIN AUF VERSCHIEDENE ZYTOSOLISCHE SIGNALKASKADEN.....	77
4.3 ANALYSE DER MINERALOKORTIKOID-REZEPTOR-CALCINEURIN-INTERAKTION.....	86
4.4 SUBZELLULÄRE LOKALISATION VON CALCINEURIN IN DER ZELLE.....	88
5. ZUSAMMENFASSUNG	94
LITERATURVERZEICHNIS.....	97
ANHANG	A

Abkürzungsverzeichnis

AC	Adenylatzyklase
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
AID	Autoinhibitorisches Peptid
Amp	Ampicillin
API	<i>activating protein 1</i>
BAPTA	1, 2- bis(o-Aminophenoxy)ethyl-N,N,N',N' -Tetraacetylsäure
bp	Basenpaare
BCA	Bicinchoinsäure
CaM	Calmodulin
CnA	katalytische A Untereinheit des Calcineurins
CnB	regulatorische B Untereinheit des Calcineurins
CRE	<i>cAMP response element</i>
CREB	<i>cAMP response element binding protein</i>
CyP-CsA	Cyclophilin A-Cyclosporin A
DAG	Diacylglycerin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DBD	DNA-Bindungsdomäne
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamin-Tetraessigsäure
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
ERK5	extrazellulär regulierte Kinase 5
eGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
GR	Glukokortikoid-Rezeptor
G6PD	Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase
GRE	<i>glucocorticoid response element</i> , Glukokortikoid-responsives Element
HRE	Hormon-responsives Element
HRP	<i>horse radish peroxidase</i>
HDAC	Histondeacetylase
IMM	Immunophiline
Kan	Kanamycin
kDa	Kilo-Dalton
LB	Lauria Bertani
LBD	Ligandenbindungsdomäne
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NFAT	<i>nuclear factor of activated T-cells</i>
NFκB	<i>nuclear factor of activated B-cells</i>
NLS	<i>nuclear localisation signal</i> , Kernlokalisierungssignal
NES	<i>nuclear export signal</i> , Kernexportsignal
NTD	N-terminale Bindungsdomäne
MEF2	<i>myocyte enhancer factor 2</i>
MR	Mineralokortikoid-Rezeptor
OD	optische Dichte bei x nm
ONPG	<i>o</i> -Nitrophenyl-β-D-galactopyranosid
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C

RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RANTES	<i>regulated upon activation normal T-cell expressed and secreted</i>
ROS	<i>reactive oxygen species</i> , reactive Sauerstoffspezies
PP2B	Calcineurin
SGK	<i>serum and glucocorticoid induced kinase</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS	Tris buffered saline
TBST	Tris buffered saline + Tween 20
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TNF α	<i>tumor necrose factor α</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RFP	<i>red fluorescent protein</i>
SDS	Sodiumdodecylsulfat
scr-siRNA	scrambled-siRNA, <i>non-targeted</i> siRNA
UTR	<i>untranslated region</i>
% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Gewichtsprozent

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: Schematische Darstellung der Proteindomänen von MR und GR ¹⁶	2
Abb. 1.2: Regulation des Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS).....	5
Abb. 1.3: Pathophysiologische Aldosteron-Wirkung im kardiovaskulären System.....	7
Abb. 1.4: Calcineurin-Heterodimer.....	11
Abb. 1.5: Schematische Darstellung der Calcineurin-Proteindomänen	12
Abb. 1.6: Mechanismus der Calcineurin-Aktivierung durch Ca ²⁺ /CaM	14
Abb. 1.7: Modell einer möglichen Wechselwirkung von MR und PP2B mit zytosolischen Signalkaskaden (CREB/MEF2/NFAT) in HEK293-Zellen im Rahmen der pathophysiologischen Aldosteron-Wirkung	21
Abb. 3.1: Proteinexpression der katalytischen Calcineurin-Isoformen PP2BA- α und PP2BA- β nach MR-Aktivierung.....	46
Abb. 3.2 A: Konzentrations- abhängige Reduktion von PP2BA- α mRNA mittels siRNA	47
Abb. 3.2 B: Zeit-abhängige Reduktion von PP2BA- α Proteinexpression mittels siRNA.....	47
Abb. 3.3: PP2BA- α und PP2BA- β Proteinexpression unter Verwendung von scr-siRNA.....	48
Abb. 3.4: Spezifische Reduktion der PP2BA- α mRNA-Expression unter Verwendung von siRNA.....	48
Abb. 3.5: Spezifische Reduktion der PP2BA- α Proteinexpression unter Verwendung von siRNA.....	49
Abb. 3.6: Spezifische Reduktion der PP2BA- β mRNA-Expression unter Verwendung von siRNA	50
Abb. 3.7: Spezifische Reduktion der PP2BA- β Proteinexpression unter Verwendung von siRNA.....	50
Abb. 3.8: Einfluss der MR-Aktivierung sowie der Herunterregulation von PP2BA- α/β auf die CRE-Transkriptionsaktivität.....	52
Abb. 3.9: Konstruktion eines MEF2-SEAP-Plamides	53
Abb. 3.10: Stimulation der MEF2-Transkriptionsaktivität durch MR-Aktivierung.....	54
Abb. 3.11: MEF2-Transkriptionsaktivität nach MR- bzw. GR-Stimulation	54
Abb. 3.12: MEF2-Transkriptionsaktivität nach MR-Stimulation und spezifischer Reduktion von PP2BA- α und PP2BA- β durch siRNA.....	55
Abb. 3.13: Stimulation der NFAT-Transkriptionsaktivität durch MR-Aktivierung	56
Abb. 3.14: NFAT-Transkriptionsaktivität nach MR- bzw. GR-Stimulation.....	56
Abb. 3.15: NFAT-Transkriptionsaktivität nach MR-Stimulation und spezifischer Reduktion von PP2BA- α und PP2BA- β durch siRNA.....	57
Abb. 3.16: Dosis-Wirkungsbeziehung von GRE-, NFAT- und MEF2-Transkriptionsaktivität in Abhängigkeit verschiedener Aldosteron-Konzentrationen.....	58
Abb. 3.17: NFAT-/MEF2-SEAP-Transkriptionsaktivität in Abhängigkeit der trunkierten MR-Varianten MR ^{DEF} und MR ^{CDEF}	59
Abb. 3.18: Einfluss des HSP90-Inhibitors Geldanamycin auf die NFAT- bzw. MEF2-Transkriptionsaktivität	60
Abb. 3.19: Nachweis der Spezifität des in der Co-Immunopräzipitation verwendeten monoklonalen anti eGFP-Antikörpers	62
Abb. 3.20: Nachweis eines MR-HSP90-PP2BA- β Proteinkomplexes mittels Co-Immunopräzipitation.....	63

<i>Abb. 3.21: Nachweis einer HPS90-sensitiven Co-Immunopräzipitation von eGFP-MR mittels Geldanamycin</i>	<i>64</i>
<i>Abb. 3.22: Proteinexpression und Quantifizierung von MR, PP2BA-α, PP2BA-β in Zellkern- und Zytosol-Fraktion in Abhängigkeit unterschiedlicher Stimuli</i>	<i>67</i>
<i>Abb. 3.23: Nachweis der Lokalisation von PP2BA nach MR-Aktivierung mittels Immunfluoreszenz.....</i>	<i>69</i>
<i>Abb. 3.24: Quantifizierung der Lokalisation von PP2BA nach MR-Aktivierung in RFP und MR-RFP transfizierten HEK293-Zellen.....</i>	<i>70</i>
<i>Abb. 3.25: Nachweis der Lokalisation von PP2BA-β nach MR-Aktivierung mittels Immunfluoreszenz.....</i>	<i>71</i>
<i>Abb. 3.26: eNOS mRNA-Expressionslevel 96 h nach siRNA-Transfektion.....</i>	<i>72</i>
<i>Abb. 3.27: CAIN und RCAN1 mRNA-Expression nach MR-Stimulation.....</i>	<i>73</i>
<i>Abb. 5.1: Modell der Wechselwirkung von MR und PP2B im Rahmen der pathophysiologischen Aldosteron-Wirkung.....</i>	<i>96</i>

Tabellenverzeichnis

<i>Tab. 2.1: Häufig verwendete Lösungen und Puffer.....</i>	<i>22</i>
<i>Tab. 2.2: Nährmedien für E. coli.....</i>	<i>23</i>
<i>Tab. 2.3: Verwendete Antibiotika</i>	<i>23</i>
<i>Tab. 2.4: Häufig verwendete Plasmide</i>	<i>24</i>
<i>Tab. 2.5: Sequenzen der verwendeten siRNAs</i>	<i>25</i>
<i>Tab. 2.6: Verwendete Oligonukleotide in Real-Time PCR</i>	<i>28</i>
<i>Tab. 2.7: Verwendete Oligonukleotide für Oligohybridisierung.....</i>	<i>34</i>
<i>Tab. 2.8: Zusammensetzung des PAGE-Gels.....</i>	<i>35</i>
<i>Tab. 2.9: Zusammensetzung der Polyacrylamid-Gele.....</i>	<i>39</i>
<i>Tab. 2.10: Verwendete Primär-Antikörper für die Detektion der katalytischen Untereinheiten des Calcineurins.....</i>	<i>40</i>
<i>Tab. 2.11: Verwendete Primär-Antikörper.....</i>	<i>41</i>
<i>Tab. 2.12: Verwendete Sekundär-Antikörper.....</i>	<i>41</i>
<i>Tab. 2.13: verwendete Substanzen und Konzentrationen für die Stimulation der HEK293-Zellen im SEAP-Reporter-Gen-Assays</i>	<i>42</i>
<i>Tab. 2.14: Verwendete Antikörper in der Immunfluoreszenz.....</i>	<i>44</i>

1. Einleitung

1.1 Vorwort

Kardiovaskuläre Erkrankungen sind die häufigsten Todesursachen in Industrienationen¹. Anhand verschiedener Tier- und Patientenstudien rückte die Bedeutung des Mineralokortikoid-Rezeptors (MR) bei der Ausbildung renokardiovaskulärer Erkrankungen in den Fokus der Forschung². Die Entstehung pathophysiologischer Merkmale wie Inflammation, Fibrose, vaskuläres Remodeling und Hypertrophie konnten durch MR-Blockade verhindert werden³⁻⁸. In klinischen Studien wie RALES (*Randomized Aldactone Evaluation Study*) führte die Behandlung der linksventrikulären Dysfunktion bei Herzinsuffizienz-Patienten mit dem MR-Antagonist Spironolakton zu einer Senkung von Morbidität und Mortalität⁷. Unter Verwendung des spezifischeren MR-Antagonisten Eplerenon wurden die durch RALES gewonnenen Daten in einer weiteren klinischen Studie EPHEBUS (*Eplerenon-Post-Acute Myocardial Infarction Heart Failure Efficacy and Survival Study*) bestätigt⁸. Es gibt Hinweise darauf, dass eine MR-induzierte Fibrose am Herzen durch Eplerenon nicht nur verhindert, sondern auch rückgängig gemacht werden kann⁹. Aufgrund dieser drastischen Reduktion der Mortalität von Herzinsuffizienz-Patienten trat die mechanistische Analyse kardiovaskulärer Erkrankungen, hervorgerufen durch den MR, in den Vordergrund¹⁰.

1.2 Charakterisierung des Mineralokortikoid-Rezeptors

Der MR, sowie sein nächster Verwandter der Glukokortikoid-Rezeptor (GR), gehören zur Superfamilie der nuklearen Rezeptoren (NR), speziell zur Superfamilie III¹¹⁻¹⁵. Die Steroidhormonrezeptoren dieser Superfamilie III wie der Östrogen-Rezeptor (ER), Glukokortikoid-Rezeptor (GR), Mineralokortikoid-Rezeptor (MR), Progesteron-Rezeptor (PR) und Androgen-Rezeptor (AR) werden Liganden-abhängig reguliert und wirken als Transkriptionsfaktoren^{14,15}.

1.2.1 Vorkommen und allgemeine Wirkungen des Mineralokortikoid-Rezeptors *in vivo*

Der MR wird in verschiedenen epithelialen Geweben wie Niere, Darm, Speichel- und Schweißdrüsen exprimiert, aber auch im Nervensystem (Hippocampus), in Kardiomyocyten, in Endothelzellen und glatten Gefäßmuskelzellen^{2,16}. In epithelialen Geweben kontrolliert der MR über das Steroidhormon Aldosteron die renale und intestinale Na⁺- und Wasserreabsorption und somit langfristig die Regulation des Blutdruckes⁷. In nicht-epithelialen Geweben hingegen verursacht der MR zahlreiche pathophysiologische Effekte wie Inflammation, Fibrose, Remodeling und Hypertrophie^{6,7}. Der GR wirkt auf den Kohlenhydrat-, Fett- und Proteinstoffwechsel und induziert, im Gegensatz zum MR, anti-inflammatorische Wirkungen^{17,18}.

1.2.2 Struktureller Aufbau des Mineralokortikoid-Rezeptors

Die Steroidhormonrezeptoren der Superfamilie III werden in 4 große Proteindomänen unterteilt, die unterschiedliche konservierte Aminosäuresequenzbereiche aufweisen (Abb. 1.1)^{14,19,20}, wobei die strukturelle Ähnlichkeit des MR zum GR am Größten ist^{16,21}.

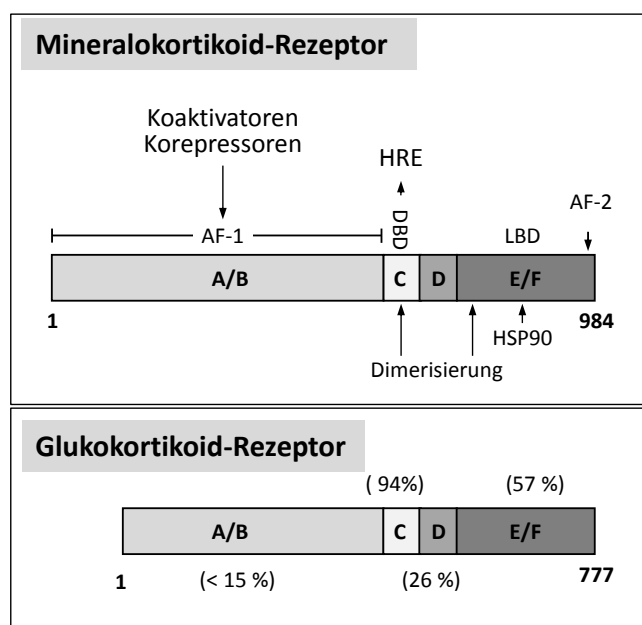


Abb. 1.1: Schematische Darstellung der Proteindomänen von MR und GR¹⁶

A/B-Region: N-terminale Domäne für Koaktivator/Korepressor-Bindung; C-Region: DNA-Bindungsdomäne (DBD); D-Region: Scharnierregion; E/F-Region: Liganden-Bindungsdomäne (LBD). AF: Transaktivierungsdomäne; HRE: Hormon-responsives Element^{22,23}. Die %-Zahlen geben die Aminosäuresequenzübereinstimmung der GR-Domänen zum MR wieder.

Die aminoternale A/B-Region des MR ist die längste Domäne (603 aa) und zeigt im Vergleich aller Steroidhormonrezeptoren die geringste Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz (< 15 % Homologie)¹⁴. Die Transaktivierungsdomäne AF-1 trägt

zur Gesamttransaktivierungsaktivität des Rezeptors, in Abhängigkeit von der zellulären Situation und dem Promotorkontext, bei. Der MR besitzt in dieser Region ein für den Kernimport wichtiges Kernlokalisierungssignal (*nuclear localisation signal*, NLS) ²⁴. Aufgrund der hohen Sequenzvariabilität von MR und GR, ist davon auszugehen, dass diese Region entscheidend zur Spezifität von MR und GR beiträgt.

Die zentrale C-Region, die DNA-Bindungsdomäne (DBD), spielt eine wichtige Rolle bei der Liganden-abhängigen Bindung des Rezeptors an DNA-Sequenzen durch zwei Cystein-reiche Zinkfinger motive ²⁵⁻²⁷. MR und GR weisen eine Homologie von 94% in der Aminosäuresequenz dieser Region zueinander auf und binden das gleiche Hormon-responsive Element, GRE (*glucocorticoid response element*) ^{28,29}. Die DBD vermittelt die Rezeptordimerisierung und ist aus verschiedenen Sequenzelementen (P-, D-, T- und A-Box) aufgebaut ³⁰. Diese Boxen sind z. B. wichtig für die Response-Element Spezifität ²⁵. Die DBD kann posttranskriptional modifiziert werden und ist an der Kernlokalisierung (*nuclear export signal*, NES) sowie der Interaktion mit Transkriptionsfaktoren und Koaktivatoren beteiligt ²⁸.

Die Scharnierregion, D-Region, der Steroidhormonrezeptoren ist eine prolinreiche Region und schwach konserviert. Sie ermöglicht eine Rotation von DBD und LBD zueinander, wodurch die Aktivität des Rezeptors reguliert wird ²⁸. Zudem spielt die Scharnierregion eine wichtige Rolle bei der Rezeptordimerisierung ^{28,31}.

In der C-terminalen Ligandenbindungsdomäne (LBD; E/F-Region) sind MR und GR weniger stark konserviert und zeigen in dieser Domäne eine Homologie von ~60%. Die E/F-Region vermittelt die Bindung von Liganden, die Dimerisierung, die Bindung von Koregulatoren sowie die Liganden-abhängige Transaktivierung durch die AF-2-Domäne. Chaperone, wie HSP70 und HSP90 oder Immunophiline, können in dieser Region binden ^{32,33}. Für die Ligandenbindung ist die LBD strukturell aus einem antiparallelen α -helikalem Sandwich, mit 12 α -Helices und einem kurzen aus drei antiparallelen Schichten bestehendem β -Faltblatt (hydrophobe Bindungstasche), aufgebaut ³⁴. Im Bereich der LBD liegt das NLS2, welches durch Ligandenbindung demaskiert wird und somit eine Steroidhormon-abhängige Translokation des MR in den Zellkern bewirkt ²⁴.

1.2.3 Selektivität des Mineralokortikoid-Rezeptors

Der MR bindet seinen endogenen Liganden Aldosteron mit ähnlicher Affinität wie die Glukokortikoide Cortisol (Mensch) und Cortikosteron (Nager), die in höherer Konzentration im Blut zirkulieren als Aldosteron³⁵⁻³⁷. Aldosteron wird mit deutlicher Rezeptorselektivität nur vom MR, nicht vom GR, gebunden. Für die Aldosteron-Selektivität des MR spielt das Enzym 11- β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase 2 (11- β HSD2) eine wichtige Rolle. Dieses Enzym ist in manchen Aldosteron-sensitiven epithelialem Gewebe, wie Niere, Darm und Speicheldrüsen exprimiert und wandelt aktives Cortisol und Cortikosteron in reduzierte Mediate, Cortison und 11-Hydroxycorticosteron, um. Diese inaktiven Derivate können nicht mehr vom MR oder GR gebunden werden^{16,36,38}. In der Niere, wo MR und 11- β HSD2 gleichzeitig exprimiert werden, kann Aldosteron selektiv und konzentrationsabhängig wirken, da die 11- β HSD2 hier eine hohe Aktivität besitzt^{16,38}. Aldosteron ist durch seine hemiacetale Konformation der 11-Hydroxylgruppe mit der 18-Aldehydgruppe kein Substrat für die 11- β HSD2. Bei fehlender 11- β HSD2-Expression in nicht epithelialem Gewebe, z. B. im Herzen, im Hippocampus oder beim AME-Syndrom (*apparent mineralocorticoid excess*) wirkt der MR als Cortikosteroid-Rezeptor aufgrund einer Daueraktivierung durch Glukokortikoide^{10,36}. Da bei Patienten der RALES- und EPHEBUS-Studie^{7,8} keine erhöhten Aldosteron-Konzentrationen verifiziert werden konnten und eine MR-Aktivierung v.a. in nicht-epithelialen Geweben pathophysiologische Veränderungen hervorruft, müssen andere molekulare Mechanismen für die Rezeptorspezifität verantwortlich sein¹⁰.

1.2.4 Physiologische Mineralokortikoid-Rezeptor/Aldosteron Wirkungen

In allen Aldosteron-sensitiven Zellen wird neben dem MR auch der GR exprimiert³⁹. Beide Steroidhormon-Rezeptoren lokalisieren im inaktivierten Zustand im Zytosol, stabilisiert durch die Bindung von Chaperonen (z. B.: HSP70 und HSP90) und Immunophilinen^{33,40-42}. Nach Aktivierung durch ihre Liganden, Aldosteron bzw. Cortisol, wirken MR und GR als Liganden-abhängige Transkriptionsfaktoren. Sie translozieren Hormon- und HSP90-abhängig in den Zellkern und beeinflussen dort die Expression verschiedener Gene durch Bindung an Glukokortikoid-responsive Elemente (GRE) in Enhancer- oder Promotor-Regionen^{16,43}. Bekannte Gene, die MR-abhängig reguliert werden, sind z. B. Natrium-Kalium Adenosintriphosphatase (Na^+ - K^+ -ATPase),

Serum- und Glukokortikoid-regulierte Kinasen (SGK) und der epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR)⁴⁴⁻⁴⁶.

Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS)

Das Steroidhormon Aldosteron wird in der Nebennierenrinde (NNR), der *Zona glomerulosa*, aus Cholesterin durch die Aldosteronsynthese (CYP11B2) im geschwindigkeitsbestimmenden Schritt, gebildet⁴⁷. Die Aldosteron-Sekretion aus der NNR wird durch die Renin-Angiotensin-Aldosteron-(RAAS)-Kaskade gesteuert. Diese Hormon-Kaskade spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation des Wasser- und Elektrolythaushaltes des Körpers sowie der Aufrechterhaltung des Gefäßtonus und somit der Regulation des Blutdruckes³⁷ (Abb. 1.2).

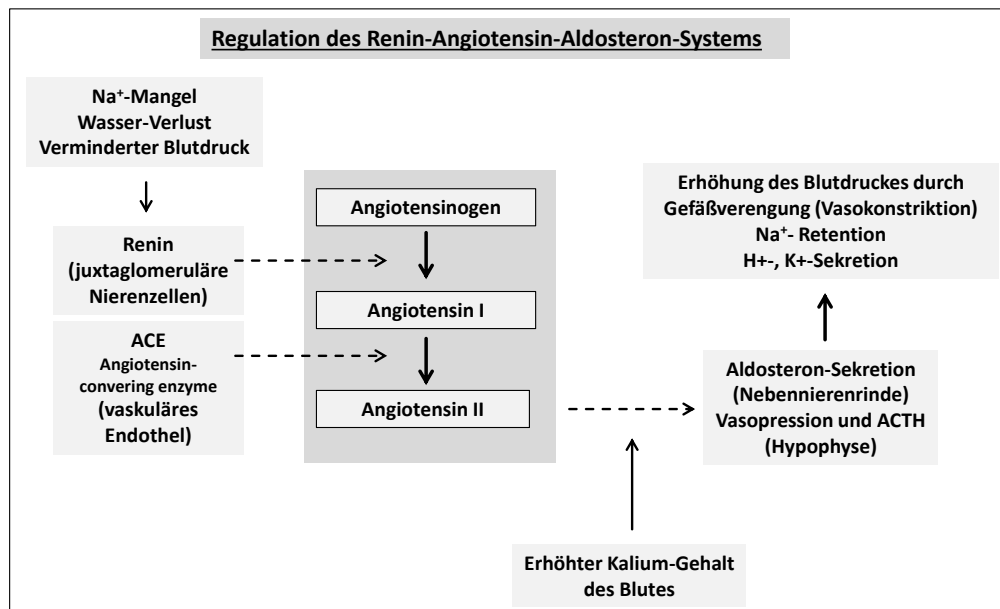


Abb. 1.2: Regulation des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS)

Ein verminderter Blutdruck oder der Verlust von Wasser sowie eine verringerte Kochsalz-Konzentration im distalen Tubulus der Nierenkanälchen (*Macula densa*) aktivieren die Ausschüttung des Enzyms Renin aus juxtaglomerulären Nierenzellen. Renin katalysiert die Abspaltung des Angiotensin I (Ang I, Dekapeptid), des aus der Leber freigesetzten Prohormons Angiotensinogen. Das *Angiotensin-converting enzyme* (ACE) bildet aus Ang I Angiotensin II (Ang II, Oktapeptid). Ang II, als auch ein erhöhter Kalium-Gehalt des Blutes sind wichtige Stimuli für die Aldosteron-Freisetzung aus der NNR und wirken vasokonstriktorisch und somit Blutdruck steigernd⁴⁸ (Abb. 1.2). Verschiedene Studien zeigen, dass Gefäß- und Herzerkrankungen zum Teil im Zusammenhang mit einer inadäquaten Aktivierung des RAAS einhergehen können

49-51

1.2.5 Pathophysiologische Mineralokortikoid-Rezeptor/Aldosteron-Wirkungen

Der MR verursacht, unabhängig von seiner klassischen physiologischen Wirkung in epithelialen Geweben, pathophysiologische Effekte in nicht-epithelialen Geweben wie dem Herz-Kreislaufsystem (Abb. 1.3). Die molekularen Mechanismen der pathophysiologischen Aldosteron-Wirkung sind weitestgehend unbekannt. Histologisch äußert sich ein Aldosteron-induziertes kardiales Remodeling in Form von Proliferation von Kardiofibroblasten (Fibrose), eine gesteigerte Kollagen-I- und Kollagen-III-Synthese sowie durch perivaskuläre Entzündungen⁵²⁻⁵⁶. Die Expression von Entzündungsmarkergenen, wie TNF α (*tumor necrose factor α*), COX2 (Cyclooxygenase 2) oder Osteopontin, wird hochreguliert^{52,57}. Die pathophysiologische Aldosteron-Wirkung wird durch hohe Salzaufnahme begünstigt, unabhängig von Blutdruckwerten^{58,59}. Es gibt ebenso Hinweise darauf, dass Aldosteron Veränderungen im Redox-Zustand der Zelle mit veränderter ROS-Bildung hervorruft, wodurch pathophysiologische MR-Wirkungen induziert werden^{60,61} (Abb. 1.3).

Das Auftreten von pathophysiologischen Veränderungen im Organismus, hervorgerufen durch Aldosteron als Mediator, geht nicht hauptsächlich mit einer inadäquaten Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems einher, da bei Patienten der RALES- und EPHEBUS-Studie^{7,8} ein vermindertes ventrikuläres Remodeling sowie eine reduzierte myokardiale Kollagenbildung bei physiologischen Aldosteron-Konzentrationen nach Spironolaktone- bzw. Eplerenone-Gabe beobachtet werden konnte. Das heißt Aldosteron allein führt nicht zu renokardiovaskulären Erkrankungen, sondern weitere Faktoren müssen an der Entstehung beteiligt sein z. B. nicht-genotrope MR-Effekte, die derzeit intensiv analysiert werden (siehe 1.2.6). Die durch RALES und EPHEBUS gewonnenen Daten, die eine drastische Reduktion der Morbidität und Mortalität von Herzinsuffizienz-Patienten zeigten, führte zur intensiven mechanistischen Analyse kardiovaskulärer Erkrankungen, die durch den MR induziert werden^{7,8}. Sorooshian et al. verifizierten, dass eine Aldosteron-Infusion in Kombination mit einer salzreichen Ernährung Bluthochdruck (Hypertension) und eine Proteinurie bei Wistar-Ratten auslösten. Sie schlussfolgerten, dass Aldosteron/Salz für renale Verletzungen verantwortlich sind⁶². Wang et al. veröffentlichte 1994, dass eine Barorezeptor-Dysfunktion bei Hunden durch Aldosteron zu einer Hypertension führt, deren Ausbildung durch Behandlung mit dem MR-Antagonist Spironolaktone verhindert werden konnte⁶³. Takeda et al. zeigten einen direkten Zusammenhang von maligner

Hypertension durch die lokale Aldosteron-Produktion in vaskulärem Gewebe durch eine erhöhte Salzaufnahme bei zum Schlaganfall neigenden spontan hypertensiven Ratten (SHRSP)-Ratten⁵. Eine Beteiligung von vaskulärem Aldosteron an der Ausbildung von Hypertension und vaskulärem Remodeling konnte durch verschiedene Arbeitsgruppen gezeigt werden^{4,5,64}. Die Arbeit von Qin et al. zeigte eine direkte Rolle von Aldosteron bei der Ausbildung von Fibrose, kardialer Hypertrophie und Herzinsuffizienz bei normaler Salzaufnahme durch Überexpression von 11- β HSD2 in Kardiomyocyten transgener Mäuse (Abb. 1.3). Aufgrund des Ausschaltens der Glukokortikoide, Cortisol und Cortikosteron, durch 11- β HSD2 findet eine inadäquate Aktivierung des MR durch Aldosteron statt. Der spezifische MR-Antagonist Eplerenon vermindert die strukturellen und funktionalen Veränderungen am Herzen der Mäuse⁵².

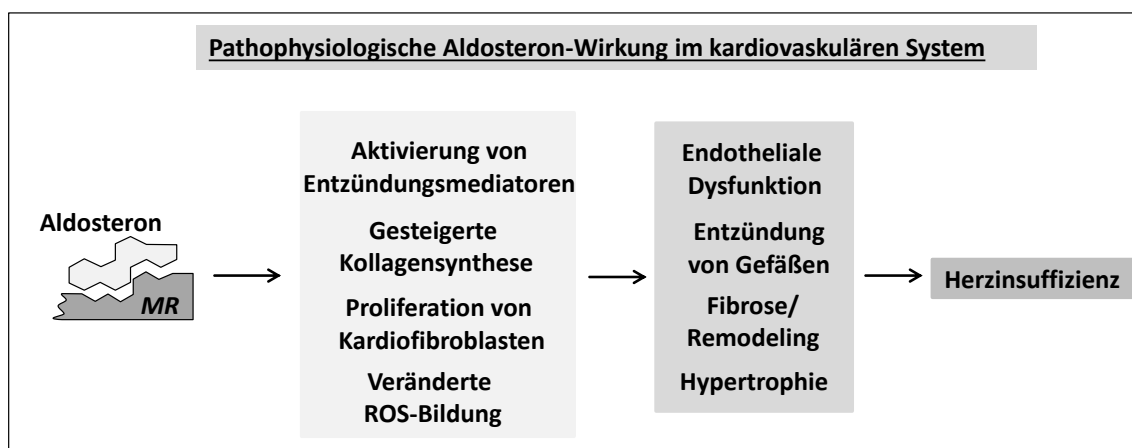


Abb. 1.3: Pathophysiologische Aldosteron-Wirkung im kardiovaskulären System

Eine Überaktivierung des MR mit Aldosteron führt zu Entzündungen in Gefäßen. Als Folge entstehen Fibrosen und Remodeling-Prozesse, die zur Entstehung von kardiovaskulären Schäden (Hypertrophie) führen. ROS: reaktive Sauerstoffspezies.

1.2.6 Nicht-genotrope Mineralokortikoid-Rezeptor/Aldosteron-Wirkungen

Nicht-genotrope Effekte finden sehr schnell, innerhalb von Sekunden oder Minuten in der Zelle statt und haben keinen direkten Einfluss auf die Expression von Genen, das heißt sie sind nicht durch Transkriptionsinhibitoren wie Actinomycin D oder Translationsinhibitoren wie Cycloheximid hemmbar⁶⁵. Verschiedene Möglichkeiten nicht-genotroper Aldosteron-Wirkungen in der Zelle werden zur Zeit genauer erforscht: putative neue Rezeptoren (1), *second messenger* Systeme (2) und Effektoren (3)⁶⁶.

Der molekulare Mechanismus der pathophysiologischen Aldosteron-Wirkung ist bisher noch weitestgehend unbekannt und durch unterschiedlich resultierende Effekte beschrieben. Der MR beeinflusst durch eine Interaktion mit zytosolischen

Signalkaskaden verschiedene Komponenten wie die Calcium-Konzentration oder die Aktivität von Proteinkinasen (PKA, PKC, PKD) sowie extrazellulär regulierte Kinasen, wodurch wiederum die Aktivität anderer Transkriptionsfaktoren beeinflusst wird^{46,65,67,68}. Kontrovers wird diskutiert, ob die nicht-genotrope Aldosteron-Wirkung MR-vermittelt stattfindet. Es gibt Hinweise auf vom klassischen MR-unabhängige, durch Aldosteron hervorgerufene Ca^{2+} -abhängige Erhöhung der cAMP-Konzentration unter Beteiligung der Proteinlipase C (PLC) und der Proteinkinase C (PKC)². Hierbei wurden physiologischen Aldosteron-Konzentrationen verifiziert. Diese schnellen Aldosteron-Effekte konnten nicht durch Spironolaktol inhibiert werden⁶⁸⁻⁷⁰. Andere Studien zeigen ein Zusammenspiel von Aldosteron und MR bei der Entstehung von nicht-genotropen Effekten, da diese durch den MR-Antagonisten RU28138 bzw. Eplerenon, nicht aber durch Spironolaktol, inhibiert werden konnten^{71,72}.

1.2.6.1 Mineralokortikoid-Rezeptor und cAMP/CREB-Signalkaskade

Es gibt Hinweise auf eine nicht-genotrope Interaktion des MR mit der zytosolischen cAMP/CREB-Signalkaskade^{73,74}. Die cAMP/CREB-Signalkaskade wird durch Stimulation eines membranständigen Rezeptors (z. B. β -Adrenorezeptoren) durch extrazelluläre Signale, wie Hormone oder Wachstumsfaktoren aktiviert. Dies führt zur G-Protein-vermittelten Adenylatzyklase (AC)-Aktivierung und Produktion des *second messengers* cAMP. Die durch cAMP stimulierte Proteinkinase A (PKA) phosphoryliert z. B. den Transkriptionsfaktor CREB (*cAMP response element binding protein*) am Ser133, wodurch die Expression von CRE-abhängigen Genen durch Rekrutierung weiterer Transkriptionsfaktoren aktiviert wird⁷⁵. Die CREB-Aktivierung spielt eine wichtige Rolle bei Zellwachstum und Proliferation⁷⁵ und zeigt anti-fibrotische und anti-oxidative Wirkungen^{73,74}.

Es ist bekannt, dass die Funktionalität des MR entscheidend durch unterschiedliche Protein-Protein-Wechselwirkungen z. B. durch Interaktion mit verschiedenen Chaperonen (HSP90), reguliert wird³³. Ein möglicher Interaktionspartner, der in der Zelle für Dephosphorylierungsvorgänge verantwortlich ist, ist die Phosphatase Calcineurin (PP2B)⁷⁶⁻⁷⁸. Verschiedene Studien zeigen, dass eine Überaktivierung des Calcineurins ähnliche pathophysiologische Veränderungen im kardialen System (Inflammation, Remodeling-Prozesse) hervorruft wie für den MR beobachtet wurden^{77,79-85}. In verschiedenen *in vivo* Studien konnte eine mögliche Wechselwirkung von

MR und Calcineurin als relevanter Mechanismus für das Ausbilden von Fibrose und kardialer Hypertrophie verifiziert werden. Der Einsatz von Calcineurin-Inhibitoren, wie Cyclosporin A oder Takrolimus, verursachte ein Abmildern dieser Krankheitssymptome⁸⁶⁻⁸⁸. In Rattennierenzellen wurde eine nicht-genotrope Aldosteron-Wirkung über eine HSP90- und HSP70-abhängige Aktivierung von Calcineurin gezeigt⁸⁹. Mano et al. verifizierten 2004 eine Steuerung des mitochondrialen apoptotischen Signalweges durch Aldosteron über Calcineurin und Dephosphorylierung des proapoptischen Proteins Bad⁸⁸. Die Arbeit von Takeda et al. zeigte einen direkten Zusammenhang zwischen Aldosteron und Calcineurin bei der Ausbildung von Herzhypertrophie und Fibrose⁸⁷. In HEK293-Zellen wurde eine MR induzierte Calcineurin-abhängige Inhibierung der cAMP/CRE-Signalkaskade beobachtet, die mit einer erhöhten Calcineurin-Aktivität, einer vermehrten CREB-Dephosphorylierung sowie einer reduzierten Expression der CREB-abhängigen G6PD einhergeht. Eine Abnahme der G6PD-Expression konnte durch den Calcineurin-Inhibitor Cyclosporin A verhindert werden⁷³. Aufgrund dieser Beobachtungen soll aufgeklärt werden, ob der aktivierte MR möglicherweise zum Teil über Calcineurin seine pathophysiologischen Effekte vermittelt.

1.3 Charakterisierung der Protein-Phosphatase Calcineurin

Phosphoprotein-Phosphatasen regulieren metabolische Signalwege wie den Glykogen-Stoffwechsel, die Glukoneogenese, Fettsäure- und Protein-Synthese durch Dephosphorylierung von Serin- und Threonin-Resten verschiedener Zielproteine⁹⁰. PP1, PP2A, PP2B, PP4, PP5, PP6, PP7 werden den Phosphoprotein-Phosphatasen zugeordnet und gehören zur großen Familie der Metallophosphatasen⁹⁰⁻⁹².

Calcineurin (PP2B) ist die einzige Serin-/Threonin-Phosphatase dieser Gruppe die Ca^{2+} /Calmodulin-abhängig wirkt⁷⁶ und Serin- und Threonin-Reste verschiedener Transkriptionsfaktoren wie *cAMP response element binding protein* (CREB), *nuclear factor of activated T cells* (NFAT), *myocyte enhancer factor 2* (MEF2) dephosphoryliert und somit die Expression verschiedener Gene aktiviert oder inhibiert^{73,78,90,93,94}. Eine spezifische Hemmung von PP2B ist durch Takrolimus (FK-506) und Cyclosporin A (CsA) möglich. Diese Immunsuppressiva bilden mit den Immunophilinen FKBP12 bzw. Cyclophilin A (CyP A) einen binären Proteinkomplex aus (FKBP12-FK506 bzw. CyP-CsA), der dann direkt an PP2B bindet (ternärer Proteinkomplex) und dessen enzymatische Aktivität inhibiert^{92,95}. PP2B, wird als einzige Phosphatase dieser Klasse, spezifisch durch die Inhibitoren FKBP12-FK506 oder CyP-CsA gehemmt⁹⁶.

1.3.1 Vorkommen und allgemeine Wirkung von Calcineurin *in vivo*

PP2B spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation physiologischer Prozesse, die durch das Signalmolekül Calcium kontrolliert und synchronisiert werden, z. B. Fortpflanzung und Entwicklung, Zellproliferation, Muskelkontraktion, Migration von Neutrophilen, Regulation der Ionenkanalfunktion in Synapsen und die Entwicklung von Skelett- und Herzmuskel⁹⁷⁻¹⁰⁰. PP2B wirkt bei der Apoptose¹⁰¹ und als Modulator des Immunsystems, indem es Entzündungsantworten in der Zelle durch die Expression von Zytokinen¹⁰² und die T-Zell-Proliferation durch Stimulation der Interleukin-2 (IL-2) Expression über die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFAT beeinflusst¹⁰² (siehe 1.5.4.2). Verschiedene *in vivo* Studien zeigen ein mögliches Zusammenspiel von MR und PP2B bei der Entstehung von Fibrose und kardialer Hypertrophie, da Calcineurin-Inhibitoren diese Krankheitssymptome abmilderten⁸⁶⁻⁸⁸.

PP2BA- α und PP2BA- β werden *in vivo* ubiquitär, auch in Kardiomyocyten, exprimiert¹⁰³⁻¹⁰⁸. Die γ -Isoform hingegen wird nur im Hoden und in einer begrenzten Hirnregion

exprimiert¹⁰³⁻¹⁰⁸. Subzellulär ist PP2B hauptsächlich im Zytosol sowie in synaptomalen Zytoplasma lokalisiert, aber auch im Nukleus¹⁰⁵.

1.3.2 Struktureller Aufbau

PP2B, ein von Hefe bis Mensch hochkonserviertes Protein, ist aus einer katalytischen A Untereinheit (PP2BA; CnA, 57-61 kDa), und einer regulatorischen B Untereinheit (PP2BB, CnB, 16-19 kDa), aufgebaut¹⁰⁵.

Für CnA existieren 3 Isoformen $\alpha\beta\gamma$. Die katalytischen Isoformen, PP2BA- α und PP2BA- β werden zusammen mit CnB1, die γ -Isoform zusammen mit CnB2 coexprimiert^{76,109} (Abb. 1.4). CnA und CnB bilden zusammen ein obligates Heterodimer, das heißt bei fehlender CnB-Expression wird CnA instabil und schnell degradiert¹⁰⁹.

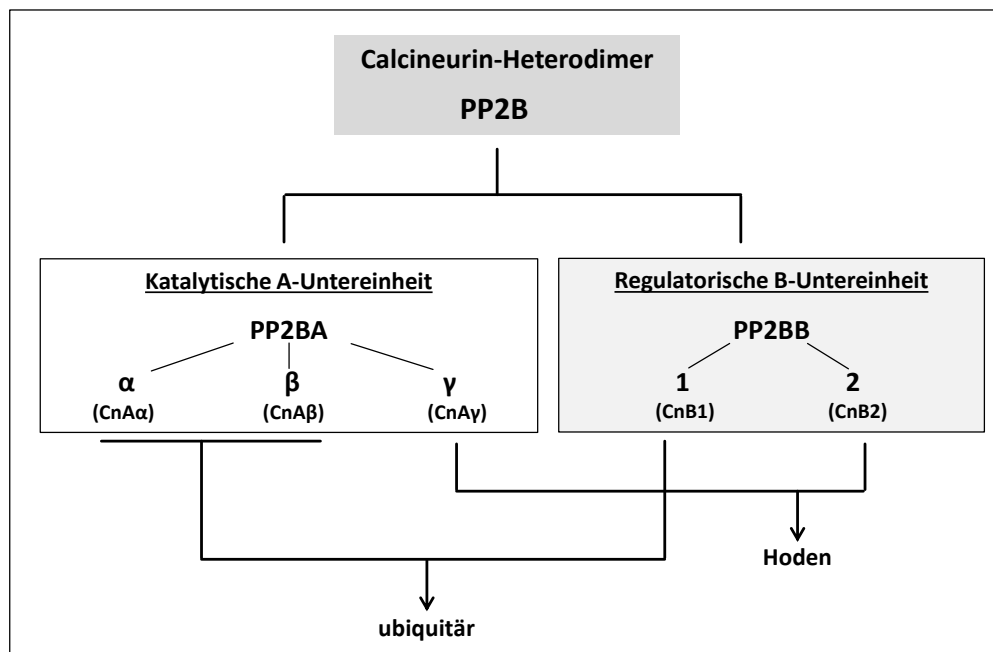


Abb. 1.4: Calcineurin-Heterodimer

Das Calcineurin-Heterodimer besteht aus einer katalytischen Untereinheit (PP2BA, CnA) und einer regulatorischen Untereinheit (PP2BB, CnB). Die Isoformen PP2BA- α und PP2BA- β werden zusammen mit CnB1 (PP2BB1) ubiquitär, die γ -Isoform (PP2BA- γ) zusammen mit CnB2 (PP2BB2) im Hoden und einer begrenzten Hirnregion, coexprimiert.

N- und C-Terminus von α -, β - und γ -Isoform weisen in allen Spezies die größte Variabilität auf (~10% des Gesamtproteins). Die Funktionen dieser Regionen sind unbekannt¹⁰⁵. Die restlichen 90% des Proteins weisen eine Homologie von 83-89% auf⁷⁶. Für PP2BA- α und PP2BA- β existieren drei Spleiß-Varianten, die zueinander eine hohe Sequenzhomologie ausweisen¹⁰⁵ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5530> bzw. [5532](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5532)), sich aber in ihrer Substrataffinität und katalytischen Wirkung unterscheiden¹¹⁰.

PP2BA- β besitzt N-terminal ein Polyprolin-Motiv, PP2BA- γ zusätzlich basische Reste in der N-terminalen Region⁷⁶.

CnA ist aus einer N-terminalen katalytischen Domäne, einer helikalen CnB-Bindungsregion (CnB-BR), einer Calmodulin (CaM)-Bindungsregion (CaM-BR) sowie einem autoinhibitorischen Peptid (AID) aufgebaut (Abb. 1.5). CnB-Bindungsregion, CaM-Bindungsregion und das autoinhibitorische Peptid werden auch als regulatorische Region von CnA bezeichnet¹¹¹. CnA ist strukturell charakterisiert durch die typische β -Sandwich Faltung mit zwei β -Strängen im Zentrum, umgeben von einem Mix aus α -Helices und β -Strängen^{24,112}. Im inaktiven Zustand wird das katalytische $[\text{Fe}^{3+}\text{-Zn}^{2+}]$ -Zentrum von PP2B durch ein Pseudosubstrat, das autoinhibitorische Peptid (Abb. 1.6), blockiert¹¹²⁻¹¹⁴. PP2B ist ein obligates Heterodimer, dessen Funktionalität durch zwei Calcium-Regulatorproteine, CnB und CaM, gesteuert wird^{111,115-117}.

Für CnB existieren zwei Isoformen, CnB1 (PP2BB1) und CnB2 (PP2BB2)¹¹⁸ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5534> bzw. 5535; Abb. 1.4). CnB weist 4 EF-Hand-Motive auf, die durch ihre charakteristische hantelförmige Struktur (Helix-Loop-Helix) eine Bindung von insgesamt 4 Ca^{2+} -Ionen ermöglichen (Abb. 1.5). Das myristoylierte N-terminale Glycin der regulatorischen Untereinheit von PP2B, CnB, ist von Hefe bis Mensch hochkonserviert¹¹⁹. Die Myristoylierung dient als stabilisierendes Strukturelement. Eine Assoziation von CnB an Membranen über das myristoylierte Glycin konnte bisher nicht gezeigt werden.¹²⁰

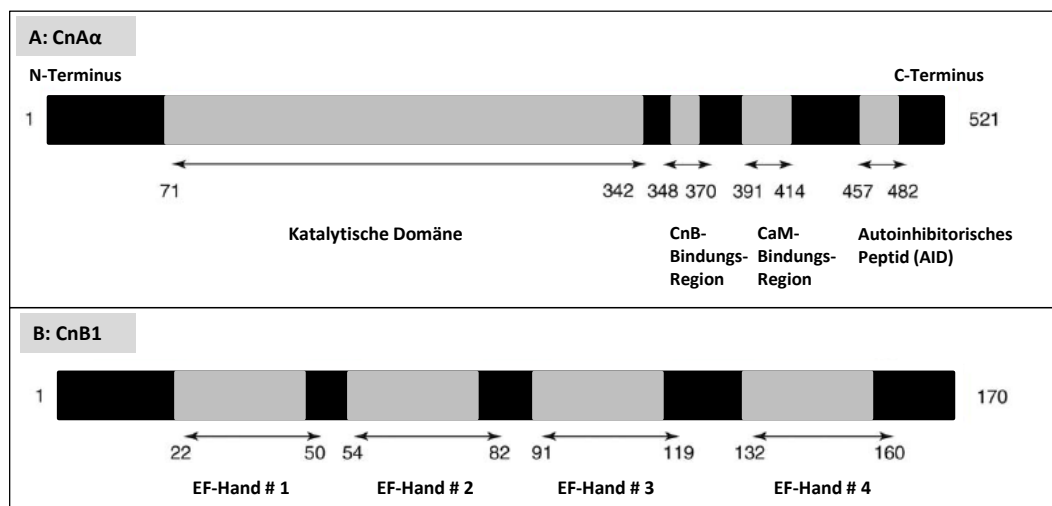


Abb. 1.5: Schematische Darstellung der Calcineurin-Proteindomänen

A: Katalytische CnA α -Untereinheit. **B:** Regulatorische CnB1-Untereinheit¹¹¹.

1.3.3 Mechanismus der Calcineurin-Aktivierung

Eine Aufklärung der Domänenorganisation und ein möglicher Mechanismus der Aktivierung von PP2B durch CaM konnte mit Hilfe der Identifizierung von Protease-sensitiven Regionen in der PP2B-Struktur aufgeklärt werden^{121–124}. Durch limitierte Proteolyse konnte gezeigt werden, dass die CnB-Bindungsregion mit der CaM-Bindungsregion interagiert, da in Abwesenheit von Ca^{2+} die CaM-Bindungsregion komplett vor Proteolyse geschützt ist. Diese Interaktion wird in Anwesenheit von Calcium nicht beobachtet¹²³.

Die Funktionalität von PP2B wird Ca^{2+} -abhängig durch CnB und CaM reguliert^{111,117,125}. CnB bindet 4 Ca^{2+} -Ionen durch 4 EF-Hand-Motive (Abb. 1.5). Im N-Terminus befinden sich zwei Calcium-Bindestellen (EF-Hand #1 und EF-Hand # 2, Abb. 1.5), die jeweils ein Ca^{2+} -Ion mit geringer Affinität im μM Konzentrationsbereich binden. Im C-terminalen Bereich des Proteins binden jeweils zwei Calcium-Bindestellen ein Ca^{2+} -Ion mit hoher Affinität (EF-Hand #3 und EF-Hand #4, Abb. 1.5) im nM Konzentrationsbereich^{126 127}. Die Aktivierung von Calcineurin durch Calcium ist hoch kooperativ¹¹⁷. In Abwesenheit von Ca^{2+} ist PP2B inaktiv, da das aktive Zentrum durch das autoinhibitorische Peptid (AID) blockiert wird¹¹³ (Abb.1.6). Eine Besetzung der niederaffinen Ca^{2+} -Bindestellen von CnB verursacht eine Konformationsänderung, wodurch eine Dissoziation der CaM-Bindungsregion von der CnB-Bindungsregion erfolgt. Weitere Ca^{2+} -Ionen besetzen die höheraffinen Ca^{2+} -Bindungsstellen in CnB und eine Bindung von durch Ca^{2+} aktiviertem CaM an die CaM-Bindungsregion von PP2B wird möglich und verursacht eine weitere Konformationsänderung, die eine Verschiebung des autoinhibitorischen Peptides aus dem aktiven Zentrum bewirkt und dessen intrasterische Inhibierung aufhebt¹¹³ (Abb. 1.6). Die hochaffine Ca^{2+} -Bindung stabilisiert die heterotrimere Struktur des PP2B (CnA-CnB-CaM), während die niederaffine Ca^{2+} -Bindung, als Calcium-Sensor, eine regulatorische Rolle einnimmt.

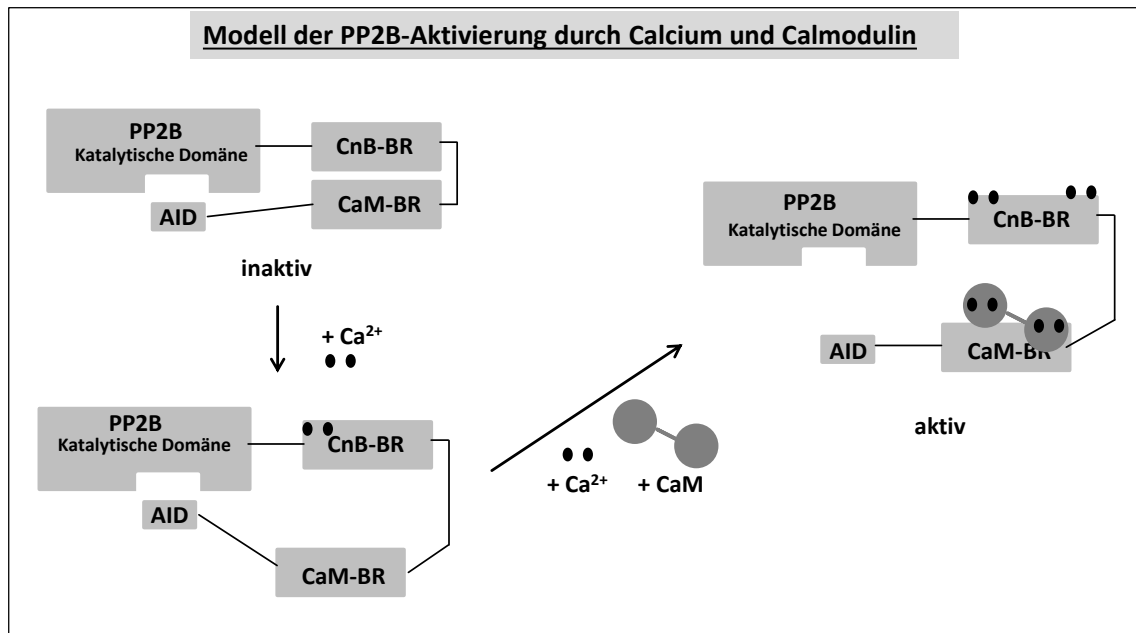


Abb. 1.6: Mechanismus der Calcineurin-Aktivierung durch Ca^{2+} /CaM

PP2B ist in Abwesenheit von Calcium inaktiv, da das aktive Zentrum durch das AID blockiert wird. CnB-BR interagiert mit CaM-BR. Ein Anstieg der Calcium-Konzentration führt zur Calcium-Bindung an niederaffine Calcium-Bindestellen der CnB-BR, wodurch eine Konformationsänderung stattfindet (Dissoziation der CaM-Bindungsregion von der CnB-Bindungsregion). Die Bindung von Ca^{2+} -Ionen an den höheraffinen Bindestellen der CnB-BR führt zur Stabilisierung der heterotrimeren Struktur (CnA-CnB-CaM). Außerdem wird CaM durch Calcium aktiviert und bindet an die CaM-BR, wodurch eine Verschiebung des AID aus dem aktiven Zentrum der katalytischen Domäne von PP2B erfolgt und PP2B vollständig aktiviert wird. PP2B: Calcineurin, AID: autoinhibitorisches Peptid; CnB-BR: CnB-Binderegion; CaM-BR: CaM-Binderegion, CaM: Calmodulin.

1.3.4 Physiologische Calcineurin-Wirkungen

PP2B ist an der Regulation einer Vielzahl physiologischer Prozesse beteiligt (siehe 1.5.1). Dabei spielen häufig die Aktivierung oder Inhibierung von Transkriptionsfaktoren wie CREB, NFAT und MEF2 eine wichtige Rolle⁷⁶⁻⁷⁸.

1.3.4.1 Calcineurin und CREB

PP2B dephosphoryliert CREB, wodurch eine Aktivierung der cAMP/CREB-Signalkaskade und somit die Expression von cAMP-abhängigen Genen inhibiert wird^{73,128}.

1.3.4.2 Calcineurin und NFAT

Die bedeutende Rolle von Calcineurin bei der Regulation der Gentranskription konnte durch die Verwendung von pharmakologischen Inhibitoren (Immunsuppressiva) wie Takrolimus (FKBP12-FK506) und Cyclosporin A (CyP-CsA), die in der

Transplantationsmedizin Anwendung finden, aufgeklärt werden. In T-Lymphozyten wurde durch Verwendung dieser Inhibitoren eine supprimierte Immunantwort detektiert¹²⁹.

Calcineurin beeinflusst die Aktivität von Transkriptionsfaktoren der NFATc-Familie (NFATc1-NFATc4), die eine hochkonservierte Rel-Homologie Domäne aufweisen¹³⁰. Diese Transkriptionsfaktoren besitzen Ca^{2+} /PP2B-abhängige Translokationsdomänen mit den Calcineurin-Bindungsmotiven, PxIxIxT (N-Terminus) oder LxVP (C-Terminus)¹¹¹. Eine direkte Interaktion von PP2B mit diesen Motiven ermöglicht eine Dephosphorylierung von Phosphoserin-Resten der Serin-reichen Regionen (SR-Repeats) von NFAT, wodurch die konservierten Kernlokalisierungssignale (NLS) demaskiert werden und der Kernimport von NFAT stimuliert wird¹³¹. Über die Rel-Homologie Domäne tritt NFAT mit anderen Transkriptionsfaktoren (AP-1) und der DNA in Wechselwirkung und aktiviert die Expression von NFAT-abhängigen Genen der Immunantwort^{93,132,133}. Der Export von NFAT aus dem Zellkern wird durch p38, MAPK, Glykogen-Synthase Kinase 3 β (GSK-3 β), c-jun N-terminale Kinase (JNK), Casein Kinase I (CK1), PKA⁷⁷ oder durch das Kernexportsignal (NES), lokalisiert im C-Terminus von NFAT, gesteuert¹³⁴.

NFAT wird in der Zelle auf verschiedene Weise aktiviert. Eine Stimulation von Signalwegen über Zelloberflächenrezeptoren wie Immunrezeptoren, Rezeptor-Tyrosinkinasen oder G-Protein gekoppelte Rezeptoren führt zu einer Ca^{2+} -Freisetzung aus dem endoplasmatischen Retikulum durch Aktivierung von Proteinlipasen (PLC β /PLC γ), wodurch CaM-abhängige Enzyme wie PP2B, die wiederum NFAT aktivieren, stimuliert werden. Zum anderen werden über Diacylglycerin (DAG) andere Signalmoleküle wie GTPasen Ras und Rac, die Proteinkinase C (PKC) oder MAPK stimuliert, wodurch wiederum andere Transkriptionsfaktoren wie AP1, MEF2 oder GATA4 rekrutiert werden und mit NFAT an der DNA wechselwirken^{135,136}.

PP2B/NFAT spielen eine zentrale Rolle in der Funktionalität verschiedener Immunzellen, wie z. B. in B-Zellen, T-Zellen und Mastzellen¹³³ und sind in anderen Zelltypen für Differenzierungsprozesse wie z. B. der Fiber-Typ Ausprägung im differenzierten Skelettmuskel und Herzklappenentwicklung verantwortlich¹³⁶ sowie an der Ausbildung von kardiovaskulären Schäden beteiligt (siehe 1.5.3)^{77,86,106,137}.

1.3.4.3 Calcineurin und MEF2

Im Rahmen der Zelldifferenzierung und Organogenese regulieren MEF2 Transkriptionsfaktoren die Genexpression in verschiedenen Zelltypen, in Abhängigkeit des extrazellulären Signals und verschiedener Kofaktoren⁹⁴. MEF2-Proteine, evolutionär von Hefe bis Mensch stark konserviert, gehören zur MADS-Familie von Transkriptionsfaktoren¹³⁸. In Vertebraten werden 4 MEF2 Gene, MEF2A-D, exprimiert. MEF2 Proteine besitzen N-Terminal das hochkonservierte MADS-Aminosäuresequenzmotiv (MADS-Box) sowie das MEF2-Motiv. Diese Domänen vermitteln die DNA-Bindung, Dimerisierung und Kofaktor-Rekrutierung^{139,140}. Die C-terminale Transaktivierungsdomäne (TAD) unterscheidet sich aufgrund von unterschiedlichen Spleißvarianten stark innerhalb verschiedener Organismen¹⁴¹. MEF2-Transkriptionsfaktoren liegen als Homo- oder Heterodimer gebunden an AT-reiche DNA-Regionen im Zellkern vor. Die Funktion von MEF2 als transkriptioneller Aktivator verschiedener Gene wird entscheidend durch die Rekrutierung von und Kooperation mit anderen Transkriptionsfaktoren bestimmt. Eine entscheidende Rolle spielen zusätzlich aber auch posttranslationale Modifikationen von MEF2, wie Phosphorylierungen oder SUMOylierungen^{94,142}.

In der Literatur sind bisher drei PP2B-abhängige Mechanismen für die Regulation der MEF2-Aktivität beschrieben¹⁴⁰. 1. In T-Lymphozyten führt eine PP2B-Stimulation durch Calcium und darauffolgende NFAT Aktivierung, zur Rekrutierung eines NFAT/p300/MEF2-Komplexes, der direkt an die DNA gebunden ist. Eine anschließende Chromatinauflockerung durch Deacetylierung der Histone durch p300 aktiviert die Nur77-Genexpression^{143 144}. Die NFAT-MEF2-Interaktion scheint eine wichtige Rolle bei der T-Zell-Apoptose¹⁴⁵ und bei der Kontrolle der Fasergene im Skelettmuskel zu spielen¹⁴⁶. 2. In Neuronen spielt MEF2 eine Schlüsselrolle beim Schutz vor Calcium-induzierter Apoptose. Eine Depolarisation und hohe Calcium-Konzentration führt zur MEF2-Dephosphorylierung durch PP2B, wodurch MEF2 vor Caspase-vermittelter Spaltung geschützt ist und somit die Aktivierung von anti-apoptotischen Zielgenen stimuliert. 3. In T-Lymphozyten reprimiert ein MEF2-CABIN1-Komplex, die Expression von MEF2-abhängigen Genen. CABIN1 rekrutiert HDACs, hemmt PP2B und blockiert die Bindung von ERK5 an MEF2. Calcium aktiviert CaM-abhängige Kinasen (CaMKIV), welche den CABIN1/HDAC-Komplex zerstört¹⁴⁷. CABIN1 wird im Zusammenspiel mit CaM durch den Chaperone 14-3-3 aus dem Zellkern in das Zytosol exportiert¹⁴⁴. Durch

Calcium aktiviertes PP2B stimuliert die Ausbildung eines NFAT/p300-Komplexes, der letztendlich die MEF2-Genexpression stimuliert.

MEF2A, MEF2B, MEF2C und MEF2D treten zeitlich und räumlich im embryonalen oder adultem Gewebe in verschiedenen Expressionsmustern auf. Eine hohe Expression von MEF2 ist in der gestreiften Muskulatur und Hirn zu detektieren¹⁴⁸, aber auch in geringer Expression in Lymphozyten, der Neuralleiste, Muskelfasern, Endothel und Knochen^{148,149}. Neben der Regulation von Zellüberleben, Apoptose und Proliferation, spielen MEF2 Transkriptionsfaktoren eine entscheidende Rolle bei Stressantworten sowie Remodeling-Programmen, z. B. beim Ausbilden der kardialen Hypertrophie oder bei der Fiber-Typ Ausprägung im Herz- und Skelettmuskel^{150,151}.

1.3.4.4 Regulation der Calcineurin-Aktivität durch interagierende Proteine

Die PP2B Phosphatase-Aktivität wird *in vivo* durch verschiedene PP2B-Bindungsproteine gesteuert^{105,111,152}. Es werden 3 Hauptgruppen von PP2B-interagierenden Proteinen unterschieden: 1. multifunktionale Calcineurin-Inhibitoren wie CAIN (*calcineurin inhibitor*; CABIN1), oder CHP (*calcineurin homologous protein*). 2. Duale Regulatoren zeigen inhibierende oder stimulierende Effekte auf PP2B wie RCAN1 (*regulator of calcineurin*), auch bekannt unter den Namen MCIP1 oder Calcipressin1.

3. Proteinkinase A-Ankerprotein (*A kinase anchoring proteins, AKAP*) wie AKAP79 oder FKBP12 verbinden PP2B mit anderen Signalproteinen oder subzellulären Strukturen.

1. Calcineurin-Inhibitor CAIN

Das in höheren Eukaryoten ubiquitär exprimierte 240 kDa Phosphoprotein CAIN wurde durch Hefe-Dihybrid-Sichtung einer Maus-T-Zell-cDNA-Bibliothek identifiziert^{144,153}. Lai et al. zeigten eine direkte Interaktion von CAIN mit PP2B *in vitro* und *in vivo*¹⁵³. Durch CAIN-Mutationsanalysen konnte eine hoch basische aus 38 Aminosäuren bestehende PP2B-Bindungsregion von CAIN identifiziert werden. CAIN interagiert direkt, als nicht-kompetitiver Inhibitor, mit dem C-Terminus von PP2B^{105,152}. Eine Interaktion von PP2B/CAIN verhindert z. B. die IL-2-Expression sowie die NFAT-Dephosphorylierung¹⁵⁴. Eine Regulation des PP2B-abhängigen MEF2-Signalweges wird durch CAIN reguliert^{140,144,155}. Des Weiteren wurde eine Kollokalisierung von PP2B und CAIN im Hirn und Lebergewebe nachgewiesen¹⁵³.

2. Dualer Calcineurin-Regulator RCAN1

Der, von Hefe bis Mensch hochkonservierte PP2B Regulator RCAN1, spielt eine essentielle Rolle bei der PP2B-Signalgebung in der Zelle¹¹¹. RCAN1 wird im Herzen, Muskel und Hirn exprimiert. Eine Überexpression von RCAN1 konnte bei Alzheimerkranken oder Patienten mit Down-Syndrom beobachtet werden^{156,157}. RCAN1, ein negativer PP2B-Feedback-Regulator, wirkt auf PP2B bei niedrigen Konzentrationen stimulierend und bei hohen Konzentrationen inhibierend^{152,158}. Die Expression von RCAN1 wird durch PP2B reguliert, da RCAN1 einen alternativen Promotor, mit einem Cluster aus 15 NFAT-Konsensussequenzen für die Bindung des durch PP2B aktivierten Transkriptionsfaktors NFAT, besitzt. Die Bindung von RCAN1 an PP2B wird außerdem durch verschiedene Phosphorylierungsstadien von RCAN1 gesteuert und weist auf ein Zusammenspiel von PP2B mit verschiedenen Signalwegen (MAPK) vermittelt durch RCAN1 hin^{159,160}.

1.3.5 Pathophysiologische Calcineurin Wirkungen

In den letzten Jahren wurde eine Vielzahl von *in vitro* und *in vivo* Studien durchgeführt, in denen ein Zusammenhang der Aktivierung des PP2B/NFAT-Signalweges und Herzhypertrophie untersucht wurden⁷⁷. In der Mehrzahl dieser Studien konnte das Ausbilden der kardialen Hypertrophie durch pharmakologische Inhibitoren, Cyclosporin A (CyP-CsA) und Takrolimus (FKBP12-FK506), reduziert oder verhindert werden^{77,86,106,137}.

Molkentin et al. verifizierten 1998 einen direkten Zusammenhang zwischen der Aktivierung von PP2B/NFAT und der Entstehung von kardialer Hypertrophie, hervorgerufen durch hypertrophe Stimuli wie AngII und Phenylephrin. Über eine Aktivierung des PP2B/NFAT-Signalweges wurde die Hypertrophie-Antwort stimuliert. *In vivo* führte eine konstitutive Expression von Calcineurin und NFAT im Mäuseherzen zu einer massiven Herzhypertrophie, die durch Blockade von PP2B mittels Cyclosporin A (CyP-CsA) und Takrolimus (FKBP12-FK506) inhibiert werden konnte⁸⁶.

Eine signifikant verminderte kardiale Hypertrophie konnte durch Überexpression von PP2B-interagierenden Proteinen wie CAIN, AKAP79, RCAN1 (MCIP1) sowie bei adenoviraler rekombinanter Expression dieser Konstrukte verifiziert werden⁷⁷. Eine adenovirale Expression von CAIN in neonatalen Kardiomyocyten sowie CAIN Überexpression in transgenen Mäusen verminderte die PP2B-Aktivität^{137,161}, wodurch

die IL-2 Expression sowie die NFAT-Dephosphorylierung verringert wurden ¹⁵⁴. Eine Vielzahl von Funktionsverlust-Studien (*loss-of-function*) bestätigte eine PP2B-Aktivierung bei der Ausbildung von Herzhypertrophie ⁷⁷.

CnA- β -/- Nullmäuse wiesen eine um 12% verringerte Herzgröße sowie eine verminderte Hypertrophie-Antwort nach hypertrophem Stimulus, z. B. durch Ang II oder Isoprenalin, auf ¹⁶². Lim et al. zeigten, dass Sparque-Dawley Ratten bei Überdruckbelastung eine Hypertrophie entwickeln, die mit einer erhöhten PP2B-Aktivität und einem erhöhten CnA-Proteingehalt einhergeht. Durch Gabe von Cyclosporin A (CyP-CsA) konnte die Entstehung der Hypertrophie verhindert werden ¹⁶³. Ritter et al. detektieren eine erhöhte PP2B/NFAT-Aktivität bei Kardiomyopathie und Aorteninsuffizienz ¹⁶⁴. Wilkins et al. verifizierten 2003 einen PP2B-vermittelten Effekt über den Transkriptionsfaktor NFATc3 auf die kardiale Hypertrophie, der in NFATc3-/- Nullmäusen nicht beobachtet werden konnte ¹⁶⁵. Der PP2BA- β Promotor von Mäusen, besitzt putative NFAT- sowie GATA4-Bindestellen und konnte in kultivierten Herzmyocyten (*in vitro*) nach hypertrophen Stimuli sowie durch konstitutive Expression von CnA, NFAT oder GATA4 in transgenen Mäusen (*in vivo*) stark aktiviert werden ¹⁶⁶.

Die zunehmend bedeutende Rolle des PP2B/NFAT-Signalweges im Rahmen der kardiovaskulären Pathophysiologie wurde in den letzten Jahren erkannt ^{77,79,80}. PP2B/NFAT sind beteiligt an Gefäß-Remodeling, Gefäß-Proliferation und Gefäß-Alterung sowie Hochregulation von inflammatorischen Regulatoren wie RANTES oder Osteopontin ⁸¹⁻⁸⁵. Diese charakteristischen Merkmale werden auch bei der MR-induzierten Vaskulopathie, charakterisiert durch parainflammatorische Veränderungen z. B. bei gestörter ROS-Homöostase, beobachtet ⁷³. Aus diesem Grund ist ein Zusammenspiel von MR und PP2B bei der Ausbildung von kardiovaskulären Erkrankungen vorstellbar. Der molekulare Mechanismus, welcher der Wechselwirkung von MR und PP2B bei der Entstehung von pathophysiologischen Effekten zu Grunde liegt, ist nur gering verstanden und Gegenstand gegenwärtiger Untersuchungen ⁷³.

1.4 Zielstellung der Arbeit

Analyse des Mineralokortikoid-Rezeptor-Calcineurin-Signalnetzwerkes

Neben seiner klassischen Wirkung in epithelialen Geweben, vermittelt der MR zusätzlich seine transkriptionelle Aktivität über die Phosphatase PP2B, in dem er nicht-genotrop wirkt und mit zytosolischen Signalkaskaden wie der cAMP/CREB-Signalkaskade in Wechselwirkung tritt⁷³. Auf die basale CRE-Transkriptionsaktivität hat der MR keinen Einfluss. Eine Stimulation der cAMP/CREB-Signalkaskade mit Forskolin und gleichzeitige MR-Aktivierung mit Aldosteron führt zu einer Inhibierung der CRE-SEAP-Transkriptionsaktivität bei gleichzeitiger Abnahme der CREB-Phosphorylierung. Die Inhibierung der cAMP/CREB-Signalkaskade durch den aktivierten MR ist HSP90- und PP2B-abhängig und geht mit einer Erhöhung der PP2B-Aktivität einher. Eine veränderte CRE-Transkriptionsaktivität wird, weder durch eine veränderte cAMP-Konzentration, noch durch eine Veränderung der Calcium-Konzentration, hervorgerufen⁷³. Der GR zeigt, im Vergleich zum MR, keinen Einfluss auf die Forskolin-stimulierte CRE-SEAP-Transkriptionsaktivität. Aus diesem Grund wurde das MR/PP2B-Signalnetzwerk im heterologen Expressionssystem, unter Verwendung der HEK293-Zellen, untersucht. HEK293-Zellen exprimieren keinen MR und bieten die Möglichkeit zwischen MR- und GR-induzierten Effekten zu unterscheiden. Außerdem besitzen HEK293-Zellen keinen β -Adrenorezeptor, exprimieren aber die *downstream*-Komponenten des cAMP/CREB-Signalweges¹⁶⁷ (Abb. 1.7). Der inhibierende Effekt von Aldosteron/MR auf die CRE-Transkriptionsaktivität wurde auch in OK- und VSMC-Zellen gefunden⁷³.

Weitestgehend sollte im Rahmen dieser Arbeit eine Analyse des molekularen Mechanismus der pathophysiologischen Aldosteron/MR-Wirkung unter möglicher Beteiligung von PP2B an der MR-induzierten Regulation der Transkription über verschiedene Signalwege wie cAMP/CREB- sowie NFAT - und MEF2-Signalweg untersucht werden (Abb. 1.7). Anhand von siRNA-Experimenten sollte aufgeklärt werden, welche der beiden katalytischen Calcineurin-Isoformen, PP2BA- α - und/oder PP2BA- β , die spezifischen MR-Effekte vermittelt.

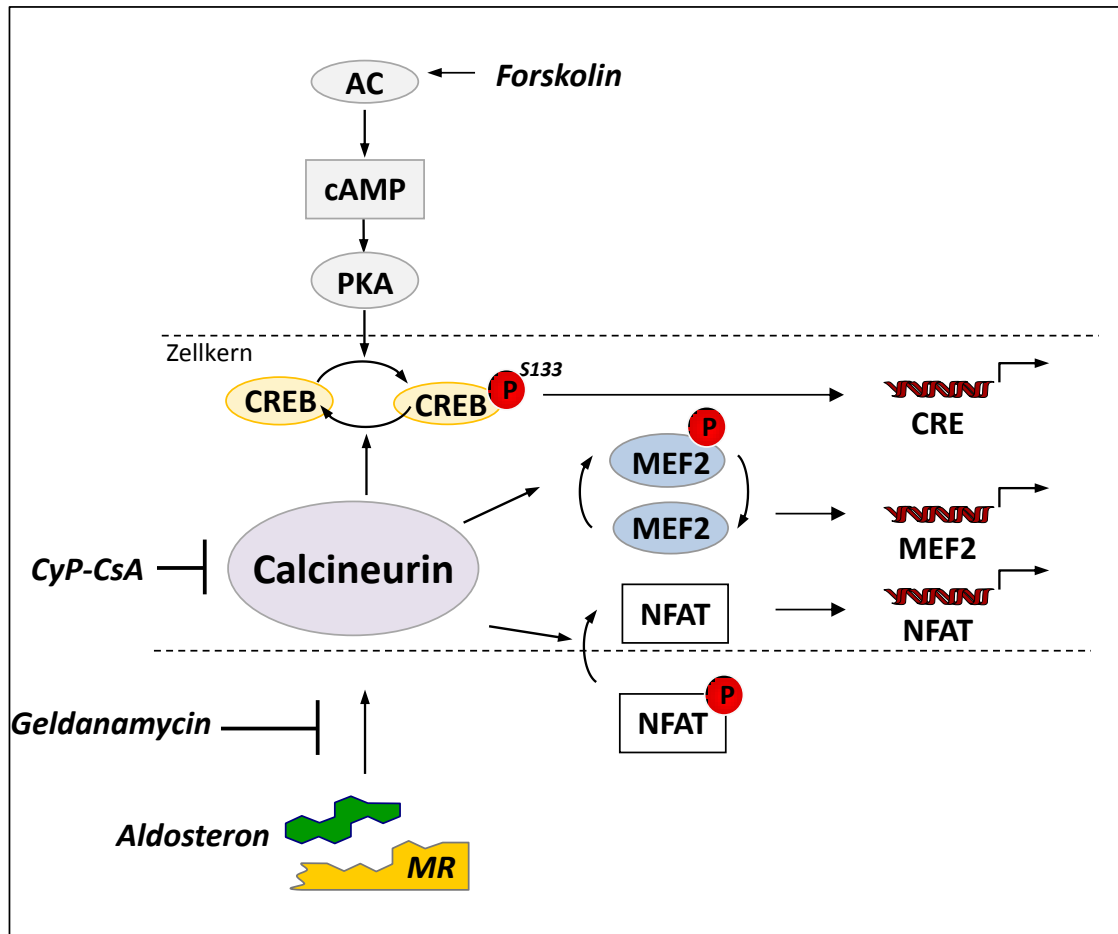


Abb. 1.7: Modell einer möglichen Wechselwirkung von MR und PP2B mit zytosolischen Signalkaskaden (CREB/MEF2/NFAT) in HEK293-Zellen im Rahmen der pathophysiologischen Aldosteron-Wirkung

HEK293-Zellen exprimieren die *downstream*-Komponenten des cAMP/CREB-Signalweges¹⁶⁷, der durch Forskolin stimuliert werden kann und die Expression von CRE-abhängigen Genen aktiviert. PP2B dephosphoryliert die Transkriptionsfaktoren CREB, NFAT und MEF2 und steuert somit die Expression von Genen^{73,93,140}. Für die Analyse des cAMP/CREB-Signalweges in HEK293-Zellen müssen diese mit humanem MR transfiziert werden, da HEK293-Zellen keinen MR exprimieren. AC: Adenylat-Zyklase; CREB: *cAMP response element binding protein*; PKA: Proteinkinase A; MEF2: *myocyte enhancer factor 2*; NFAT: *nuclear factor of activated T cells*; P: Phosphat-Rest; CRE: *cAMP-response element*; Cyclosporin A bildet mit Immunophilin CyP und Calcineurin (PP2B) einen ternären Komplex aus; MR: Mineralokortikoid-Rezeptor.

2. Material & Methoden

2.1. Chemikalien

Verwendete Chemikalien wurden von der Firma Sigma Aldrich bezogen, mit Ausnahme der verwendeten siRNA und des Transfektionsreagenz DharmaFECT 1 (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA).

2.1.1 Lösungen und Puffer

Tab. 2.1: Häufig verwendete Lösungen und Puffer

Lösung	Zusammensetzung
PBS	13,7 mM NaCl; 0,27 mM KCl; 0,81 mM Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O; 0,15 mM KH ₂ PO ₄
10 x TBS	170 mM Tris-HCl; 30 mM Trizma Base; 1,4 M NaCl; pH 7,6
TBS/Tween 20	20 mM Tris; 140 mM NaCl; 0,05% Tween 20
Laufpuffer	25 mM Trizma Base; 3,5 mM SDS, 22,7 mM Glycin
Transferpuffer	25 mM Trizma Base; 192 mM Glycin; 20% Methanol; H ₂ O
Ponceau-S-Lösung	30% Ponceau-S-Farbstoff; 30% TCA; 30% Sulfosalicylsäure
CST-Lysispuffer	20 mM Tris-Base, pH 7,5; 150 mM NaCl, 1% Triton X-100; Protease-Inhibitor-Cocktail; 1 mM EDTA; 1 mM EGTA; 1mM Natrium-Orthovanadat; 0,7 mM Natrium-Pyrophosphat, 1 mM β-Glycerolphosphat
Laemmli-Puffer	0,5 mM Tris-HCl, pH 6; 4% SDS; 10% 2-Mercaptoethanol; 20% Glycerol; 0,01% Bromphenolblau
10 x TAE	0,4 M Tris; 0,5 M EDTA, pH 8,0; 11,5 mM Eisessig-Essigsäure
10 x TBE	0,9 M Trizma Base; 0,9 M Borsäure; 20 mM EDTA
Elutionspuffer	10 mM Tris pH 7,5; 1 mM EDTA pH 8; 50 mM NaCl
Ladepuffer	20% Ficoll 400; 0,1 M EDTA pH 8,0; 1% SDS; 0,25% (w/v) Bromphenolblau
SEAP-Puffer	60 mM L-Homoarginin; 3 mM MgCl ₂ ; 0,2 mM ZnCl ₂ ; 100 mM Tris-HCl (pH 9.3)
MOPS-Puffer	20 mM MOPS + 0.1% Triton-X-100; pH 7.4
Cleavage Puffer	NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O (55,2 g/l); Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O (106,8 g/l); KCL (7,4 g/l); MgSO ₄ x 7 H ₂ O (2,4 g/l)
Paraformaldehyd 4%	1,33 M Paraformaldehyd in PBS; pH 7,4 auf 65 °C erhitzen, mit NaOH versetzen bis klare Lösung entsteht
Stop-Puffer	1 M Na ₂ CO ₃

2.2. Bakterienkultivierung

2.2.1. *Escherichia coli*

Für Plasmid-Amplifizierungen und -Präparationen wurde der E. coli-Stamm TOP10 der Firma Invitrogen verwendet. Die Anzucht erfolgte über Nacht bei 37 °C in Lauria Bertani (LB)-Medium (Tab. 2.2). Die Nährplatten wurden mit 1,5% (w/v) Bacto-Agar hergestellt. Eine Selektion für ein bestimmtes Plasmid erfolgte durch Verwendung eines Antibiotikums, das dem LB-Medium beigelegt wurde (Tab. 2.3).

Tab. 2.2: Nährmedien für E. coli

Nährmedium	
Luria Bertani (LB)-Medium	1% (w/v) Bacto-Trypton, 0,5% (w/v) Bacto-Hefe-Extrakt, 1% (w/v) NaCl; pH 7,5
S.O.C. (<i>Super optional computing Broth</i>)-Medium	2% (w/v) Bacto-Trypton; 0,5% (w/v) Bacto-Hefe-Extrakt; 0,05% (w/v) NaCl; 20 mM Glucose

Tab. 2.3: Verwendete Antibiotika

Antibiotikum	Konzentration
Ampicilin	60 mg/l
Kanamycin	5 mg/l

2.2.2 Dauerhafte Lagerung von Bakterien

Nach der Anzucht des *E. coli*-Stammes in Flüssigkultur wurden 850 µl Kultur und 150 µl Glycerin (99%) gemischt und bei - 80 °C gelagert.

2.3 Zellkultur

2.3.1 Humane embryonale Nierenzellen - HEK293-Zellen

HEK293-Zellen (American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA) wurden in serumhaltigem DMEM/HamF12-Medium mit stabilem Gluthamin und 10% FCS (PAA Laboratories) in 60 cm²-Schalen bei 37 °C und 5% CO₂ in feuchter Atmosphäre im Brutschrank (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) kultiviert. HEK293-Zellen wachsen adhärent, lassen sich gut transfizieren und besitzen morphologisch Fibroblasten-ähnliche Eigenschaften¹⁶⁸. Eine Subkultivierung der HEK293-Zellen erfolgte je nach Wachstumsgeschwindigkeit 1-2x wöchentlich. Die Zellen wurden mit EDTA-Lösung (0,7 mM) für ca. 5 min und anschließend mit Trypsin-Lösung (0,1%) pro 60 cm²-Schale inkubiert bis die Zellen sich leicht vom Boden der Schale ablösten. Die Zellen wurden in 10 ml serumhaltigem DMEM/HamF12-Medium aufgenommen und die Zellzahl mittels eines Zellmessgerätes (CASY-Zellzähler, Innovatis AG, Reutlingen) bestimmt. Die Aussaat der Zellen erfolgte mit einer Dichte von 3-5*10⁶ Zellen/cm² (reine Kultivierung), 1,5-2,5*10⁶ Zellen/cm² (6 well Platten), 1,5*10⁵ Zellen/cm² (24 well Platten).

24 h vor Beginn der Experimente wurden die Zellen mit serumfreien Medium ruhig gestellt, um das Wachstum der Zellen zu synchronisieren und Einflüsse, die den Grundstoffwechsel der Zellen, z. B. durch Hormone beeinflussen könnten, zu vermeiden.

2.3.2 Einfrieren und Auftauen von HEK293-Zellen

Einfrieren: HEK293-Zellen wurden bei einer Konfluenz von 70 % eingefroren. Hierfür wurden die Zellen trypsinisiert (siehe 2.3.1) und bei 400 x g zentrifugiert (HERAEUS FRESCO 17, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Das Pellet wurde in serumhaltigem DMEM-HamF12. $1 \cdot 10^6$ Zellen wurden mit 500 μ l Einfriermedium (55% DMEM-HamF12, 30% DMSO, 15% FCS) versetzt, in Kryo-Röhrchen überführt und über Nacht in einer Kryo-Box auf -80 °C abgekühlt. Die Lagerung der Zellen erfolgte in einem flüssigen Stickstoff-Versorgungssystem (Thaylor-Wharton Germany).

Auftauen: Ein schnelles Auftauen der Zellen erfolgte bei 37 °C mit anschließender Aufnahme in 10 ml vorgewärmtes serumhaltiges DMEM/HamF12-Medium. Die Kultivierung von HEK293-Zellen erfolgte in 60 cm²-Schalen bei 37 °C und 5% CO₂.

2.4 Plasmide

Tab. 2.4: Häufig verwendete Plasmide

Plasmid	Protein	Resistenz	Referenz
pDsRed2-N1	RFP	Kan/Neo	BD Clontech
pMR-DsRed2-N1	MR-RFP	Kan/Neo	⁷³
pEGFP-C1	eGFP	Kan/Neo	BD Clontech
pEGFP-C1-hMR und trunkierteMR Varianten pEGFP-MR ^{CDEF} pEGFP-MR ^{DEF}	eGFP-MR	Kan/Neo	¹⁶⁹
pEGFP-C1-hGR	eGFP-GR	Kan/Neo	⁷³
pSEAP basic	SEAP	Amp	BD Clontech
pCRE-SEAP	SEAP	Amp	^{170,171}
pNFAT-SEAP	SEAP	Amp	^{170,171}
pMEF2-SEAP	SEAP	Amp	3.3.2.1
pcDNA3.1His-Lacz	β -Galactosidase	Amp	Invitrogen, Karlsruhe

Die Vektorkarten befinden sich im Anhang.

2.4.1 Transfektion von Plasmid-DNA in humane Zellen

Für eine Transfektion von HEK293-Zellen wurde das Transfektionsreagenz Polyfect der Firma Qiagen verwendet. Das verwendete Volumen an Polyfect war abhängig von der verwendeten Plasmidkonzentration. Es wurde ein Verhältnis von 1:10 Plasmid-DNA zu Polyfect in 100 µl serumfreien Medium eingesetzt. Das Gemisch wurde 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. HEK293-Zellen einer 10 cm²-Schale wurden mit 1 ml frischem serumfreiem Medium überschichtet. 600 µl serumfreies Medium wurde dem Transfektionsansatz zugegeben, gut gemischt und auf die Zellen gegeben. Anschließend erfolgt eine Inkubation der Zellen bei 37 °C und 5% CO₂. 24 h nach Transfektion wurde frisches serumfreies Medium auf die Zellen gegeben.

2.4.2 Transfektion von siRNA in humane Zellen

siRNAs sind kleine 19-21 Nukleotid lange doppelsträngige RNA-Moleküle mit einem 2 Nukleotid 3'-Überhang, die an sogenannte „seed“-Regionen im 3' UTR von mRNAs binden und somit eine sequenzspezifische Degradation der mRNA einleiten oder den *RNA-induced silencing complex* (RISC) aktivieren, wodurch eine Translation dieser markierten mRNA nicht mehr möglich ist¹⁷². Häufig treten „off-target“-Effekte auf, bei denen unbeabsichtigt und unvorhergesehen Transkripte herunterreguliert werden, die nur eine geringe Sequenzkompatibilität zur „seed“-Region der siRNA besitzen. Aufgrund von speziellen Modifikationsmustern an sense- und antisense-Strang der in dieser Arbeit verwendeten siRNAs der Firma Dharmacon wird ein solches unerwünschtes Herunterregulieren von Genen durch „off-target“-Effekte verhindert^{173,174}. Der verwendete Pool an siRNAs (Tab. 2.5) bindet spezifisch in der kodierenden Region der Ziel-mRNA. Für die Herunterregulation von PP2BA- α und PP2BA- β wurde ein ON-TARGETplus SMARTpool an siRNAs von Dharmacon (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) (Tab 2.5) verwendet.

Tab. 2.5: Sequenzen der verwendeten siRNAs

ON-TARGETplus SMARTpool siRNA	Zielsequenz
PP2BA-α	5'-GCAAAGCGCUACUGUUGAG-3' 5'-GGUGAAAGCUGUCCAUUU-3' 5'-CAACAAGGCUCUCACCUCA-3' 5'-GAACAAGAUCGAGCAAUA-3'
PP2BA-β	5'-GCGCUUAGAAUUAUCAAUG-3' 5'-UGACAUCCAUGGCCAAUUU-3' 5'-UAGUAUAGAGUGUGUCUUA-3' 5'-GCAGACACCUACUGAAUA-3'

Als Kontrolle wurden die Zellen mit „scrambled“-siRNA (ON-TARGETplus control-siRNA) transfiziert. Diese scrambled-siRNA besitzt keine Homologie zu einem bekannten humanen Gen und hat keinen Einfluss auf die humane Genexpression. Die Transfektion der Zellen erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die verwendete siRNA wurde in sterilem Wasser gelöst und für 30 min bei Raumtemperatur schüttelnd inkubiert.

Es wurden $1,5-2,5 \times 10^6$ Zellen/cm² in einer 6-Well Platte angesät und bei einer optimalen Konfluenz von 80-90% transfiziert. Für die Transfektion wurde die siRNA (Stammlösung 2 µM) in serumfreien Medium verdünnt sowie das Transfektionsreagenz DharmaFECT1 1:25 mit serumfreien Medium versetzt und für 5 min inkubiert. Anschließend wurden beide Ansätze (siRNA und Transfektionsreagenz) vereinigt und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Der Transfektionsansatz (100 nM siRNA-Endkonzentration) wurde mit serumhaltigen Medium (2 ml/Well) aufgefüllt und auf die Zellen gegeben. Danach erfolgte eine Inkubation der Zellen für 96 h (120 h, 144 h) bei 37 °C und 5% CO₂. Für die Titrationsreihe wurden die Zellen mit siRNA-Konzentrationen von 50 nM, 100 nM und 200 nM transfiziert.

Das siRNA-Transfektionsprotokoll wurde für die SEAP-Reportergen-Assays (siehe 2.9) entsprechend auf das 24-Well Platten (2 cm²/Well) angepasst.

2.5. Molekularbiologisches Arbeiten mit RNA

2.5.1 Isolieren von RNA

Die RNA-Isolation aus HEK293-Zellen wurde nach einem Waschschrift mit 1 x PBS unter Verwendung des InviTrap® Spin Tissue RNA Mini Kit (Invitex, Berlin) gemäß Herstellerangaben isoliert. Die RNA wurde in 30 µl sterilen Wassers eluiert und bei -80 °C gelagert.

2.5.2 Bestimmen von RNA- bzw. DNA-Konzentrationen

Eine Quantifizierung der RNA- und DNA-Proben erfolgte mittels NanoVue-Spektrometer (GE Healthcare, Buckinghamshire, Großbritannien) durch Absorptionsbestimmung bei einer UV-Absorption von 260 nm und 280 nm. Der Absorptionsquotient $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ lässt eine Aussage über die RNA-Qualität zu, wobei der optimale Quotient bei 2,0 liegt. Eine Absorption von 1 bei $A_{260\text{nm}}$ entspricht einer RNA-Konzentration von 40 µg/ml sowie einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml.

2.6 Molekularbiologisches Arbeiten mit DNA

2.6.1 Isolieren von Plasmid-DNA

Plasmid-DNA wurde aus einer *E. coli*-Flüssigkultur unter Verwendung des Miniprep Kit der Firma Qiagen über eine Silika-Matrix-Säule isoliert. Die Plasmid-Präparation erfolgte gemäß Herstellerangaben. Die Plasmid-DNA wurde mit 50 µl Wasser eluiert und die DNA-Konzentration bestimmt (siehe 2.5.2)

2.6.2 Sequenzierung

DNA-Sequenzierungen wurden kommerziell durch die Eurofin MWG Operon (Ebersberg, Deutschland) durchgeführt.

2.6.3 Primer-Design

Alle verwendeten Primer wurden von der Firma Eurofin MWG Operon (Ebersberg, Deutschland) bezogen und der vom *National Center for Biotechnology Information* (NCBI, www.ncbi.nlm.nih.gov/) stammenden Gensequenzen unter Verwendung des NCBI-Programmes Primer3 (Version 4.0) erzeugt. Alle Primerpaare wurden Intronspannend gewählt. Somit konnte bei der Primeretablierung mittels Gradienten-PCR (siehe 2.6.4), genomische Verunreinigungen der entstehenden PCR-Produkte, aufgrund von amplifizierten Introns, durch unterschiedliche Produktgrößen bei der Agarose-

Gelelektrophorese (siehe 2.6.5) unterschieden werden. Es wurden nur Primerpaare verwendet, denen eindeutig ein spezifisches Amplifizierungsprodukt bei entsprechender Anlagerungstemperatur (T_A) zugeordnet werden konnten (Tab 2.6).

Tab. 2.6: Verwendete Oligonukleotide in Real-Time PCR

Genname	Primersequenz	Reaktionsbedingungen	Genbank-Nummer
PP2BA-α	sense: 5'-CCGGCTTACAGCAAAAGAAG-3' antisense: 5'-CATGAATGTCCCCACAAACA-3'	T_A : 57 °C Elongationszeit: 30 sec Zyklen: 40 Produktgröße: 197 bp	5530
PP2BA-β	sense: 5'-CAACCATGAATGCAGACACC-3' antisense: 5'-TGGTGAAAGTCCACCATGAA-3'	T_A : 57 °C Elongationszeit: 30 sec Zyklen: 40 Produktgröße: 166 bp	5532
CAIN	sense: 5'-CAGACCAAAGTGGAAAGC-3' antisense: 5'-TTCAGGTAGCGCATCATCAG-3'	T_A : 57 °C Elongationszeit: 30 sec Zyklen: 40 Produktgröße: 157 bp	23523
RCAN1	sense: 5'-CCAGTGGGATGGAAACAAGT-3' antisense: 5'-GGCCTCCTGGTCTGGATAAT-3'	T_A : 57 °C Elongationszeit: 30 sec Zyklen: 40 Produktgröße: 285 bp	1827
18S	sense: 5'-CTCAACACGGGAAACCTCAC-3' antisense: 5'-CGGACATCTAAGGCATCAC-3'	T_A : 57 °C Elongationszeit: 30 sec Zyklen: 30 Produktgröße: 268 bp	10008588
eNOS	sense: 5'-TCTGCGGCGATGTCACTATGGC-3' antisense: 5'-TGCGTATGCGGCTTGTCACCTC-3'	T_A : 60 °C Elongationszeit: 20 sec Zyklen: 50 Produktgröße: 186 bp	4846

2.6.4 Reverse Transkriptionsreaktion

Die Reverse Transkription (RT) ist eine Methode, bei der RNA durch RNA-abhängige DNA-Polymerasen in cDNA umgeschrieben wird. Diese cDNA wird dann als Template für eine PCR eingesetzt.

Nach jeder RNA-Isolierung (siehe 2.5.1) wurde ein DNase-Verdau durchgeführt, um eventuelle genomische DNA-Verunreinigungen der Proben zu entfernen. Der DNase-Verdau wurde wie folgt durchgeführt:

DNase-Verdau Ansatz: (Firma MBI Fermentas, USA)

RNA	1 µg/µl
10 x DNase Puffer	1 µl
DNase	1 µl
<i>Aqua ad</i>	8 µl

Die Proben wurden im Thermocycler (Biometra, Göttingen) für 10 min bei 37 °C, 10 min bei 75 °C inkubiert und anschließend auf 4 °C heruntergekühlt. Zuletzt wurde jeder Probe 4 µl Wasser zugesetzt.

Die RT-Reaktion wurde mit dem SuperScript™ One-Step RT-PCR Kit (Invitrogen, Karlsruhe) nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Für die cDNA-Synthese wurden zwei Reaktionsansätze mit jeweils gleichen RNA-Konzentrationen (1 µg/µl) verwendet. Es wurde jedoch nur ein Ansatz mit Reverser Transkriptase (Positivkontrolle) versetzt. Der zweite Ansatz ohne Reverse Transkriptase (Negativkontrolle) wurde mitgeführt, um eventuelle unspezifische Genamplifikationen, aufgrund von DNA-Kontaminationen zu erkennen bzw. ausschließen zu können.

Folgender Standardansatz wurde für RT-Reaktionen verwendet:

Komponente	Stamm- Lösung	Menge	Endkonzentration
First Strand Puffer	5x	4 µl	1x
DTT	100 mM	0,25 µl	1 mM
dNTPs	10 mM	1 µl	0,4 mM
RnaseOut		0,5 µl	40 U/ml
Random Primer	0,3 M	0,67 µl	8 mM
Reverse Transkriptase		± 0,25 µl	±200 U/ml
<i>Aqua ad.</i>		18 µl	
Template	1 µg/µl	7 µl	80 ng
Gesamt		25 µl	

Die Reverse Transkription wurde standardmäßig nach folgendem Protokoll durchgeführt: 25 °C für 5 min, 42 °C für 30 min gefolgt von 95 °C für 5 min anschließend wurden die Proben auf 4 °C heruntergekühlt.

Nach der RT-Reaktion wurden die Ansätze 1:1 mit Wasser vermischt, bei -80 °C gelagert und die synthetisierte cDNA weiterführend für quantitative Real-time PCR (siehe 2.6.6) verwendet.

2.6.5 Polymerase-Ketten-Reaktion

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) ist eine Methode zur Amplifizierung von DNA-Fragmenten durch das Enzym Taq-Polymerase mittels spezifischer Oligonukleotide. Die PCR-Reaktionen wurden in einem Temperaturzyklus-Steuergerät (Biometra, Göttingen) mit beheizbarem Deckel durchgeführt. Für die Primer-Etablierung wurde eine Gradienten-PCR durchgeführt. Hierfür wurden parallel mehrere gleiche PCR-Ansätze unter Nutzung eines Temperaturgradienten (50-70 °C) analysiert. Nach anschließendem Auftrennen der PCR-Produkte mittels Agarose-Gelelektrophorese (siehe 2.6.5) konnte aus der Produktgröße, der sichtbaren Produktmenge und den entstandenen Nebenprodukten die optimale Anlagerungstemperatur (T_A) für das Oligonukleotidpaar ermittelt werden. Als Template wurde cDNA, die mittels Reverser Transkription (siehe 2.5.3) hergestellt wurde, verwendet.

Folgender Standardansatz wurde verwendet:

Komponenten	Stammlösung	Verwendete μ l	Endkonzentrationen
Template cDNA	1 μ g/ μ l	2	80 ng
PCR-Puffer	10x	2,5	1x
dNTPs	10 mM	0,6	240 μ M
Oligonukleotid A	10 μ M	1	0,4 μ M
Oligonukleotid B	10 μ M	1	0,4 μ M
Taq-Polymerase		0,25	1 U/ μ l
<i>Aqua ad.</i>		25	

Die PCR wurde standardmäßig nach folgendem Protokoll durchgeführt:

Denaturierung	95 °C	3 min	
Denaturierung	95 °C	30 s	} 40-50 Zyklen
Anlagerung	50-70 °C	30 s	
Elongation	72 °C	20-30 s	
Elongation	72 °C	5 min	
	4 °C	∞	

Die Anlagerungstemperatur (T_A), die Elongationszeit sowie die Zahl der Zyklen wurden an die verwendete Matrizen-DNA und die entsprechenden Oligonukleotidpaare (Tab. 2.6) angepasst.

2.6.6 Auftrennen von DNA-Fragmenten mittels Agarose-Gelelektrophorese

Eine Auftrennung von DNA-Fragmenten hinsichtlich ihrer Größe erfolgte über eine horizontale Gelelektrophorese unter Verwendung von 1-2%igen (w/v) Agarosegelen (PeqGold Universal-Agarose, Peqlab, Erlangen). Als Laufpuffer diente 0,5 x TAE-Puffer (Tab. 2.1). DNA-Proben wurden mit 6 x Ladepuffer (Tab. 2.1) vermischt. Als Längenstandard wurde ein 1 kb Längenstandard (1 kb-Leiter, PeqLab, Erlangen) verwendet. Für die Elektrophorese wurde eine Spannung von 10 V/cm Gel angelegt. Die Detektion erfolgte durch nachfolgende Inkubation mit einer Ethidiumbromid-Lösung (1000 x Ethidiumbromid-Stammlösung: 0,5 mg/ml) für 15 min, gefolgt von zwei Waschschritten mit destilliertem Wasser à 15 min. Die Banden wurden auf einem Transilluminator (Biometra, Göttingen) mit UV-Licht bei 355 nm sichtbar gemacht und mit einer Polaroidkamera oder mittels UV-Transilluminator Image System (Cambridge, UK) fotografiert.

2.6.7 Quantitative Real-time PCR

Die sogenannte Echtzeit-PCR ist eine Vervielfältigungsmethode von Nukleinsäuren die auf dem Prinzip der normalen PCR beruht, bei der zusätzlich eine Quantifizierung der gewonnenen DNA durch einen interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff (SYBR Green I) möglich wird. Die Fluoreszenz von SYBR Green I steigt bei Bindung an doppelsträngige DNA um das 1000fache an. Das Fluoreszenzsignal steigt proportional zur Produktmenge an (Intensität der Fluoreszenz \sim Amplifikationszyklus). Nach jedem Amplifikationsschritt wird eine Fluoreszenz-Messung durchgeführt. Als sogenannten Grenzwert C_t wird der Wert bezeichnet, bei dem erstmalig ein Fluoreszenzsignal durch Amplifizierung im Vergleich zum Hintergrundrauschen detektiert werden kann. Die Quantifizierung des Fluoreszenzsignals erfolgt in der exponentiellen Phase der PCR. Im Anschluss an die PCR-Reaktion wird eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Hierbei wird die DNA kontinuierlich aufgeschmolzen ($50^\circ\text{C} - 95^\circ\text{C}$). Jedes Fragment besitzt eine spezifische Schmelzkurve. Die Temperatur bei der DNA schmilzt, ist abhängig von der Länge des PCR-Produktes. Moleküle homogener Länge weisen einen einzigen Wärmeübergang auf und somit eine einzige Schmelzkurve. Dies zeigt eine spezifische Amplifikation eines einzigen PCR-Produktes an. Beim Übergang der doppelsträngigen DNA in einzelsträngige DNA wird der Fluoreszenzfarbstoff wieder freigesetzt und eine Fluoreszenzabnahme registriert. Sind mehrere PCR-Produkte amplifiziert worden, dann werden mehrere Wärmeübergänge/Schmelzkurven detektiert und eine Auswertung der Genexpression ist mit diesem Oligonukleotidpaar nicht möglich ¹⁷⁵.

Für die relative Quantifizierung wird die Expression eines Zielgens auf die Expression eines Referenzgenes (18S), das homogen und ubiquitär in der Zelle exprimiert wird, normalisiert ($\Delta\Delta\text{-}C_t$ -Methode). Damit werden Fehler innerhalb der Reversen Transkription, die Zielgen und Referenzgen innerhalb einer Probe betreffen, berücksichtigt ¹⁷⁶.

$$\Delta C_t = C_t (\text{Zielgen}) - C_t (\text{Referenzgen})$$

$$\Delta\Delta C_t = \Delta C_t (\text{Kontrolle}) - \Delta C_t (\text{Behandlung})$$

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

Jedes Primerpaar (Tab. 2.6) wurde vor Verwendung auf Spezifität mittels Gradienten-PCR (siehe 2.6.4) sowie Auftrennung im Agarosegel (siehe 2.6.5) und Bestimmung der Amplifizierungseffizienz überprüft. Für jede Probe wurde bei der qRT-PCR eine 3fach Bestimmung des Ansatzes mit Reverser Transkriptase (Positivkontrolle), eine Einfachbestimmung des Ansatzes ohne Reverse Transkriptase (Negativkontrolle,

Identifizierung von genomischer DNA) (siehe 2.5.3) und eine Wasserkontrolle (Überprüfung auf Primerdimere) durchgeführt. Die mRNA-Expression wurde mittels $\Delta\Delta C_t$ -Methode ermittelt.

qRT-PCR wurde standardmäßig nach folgendem Protokoll in einem Gesamtvolumen von 12,5 μl durchgeführt:

Platinum SYBR Green Kit (Invitrogen, Karlsruhe):

Komponenten	Stammlösung	Verwendete μl	Endkonzentrationen
Supermix	2x	6,25 μl	1x
SYBR Green I		0,025 μl	
Oligonukleotid A	10 μM	0,5 μl	0,4 mM
Oligonukleotid B	10 μM	0,5 μl	0,4 mM
Template RT-Reaktion	1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	$\pm 2 \mu\text{l}$	0-40 ng
<i>Aqua ad.</i>		12,5 μl	

Die qRT-PCR wurde standardmäßig nach folgendem Protokoll mittels Stratagene Mx 3005P™ System durchgeführt:

95 °C	15 min	} 40-50 Zyklen
95 °C	30 sec	
X T _A °C	20-30 sec	
72 °C	30 sec	

Schmelzkurve

95 °C	1min
X T _A °C	30 sec
95 °C	30 sec

Die Anlagerungstemperatur X T_A, wie in Tab. 2.6 unter 2.6.3 angegeben, wurde für jedes Primerpaar, individuell gewählt.

2.6.8 Aufreinigung und Isolierung von DNA-Fragmenten

Zur Aufreinigung von DNA-Fragmenten für die Herstellung von Plasmiden wurden die entsprechenden Proben mit einem 0,5-2%igen Agarosegel (w/v) aufgetrennt, durch Ethidiumbromid-Färbung (siehe 2.6.5) auf einem Transilluminator (Biometra, Göttingen) sichtbar gemacht, mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten und anschließend mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) extrahiert.

2.6.9 Herstellung eines pMEF2-SEAP-Plasmides

Mittels Oligohybridisierung der MEF2-Konsensussequenz (siehe 2.6.8.1) und anschließender Ligation des Oligohybridisierungsproduktes in pSEAP-basic (Tab. 2.4, siehe Ligation 2.6.12) wurde ein pMEF2-SEAP-Plasmid konstruiert.

2.6.9.1 Oligohybridisierung

Für die Oligohybridisierung wurden zwei MEF2-Oligonukleotide verwendet, die eine dreifache Wiederholung der MEF2-Konsensussequenz enthalten (Tab. 2.7), um ein Signalverstärkung im jeweiligen MEF2-SEAP-Reportergen-Assay zu erreichen. Die zweite Wiederholung der MEF2-Konsensussequenz ist spiegelverkehrt eingebaut.

Tab. 2.7: Verwendete Oligonukleotide für Oligohybridisierung

MEF2-Konsensus-Sequenz (SABioscience, Qiagen)	CTAGCGCTCTAAAATAACCCT	Firma
MEF2 sense (68 bp)	CCTAGCGCTCTAAAATAACCCTCTAGCGCTCTAAAAT AACCCTCTAGCGCTCTAAAATAACCCTG	Eurofins MWG Operon (Ebersberg)
MEF2 antisense (75 bp)	CATGGATCGCGAGATTTTTATTGGGAGATCGCGAGATTT TTATTGGGAGATCGCGAGATTTTTATTGGGACGATC	

Folgender 2-fach Ansatz wurde verwendet:

MEF2-sense (unverdünnt)	5 µl
MEF2-antisense (unverdünnt)	5 µl
NEB-Puffer 3	5 µl
Aqua ad	35 µl

Der Oligohybridisierungsansatz wurde für 5 min auf 95 °C erhitzt, anschließend langsam über 2-3 h auf Raumtemperatur abgekühlt und über Nacht bei -20 °C gelagert. Anschließend erfolgte eine Auftrennung des Oligohybridisierungsproduktes über ein 10%iges PAGE-Gel (siehe 2.6.9).

2.6.10 Auftrennen und Isolieren von DNA-Fragmenten mittels PAGE-Gelelektrophorese

Der Oligohybridisierungsansatz wurde aufgeteilt und jeweils 5 µl pro Tasche des 10%igen PAGE-Gels (Tab. 2.8) beladen und für 30 min bei 180 V (oder 40 min bei 140 V) aufgetrennt.

Tab. 2.8: Zusammensetzung des PAGE-Gels

Konzentration: 10%	Volumen
1 x TBE	6 ml
40% Acrylamid/Bisacrylamid (29:1)	2 ml
10% APS	100 µl
TEMED	10 µl

Anschließend wurde das PAGE-Gel mit Ethidiumbromid für 10 min inkubiert, für 15 min in Wasser gewaschen und mittels UV-Licht (Transilluminator, Biometra, Göttingen) die Bande der richtigen Größe sichtbar gemacht und ausgeschnitten. Gelstücke wurden in einem Reaktionsgefäß mit dem Skalpell zerkleinert und 100 µl Elutionspuffer (Tab. 2.1) bei Raumtemperatur für 4-8 h oder über Nacht inkubiert. Die Gelfragmente wurden 1 min zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Gelfragmente wurden ein zweites Mal zentrifugiert und die Überstände vereinigt. Anschließend wurde die DNA aus dem Überstand gefällt (siehe 2.6.10).

2.6.11 DNA-Fällung

Zur Isolierung von DNA (siehe 2.6.9) wurde der aus dem PAGE-Gel gewonnene Überstand mit 1:10 3 M Natriumacetat (pH 5,2) gemischt und das 2,5-fache Volumen 100% eiskalten Ethanols (500 µl) zum Ausfällen der DNA hinzugegeben (1h - über Nacht). Anschließend wurde bei 16200 x g für 15 min, 4 °C zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Das Pellet wurde mit 70%igem Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert (16200 x g für 15 min, 4 °C), der Überstand abgenommen und das Pellet im Heizblock bei 37 °C getrocknet. Die DNA wurde in 20 µl sterilen Wassers aufgenommen.

2.6.12 Spezifische Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen sind Enzyme, die einen DNA-Doppelstrang sequenzspezifisch spalten. Pro 1 µg DNA wurde 1 U Restriktionsendonuklease (MBI Fermentas, USA) mit dem zugehörigen Puffer verwendet. Die Reaktionsansätze (50 µl) wurden bei 37 °C im Thermocycler (Biometra, Göttingen) 1-3 h inkubiert (siehe 2.6.12).

2.6.13 Ligation von DNA-Fragmenten

Für eine Ligation des durch Oligohybridisierung gewonnenen MEF2-DNA-Fragmentes in den SEAP-basic (Tab. 2.4; Tab. 2.7) erfolgte eine Linearisierung des Vektors mittels Restriktionsendonukleasen.

Ansatz des Restriktionsverdau:

pSEAP-basic	2 µg
KpnI	2 µl
NheI	2 µl
NEB-Puffer 1	5 µl
<i>Aqua ad</i>	50 µl

Die verwendeten Enzyme wurden so ausgewählt, dass das Oligohybridisierungsprodukt mit seinen *sticky ends* in richtiger Orientierung in den pSEAP-basic kloniert werden konnte. Der Restriktionsansatz wurde durch ein 1%iges Agarosegel (w/v) aufgetrennt (siehe 2.6.5) und der linearisierte SEAP-basic durch Gel-Extraktion (Qiaquick Gelextraktion Kit) isoliert. Anschließend erfolgte eine Ligation des MEF2-DNA-Fragmentes mit dem linearisierten SEAP-basic (Inkubationszeit von 72 h).

Ligationsansatz bei 14 °C (Thermoblock, Biometra, Göttingen):

pSEAP-basic	47 ng
T4-DNA-Ligase	1 µl
T4-DNA-Ligase-Puffer	1 µl
MEF2-DNA-Fragment	2,25 ng
<i>Aqua ad</i>	10 µl

2.6.14 Chemische Transformation von *E.coli*

50 µl chemisch kompetente *E.coli* Top10-Zellen (One Shot Competent Cells, Invitrogen, Karlsruhe) wurden mit 5 µl des Ligationsansatzes (siehe 2.6.12) transformiert. Der Ansatz wurde 30 min auf Eis, dann für 30 sec bei 42 °C (Hitzeschock) und anschließend auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 250 µl S.O.C.-Medium (Tab. 2.2) erfolgte eine Inkubation für eine Stunde bei 37 °C. Die Selektion positiver Klone erfolgte auf LB-Agar-Platten mit Ampicilin (Tab. 2.3) und Tab. 2.4) und Inkubation bei 37 °C über Nacht. Anschließend wurde die Plasmid-DNA isoliert (siehe 2.6.1) und sequenziert (siehe 2.6.2).

2.7. Proteinbiochemische Methoden

2.7.1 Isolation von Proteinen von HEK293-Zellen

Zur Herstellung von Proteinlysaten wurden Zellen in 1 x PBS (Tab. 2.1) gewaschen. Anschließend wurden 10-20 µl/cm² Lysispuffer (Tab. 2.1) auf die Zellen gegeben und 30 min bei 4 °C schüttelnd inkubiert. Die Zellen wurden mit dem Zellschaber abgelöst und für 10 min bei 3500 x g (HERAEUS FRESCO 17, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), 4 °C, zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und die Proteinkonzentration (siehe 2.7.3) bestimmt. Die erhaltenen Proben wurden bei -80°C gelagert.

2.7.2 Isolierung von Zytosol- und Zellkernfraktion von HEK293-Zellen

Hierfür wurden Zellen mit Protease-Inhibitor versetztem PBS gewaschen und anschließend mit einem Detergenz-haltigem hypertonem Puffer behandelt, wodurch die zytosolische Zellfraktion nach Zentrifugation bei 14000 x g (HERAEUS FRESCO 17, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), für 30 sec bei 4 °C, erhalten wurde. Die zytosolische Fraktion (Überstand) wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei -80 °C gelagert. Das verbliebene Pellet wurde in 50 µl Lysispuffer aufgenommen und für 30 min auf Eis inkubiert. Die Zellkernfraktion wurde durch Zentrifugation bei 14000 x g (HERAEUS FRESCO 17, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), für 10 min bei 4 °C, gewonnen. Die Proteinkonzentrationen von Zytosol- und Zellkernfraktion wurden mittels Bradford-Assay bestimmt (siehe 2.7.3.2) und die Proben bei -80 °C gelagert.

2.7.3 Proteinbestimmung

2.7.3.1 BCA (Bicinchoninsäure)-Assay

Zur Bestimmung des Proteingehaltes wurde die BCA-Methode verwendet¹⁷⁷. Bei dieser Methode führt eine Reduktion von Cu^{2+} - zu Cu^+ -Ionen durch Proteine im alkalischen Milieu (Biuret-Reaktion) und anschließende Chelatisierung des Cu^+ mit zwei Molekülen Bicinchoninsäure zur Ausbildung eines violetten, wasserlöslichen Farbkomplex mit einem Absorptionsmaximum bei 562 nm. Für die Reaktion wurden 4 μl Probe (siehe 2.7.1) bzw. 15 μl der BSA-Standardlösung mit je 200 μl des Nachweisreagenzes [50 Teile BCA-Reagenz (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) mit einem Teil CuSO_4 (4% w/v)] vermischt und für 30 min bei 37 °C inkubiert und die Extinktion bei 560 nm gemessen (MultiWell Counter, Tecan Infiniit 2000, Schweiz). Als Standardkurve für eine Kalibrierung der erhaltenen Messwerte wurde eine Eichreihe von BSA-Lösungen verschiedener Konzentrationen (100-1000 $\mu\text{g/ml}$) verwendet.

2.7.3.2 Bradford-Assay

Eine Alternative zur BCA-Methode der Proteinbestimmung ist die Methode nach Bradford^{178,179}. Hierbei bildet Coomassie Brilliant Blue G-250 in saurem Milieu mit kationischen und unpolaren Seitenketten Proteinkomplexe aus, wodurch sich das Absorptionsmaximum von 465 nach 595 nm verschiebt. Für die Quantifizierung wurde das Bradford Reagenz (Bio-Rad) 1:5 mit Wasser verdünnt. 4 μl Proteinlysate bzw. 15 μl der BSA-Standardlösung (100-1000 mg/l) wurden mit 200 μl des Nachweisreagenzes in einer 96-Well Schale gemischt. Nach 10-minütiger Inkubation bei 37 °C erfolgte die Messung der Extinktion bei 590 nm (MultiWell Counter; Tecan Sunrise, Schweiz).

2.7.4 Herstellen von Proteinlysaten aus HEK293-Zellen

Die Zellysate wurden 1:1 (v/v) mit Laemmli-Puffer (Tab. 2.1) versetzt, für 10 min bei 95 °C denaturiert und bei -20 °C gelagert. Von den Proteinlysaten wurden 20-80 μg Protein mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (siehe 2.4.7) aufgetrennt.

2.7.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE ist eine Methode zur Auftrennung von Proteinen entsprechend ihres Molekulargewichtes. Durch Denaturierung der Proteine mittels Laemmli-Puffer (siehe 2.7.4) binden die denaturierten Polypeptidketten SDS (negativ geladen) und wandern im elektrischen Fluss zur Anode. Anhand von Polyacrylamidgelen mit 6%igem Sammelgel (Tab. 2.9) und 8-12%igem Trenngel (Tab. 2.9) wurden die gesuchten Proteine

entsprechend der Größe aufgetrennt. Zur Proteingrößenbestimmung wurde auf jedem Gel ein Protein-Größenstandard PeqGold Proteinmarker IV (PeqLab, Erlangen) aufgetragen. Die Auftrennung der Proteine erfolgt im Laufpuffer (Tab. 2.1) für das Sammelgel bei 11 mA/Gel für 35 min und für das Trenngel bei 22 mA/Gel für 1 h und 50 min.

Tab. 2.9: Zusammensetzung der Polyacrylamid-Gele

	6% Sammelgel	12% Trenngel	10% Trenngel	8% Trenngel
Wasser	0,964 ml	1,88 ml	2,285 ml	2,713 ml
0,5 M Tris-HCl, pH 6.8	625 µl	-	-	-
1,5 M Tris-HCl; pH 8.8	-	1,563 ml	1,563 ml	1,563 ml
Acrylamid/Bisacrylamid 26 : 0,7	576 µl	-	-	-
Acrylamid/Bisacrylamid 29,3 : 0,53	-	2,55 ml	2,14 ml	1,715 ml
10% SDS	25 µl	125 µl	125 µl	125 µl
10% APS	30 µl	75 µl	75 µl	75 µl
TEMED	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl

2.7.6 Westernblot-Analysen

Die Proteine wurden durch das Semidry-Blot-Verfahren auf PVDF (Polyvinylidenfluorid)-Membranen (Whatman™, GE Healthcare, Buckinghamshire, Großbritannien) übertragen. Für den Transfer der negativ geladenen Proteine aus dem SDS-PAGE-Gel auf die PVDF-Membran wurde die Apparatur (Biometra, Göttingen oder Bio-Rad, München, Deutschland) wie folgt aufgebaut: 2 x Filterpapier, PVDF-Membran, 2 x Filterpapier. Durch einen gerichteten Stromfluss von Kathode zur Anode wurden die negativ geladenen Proteine auf die PVDF-Membran transferiert. Der Transfer erfolgte bei 2 mA/cm² über 75-90 min in Transferpuffer (Tab. 2.1). Zur Überprüfung der Qualität des Transfers, wurde die PVDF-Membran für 3 min in Ponceau-S-Lösung (Tab. 2.1) gefärbt und durch wiederholtes Waschen in destilliertem Wasser die Proteinbanden sichtbar gemacht. Nach Entfärbung der Membran wurde diese bei Raumtemperatur mit Blockierungslösung (5% fettfreies Milchpulver (w/v) in TBS/Tween 20) inkubiert, um unspezifische Bindungen abzusättigen. Anschließend wurde die PVDF-Membran in einer Lösung mit Primär-Antikörper (5% BSA (w/v) in TBS/Tween 20) über Nacht bei 4 °C (Tab. 2.10 und 2.11)

inkubiert. Nach weiterem Waschen mit TBS/Tween 20 (Tab. 2.1) wurde die Membran mit einem Meerrettichperoxidase-gekoppeltem Sekundär-Antikörper (Tab. 2.12) in Blockierungslösung für 1-2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit TBS/Tween 20 erfolgte die Detektion der Membran mit dem ECL- (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) oder dem Immun-Star-WesternC-System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), das auf einer Peroxidase-katalysierten Oxidation des zyklischen Diacylhydrazids Luminol durch H₂O₂ unter alkalischen Bedingungen beruht. Die Chemolumineszenz wurde mit dem ChemiDoc XRS-System (Bio-Rad, München, Deutschland) detektiert und mit der Software QuantityOne (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) semi-quantitativ ausgewertet. Wenn dieselbe Membran mit verschiedenen Primär-Antikörpern inkubiert wurde, erfolgte als Zwischenschritt eine Entfernung bereits gebundener Antikörper mit dem Restore-Western-Blot-Stripping-Puffer (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Als Beladungskontrollen für die Auswertung wurden HSP90 oder β -Actin verwendet.

Tab. 2.10: Verwendete Primär-Antikörper für die Detektion der katalytischen Untereinheiten des Calcineurins

Primär-Antikörper	Firma	Ziel
Pan- α	Cell Signaling Technologies	detektiert bevorzugt α -Isoform, erkennt auch β - und γ -Isoform
PP2BA	AbDSerotec	detektiert α - und β -Isoform
PP2BA- α	Santa Cruz Biotechnology	detektiert α -Isoform
PP2BA- β	Santa Cruz Biotechnology	detektiert β -Isoform
PP2BA- β	Millipore, USA	detektiert β -Isoform

Für eine Detektion der Proteinexpression von PP2BA- α bzw. PP2BA- β wurden verschiedene spezifische Antikörper verschiedener Firmen (Tab. 2.10) verwendet. Für PP2BA- α sowie PP2BA- β existieren jeweils drei Spleißvarianten (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5530>) mit hoher Sequenzkompatibilität (~90% des Gesamtproteins) ⁷⁶. N- und C-Terminus (ca. 10% des Gesamtproteins) dieser Spleißvarianten weisen die größte Variabilität zueinander auf ^{76,105,110}. Die hier verwendeten Antikörper wurden gegen Peptidbereiche der variablen C-terminalen Region von PP2BA generiert. Eine Unterscheidung von PP2BA- α bzw. PP2BA- β war aufgrund von unterschiedlichen Proteingrößen möglich, d.h. PP2BA- α konnte bei ~59 kDa und PP2BA- β bei ~62 kDa im Westernblot detektiert werden.

Tab. 2.11: Verwendete Primär-Antikörper

Primär-Antikörper	Firma	eingesetzte Verdünnung	Klonalität	Spezies
Pan-α	Cell Signaling Technologies	1:1000	polyklonal	Kaninchen
PP2BA-β	Santa Cruz Biotechnology	1:100 -300	polyklonal	Ziege
PP2BA	AbDSerotec USA	1:100	monoklonal	Maus
PP2BA-β	Millipore USA	1:500	polyklonal	Kaninchen
β-Actin	Cell Signaling Technology	1:1000	monoklonal	Kaninchen
HSP90	SantaCruz und Cell Signaling	1:3000 1:100	polyklonal polyklonal	Kaninchen
MR (1-18)	Dr. Gomez-Sanchez ¹⁸⁰	1:500	monklonal	Maus
eGFP (FL)	Santa Cruz Biotechnology	1:1000	polyklonal	Kaninchen

Tab. 2.12: Verwendete Sekundär-Antikörper

Sekundär-Antikörper gegen	eingesetzte Verdünnung	Firma
Kaninchen	1:5000	Cell Signaling Technology
Ziege	1:20000	Rockland
Maus	1:3000	Cell Signaling Technology

2.8 Co-Immunopräzipitation

Eine Präzipitation von GFP und eGFP-MR aus Proteinlysaten erfolgte mittels MultiMACS™ GFP Isolation Kit der Firma Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Deutschland). Dabei wurde ein monoklonaler Anti-eGFP-Antikörper verwendet, der an sogenannte MACS MicroBeads gekoppelt ist. Dieser Antikörper erkennt und bindet spezifisch eGFP-gekoppelte Proteine eines Zellysates. Die Durchführung der Co-Immunopräzipitation erfolgte nach Herstellerangaben. Die Proteinlysate von 60 cm² Schalen und das gewonnene Eluat wurden anschließend mittels Westernblot (siehe 2.7) analysiert.

2.9 SEAP-Reportergen-Assay

Für die Messung der Transkriptionsaktivierung von CRE-, NFAT- und MEF2-abhängigen Genen wurden pCRE-SEAP, pNFAT-SEAP und pMEF2-SEAP (Tab.2.4) verwendet. Diese Vektoren enthalten als Zielgen die sekretorische alkalische Phosphatase (SEAP). HEK293-Zellen wurden in einer 24-Well Platte (2 cm² pro Well; siehe 2.3.1) angesät und bei einer optimalen Konfluenz von 80-90% mit 100 nM siRNA sowie 0,05 µg pCRE-SEAP, 0,05 µg eGFP-MR und 0,05 µg pcDNA3.1His-LacZ-Plasmid transfiziert (siehe 2.4.2). Als Negativkontrolle diente jeweils eine „Scheintransfektion“ von HEK293-Zellen, die nur mit dem Transfektionsreagenz DharmaFECT1 inkubiert wurden. 96 h nach Transfektion wurden die Zellen mit unterschiedlichen Substanzen behandelt. Es erfolgte eine 3fach-Bestimmung pro Stimulanz (siehe Tab. 2.13).

Tab. 2.13: verwendete Substanzen und Konzentrationen für die Stimulation der HEK293-Zellen im SEAP-Reportergen-Assays

Stimulanz	Endkonzentrationen	
Vehikel (DMSO-Kontrolle)	0,1 % (v/v)	
Aldosteron	10 nM	
Dexamethason	100 nM	
Forskolin	10 µM	
Geldanamycin	2 µM	
Forskolin + Aldosteron	10 µM Forskolin	10 nM Aldosteron
Geldanamycin + Aldosteron	2 µM Geldanamycin	10 nM Aldosteron

Findet eine Transkriptionsaktivierung statt, wird SEAP exprimiert, in das Medium sekretiert und deren Aktivität durch Verwendung des AttoPhos Kit (Promega, Madison, USA) bestimmt. Hierbei entsteht das stark fluoreszierende BBT-Anion (2'-[2-Benzothiazoyl]-6'-Hydroxy-Benzothiazol), das mit einem MultiWell Reader (Tecan Group AG, Schweiz) gemessen wurde. Dafür wurde das Medium der Zellen nach entsprechenden Stimulationszeiten (24 h) abgenommen. 60 µl Medium wurden mit 60 µl SEAP-Puffer (Tab. 2.1) bei 65 °C für 30 min inkubiert, um andere im Medium vorhandene Phosphatasen zu inaktivieren. Nach anschließender Inkubation bei 4 °C wurden 100 µl des Ansatzes 1:1 mit dem Substrat Atto-Phos-AP-Lösung (0,5 M Endkonzentration, Promega, Madison, USA) vermischt und die Fluoreszenzentwicklung (Anregung 440 nm, Emission 560 nm) für 60 min bei Raumtemperatur im MultiWell-Reader (Tecan Group AG, Schweiz) gemessen. Für eine Normalisierung der Transfektionseffizienz der Zellen wurden diese mit pcDNA3.1His-LacZ transfiziert, wodurch diese Zellen β-Galaktosidase exprimieren. Die Zellen wurden mit MOPS-Puffer (Tab. 2.1) lysiert (30-minütige Inkubation bei 4 °C). Anschließend wurde bei 13800 x g für 10 min zentrifugiert (HERAEUS FRESCO 17, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) und die β-Galaktosidasekonzentration des Überstandes wie folgt bestimmt: 10 µl Lysat wurden mit 50 µl Cleavage Buffer (Tab. 2.1), 20 µl ONPG (4 mg/ml) für 30 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde mit 125 µl Stop Puffer (Tab. 2.1) beendet und die Absorption bei 405 nm gemessen (MultiWell Reader, Tecan Sunrise, Schweiz). Eine Auswertung der SEAP-Transkriptionsaktivität erfolgte durch Bestimmung der Steigung/sec. Die Steigung ist ein Maß für die Änderung entlang einer Regressionsgeraden, die durch die Datenpunkte verläuft. Anschließend wird die Steigung/sec auf die Transfektionskontrolle β-Galaktosidase normiert, die ein Maß für die Transfektionseffizienz des jeweiligen Versuches darstellt.

Die Berechnung der Aldo-induzierten Inhibierung erfolgte nach folgender Formel:

$$\frac{100 \times [(Aldosteron + Forskolin)) - (Forskolin-100)]}{(Forskolin-100)}$$

2.10 Immunfluoreszenz

Um die Lokalisation von Proteinen in der Zelle sichtbar zu machen, wurde die Methode der Immunfluoreszenz angewendet. Dafür wurde das Calcineurin spezifisch mittels eines Primär-Antikörpers, der wiederum durch einen fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörper erkannt wird, sichtbar gemacht.

Tab. 2.14: Verwendete Antikörper in der Immunfluoreszenz

Primär-Antikörper	Spezies	Verdünnung	Sekundär-Antikörper	Spezies	Verdünnung
PP2BA- α (β)	Kaninchen	1:50	Oregon Green	Ziege	1:1000
PP2BA- β (C20)	Ziege	1 :50	AlexaFluor 488	Esel	1:1000

Mit MR-RFP transfizierte Zellen wurden durch Behandlung mit 1 ml EDTA (0,7 mM) und 1 Tropfen Trypsin (0,1%) von der 10 cm² Schale abgelöst und in 1,5 ml serumhaltigem Medium aufgenommen. Die Zellzahl wurde mittels CASY-Zellzähler (Innovatis AG, Reutlingen) bestimmt und die Zellsuspension (3-4 x 10⁶ Zellen/ml) mit konditioniertem Medium im Verhältnis 1:4 (v/v) gemischt. 40 μ l dieser Suspension wurde pro Well auf 10-Well-Objektträger getropft. Nach 4-5-stündiger Inkubation der Zellen in einer feuchten Kammer wurde mit 20 ml serumfreien Medium bedeckt und über Nacht bei 37 °C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen mit 0,1% DMSO (Vehikel) bzw. 10 nM Aldo für 2 h stimuliert. Das Medium wurde abgesaugt und die Objektträger in eine feuchte Kammer gelegt. Die Zellen wurden für 30-60 min mit 4% Paraformaldehyd bei Raumtemperatur fixiert. Anschließend wurde 3 x 5 min mit PBS gewaschen und die Zellen mit 1% TritonX-100/PBS für 10 min permeabilisiert. Es erfolgten weitere Waschschrte von 1 x 10 min mit 1% SDS/PBS und 1 x 10 min mit 100 mM Glycin/PBS. Eine Blockierung von unspezifischen Bindungen durch den Zweitantikörper erfolgte in PBS/10% Esel-Serum für den PP2BA- β Antikörper von Santa Cruz (Tab. 2.14) bzw. mit PBS/10% Ziegen-Serum für den Pan- α Antikörper (Cell Signaling) für 30 min. Ein Anfärben des Calcineurins erfolgte anschließend mit dem jeweiligen Primär-Antikörper (Pan- α , Cell Signaling) oder PP2BA- β (Santa Cruz, Tab. 2.14) über Nacht bei 4 °C in der feuchten Kammer. Es erfolgten drei Waschschrte für 5 min mit PBS und eine Inkubation im Dunkeln mit dem Sekundär-Antikörper Oregon Green (Tab. 2.14) in PBS/1% Kaninchen-Serum/1% BSA bzw. mit dem Sekundär-Antikörper AlexaFluor488 (2mg/ml) (Tab. 2.14) in PBS/1% Esel-Serum/1% BSA. Nach 3 x 5 min

waschen mit PBS wurde die DAPI-Arbeitslösung (1 µg/ml) für 2 min hinzugegeben. DAPI interkaliert mit der DNA und färbt die Zellkerne an. Anschließend wurde 3 x 5 min mit PBS gewaschen und die Objektträger mit DAKO (Dako, Deutschland) eingedeckelt. Nach dem Antrocknen des Deckgläschens wurden die Objektträger mittels Fluoreszenz-Mikroskop (Keyence BZ-8100E, Osaka, Japan) und der *BZ image analysis application software* fotografiert und ausgewertet. Die subzelluläre Verteilung von PP2BA wurde in Abwesenheit (RFP) und Anwesenheit des MR (RFP-MR) bestimmt (rot: Anregungs-λ: 558 nm; Emission: 583 nm; grün: Anregungs-λ: 490 nm; Emission: 530-560 nm; blau: Anregungs-λ: 365 nm; Emission: 460 nm). Durch fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen und eine Auswertung dieser Zellen mittels des Keyence BZ-8100E konnte eine spezifische PP2BA-Färbung gezeigt werden, da singuläre Inkubationen der Zellen mit Primär- oder Sekundär-Antikörper kein Fluoreszenzsignal zeigten, wodurch unspezifische Bindungen der Antikörper ausgeschlossen werden konnten.

2.11 Statistische Analyse

Die gewonnenen Daten wurden mit dem Tabellen-Kalkulationsprogramm Microsoft Excel ausgewertet. Die Verteilung der Messdaten ist als arithmetischer Mittelwert plus Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. Der Vergleich von zwei Gruppen erfolgte mittels gepaartem oder ungepaartem Student-t-Test oder Chi²-Test, wenn für die zugrundeliegenden Daten keine Normalverteilung angenommen werden konnte. Werte von $p \leq 0,05$ wurden als statistisch signifikant angesehen und mit einem „*“ gekennzeichnet.

3. Ergebnisse

3.1. Einfluss des aktivierten Mineralokortikoid-Rezeptors auf die Expression der katalytischen Calcineurin-Isoformen PP2BA- α und PP2BA- β

HEK293-Zellen wurden als heterologes Expressionssystem für diese Promotionsarbeit ausgewählt, weil sie keinen MR exprimieren und somit als kontrollierbares System für die Analyse von Wechselwirkungen von hMR und der cAMP/CREB-Signalkaskade dienen¹⁶⁷. Anhand vorausgehender Analysen konnte gezeigt werden, dass die Inhibierung der cAMP/CREB-Signalkaskade durch den aktivierten MR HSP90- und PP2B-abhängig reguliert wird. Mittels Calcineurin-Aktivitäts-Assay wurde eine 2,5-fache Erhöhung der PP2B-Aktivität nach 6-stündiger MR-Stimulation mit 10 nM Aldosteron nachgewiesen⁷³. Es konnte keine Veränderung des Proteinexpressionslevels der beiden katalytischen Calcineurin-Isoformen, PP2BA- α und PP2BA- β , nachgewiesen werden (Abb. 3.1).

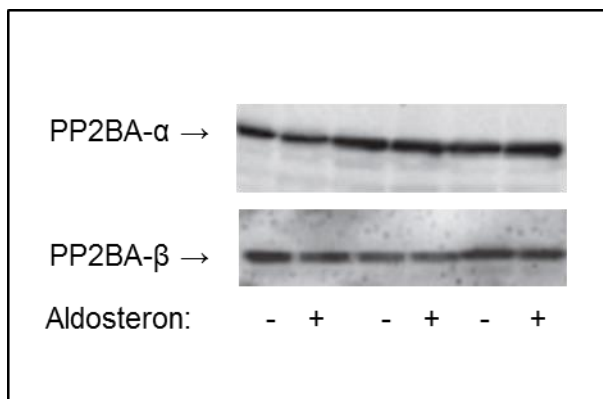


Abb. 3.1: Proteinexpression der katalytischen Calcineurin-Isoformen PP2BA- α und PP2BA- β nach MR-Aktivierung

Mit MR transfizierte HEK293-Zellen wurden für 6 h mit 10 nM Aldosteron stimuliert. Anschließend wurde die Proteinexpression mittels Westernblot unter Verwendung der Santa Cruz Antikörper (PP2BA- α , PP2BA- β) detektiert. N=3; n=6.

3.2. Herunterregulation der katalytischen Calcineurin-Isoformen PP2BA- α und PP2BA- β durch siRNA

Die beiden katalytischen Calcineurin-Isoformen, PP2BA- α und PP2BA- β , wurden unabhängig voneinander mittels siRNA herunterreguliert (siehe 2.4.2). Für PP2BA- α siRNA wurden unterschiedliche siRNA-Konzentrationen (50, 100, 200 nM) (Abb. 3.2 A), sowie unterschiedliche Inkubationszeitpunkte (96, 120, 144 h) getestet (Abb. 3.2 B).

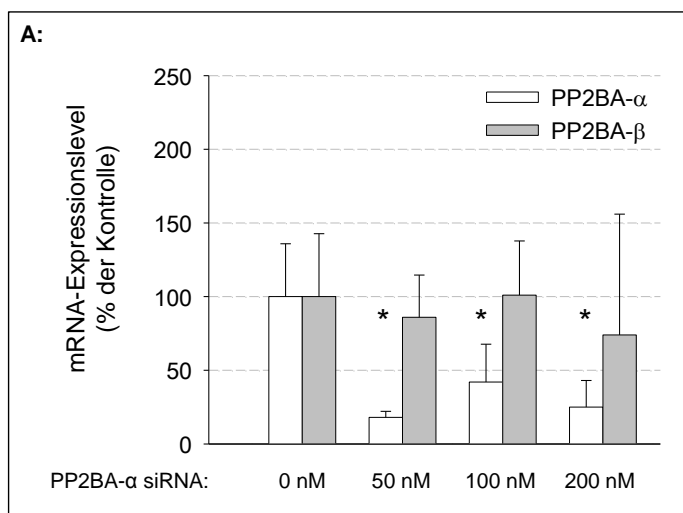


Abb. 3.2 A: Konzentrationsabhängige Reduktion von PP2BA- α mRNA mittels siRNA

HEK293-Zellen wurden mit unterschiedlichen PP2BA- α siRNA Konzentrationen (50, 100, 200 nM) für 96 h inkubiert und die mRNA-Expression mittels qRT-PCR quantifiziert. Für 50 nM, 200 nM: N=2, n=3-4; für 100 nM: N=5; n=6-7; *p<0,05.

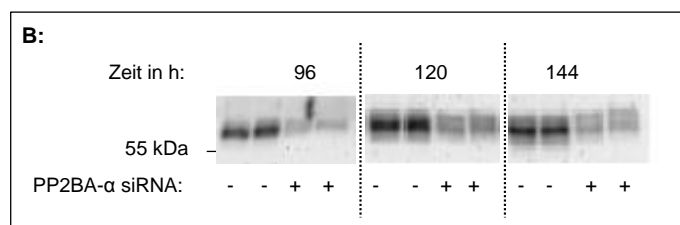


Abb. 3.2 B: Zeit-abhängige Reduktion von PP2BA- α Proteinexpression mittels siRNA

HEK293-Zellen wurden mit 100 nM PP2BA- α siRNA für die angegebenen Zeitpunkte (96, 120,

144 h) inkubiert und die Proteinexpression mittels Westernblot unter Verwendung des Pan- α Antikörpers detektiert. N=3; n=6; *p<0,05.

Eine Verwendung von 100 nM PP2BA- α siRNA zeigte bei verschiedenen Inkubationszeiten folgende Proteinexpressionsniveaus der PP2BA- α Isoform: für 96 h eine Herunterregulation von PP2BA- α um 62%, für 120 h eine Herunterregulation von PP2BA- α um 56 % und für 144 h eine Herunterregulation von PP2BA- α um 52 % (Abb. 3.2 B).

Zur Kontrolle wurden in allen Versuchen die Zellen mit scrambled (scr)-siRNA transfiziert, um unspezifische Effekte, die durch die siRNA hervorgerufen werden könnten, auszuschließen. Die Verwendung von scr-siRNA (100 nM) zeigte keinen Einfluss auf die mRNA- sowie Proteinexpression von PP2BA- α und PP2BA- β (Abb. 3.3).

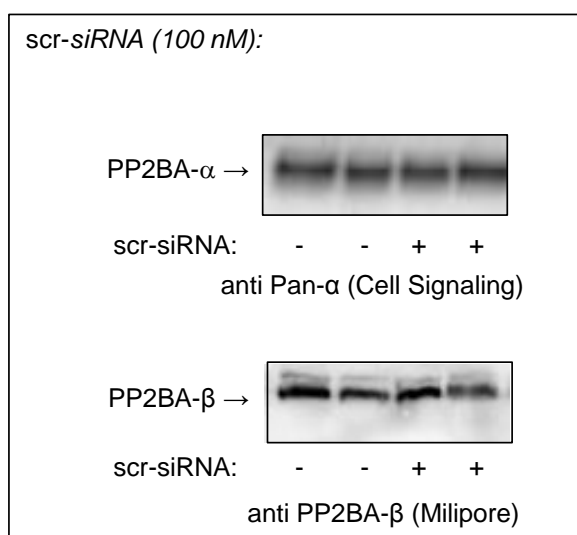


Abb. 3.3: PP2BA- α und PP2BA- β Proteinexpression unter Verwendung von scr-siRNA

HEK293-Zellen wurden mit scr-siRNA (100 nM) transfiziert. Anschließend wurde die Proteinexpression unter Verwendung des anti Pan- α Antikörpers (PP2BA- α) sowie des anti PP2BA- β Antikörpers (PP2BA- β) bestimmt. PP2BA- α (120 h), PP2BA- β (96 h), N=3; n=6.

Eine Verwendung von 100 nM PP2BA- α siRNA und eine Inkubationszeit von 96 h zeigte eine stabile und reproduzierbare Herunterregulation der PP2BA- α Isoform auf mRNA- um 58% und Proteinexpressionsniveau um 62% (Abb. 3.4, Abb. 3.5).

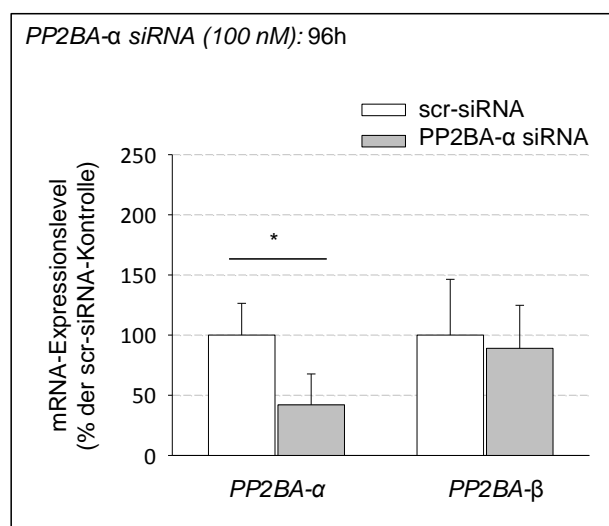


Abb. 3.4: Spezifische Reduktion der PP2BA- α mRNA-Expression unter Verwendung von siRNA

Quantifizierung der mRNA-Expression von PP2BA- α und PP2BA- β mittels qRT-PCR nach Verwendung von PP2BA- α siRNA (100 nM, 96 h) in Bezug zur mit scr-siRNA transfizierten Kontrolle. N=5; n=6-7; *p<0,05.

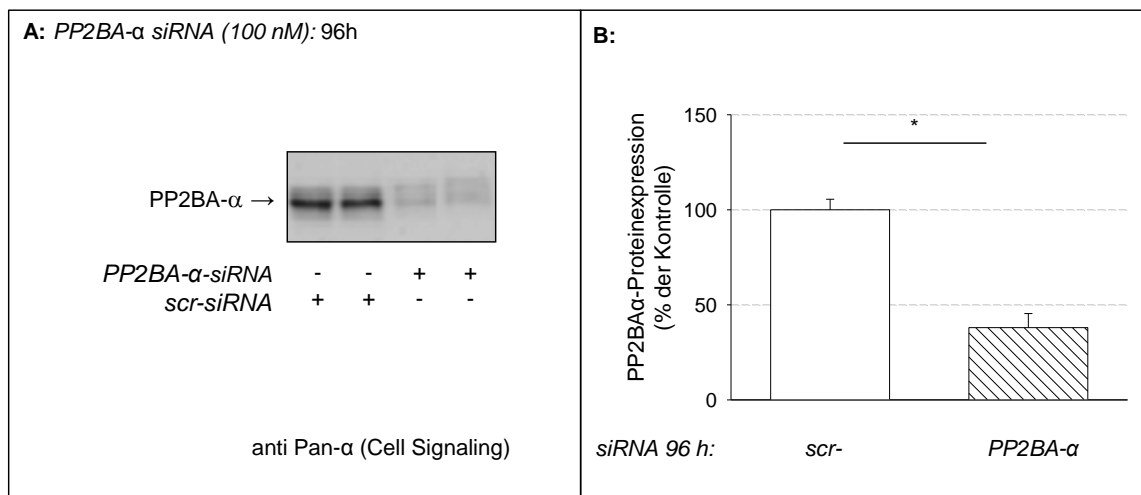


Abb. 3.5: Spezifische Reduktion der PP2BA- α Proteinexpression unter Verwendung von siRNA

A: HEK293-Zellen wurden mit PP2BA- α siRNA (100 nM) transfiziert und nach 96 h die Proteinexpression unter Verwendung des anti Pan- α Antikörpers (PP2BA- α) bestimmt. **B:** Quantifizierung der PP2BA- α Proteinexpression nach Herunterregulation mit siRNA in Bezug zur mit scr-siRNA transfizierten Kontrolle. N=3; n=6; *p<0,05.

Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass eine spezifische Herunterregulation der PP2BA α Untereinheit erzielt wurde, ohne die mRNA Expression der zweiten katalytischen Isoform des Calcineurins, PP2BA- β , zu verändern (Abb. 3.4).

Dieses etablierte Protokoll der PP2BA- α Herunterregulation (100 nM, 96h) wurde im Anschluss für die PP2BA- β Untereinheit unter Verwendung von PP2BA- β siRNA übertragen. Hierbei zeigte sich eine spezifische Reduktion der PP2BA- β mRNA Expression um 60% sowie eine um 54% verminderte Proteinexpression (Abb. 3.6; Abb. 3.7). Die mRNA- und Proteinexpression der PP2BA- α Untereinheit wurde durch die PP2BA- β Herunterregulation, im Vergleich zur mit scr-siRNA transfizierten Kontrolle, nicht beeinflusst (Abb. 3.6; Abb. 3.7).

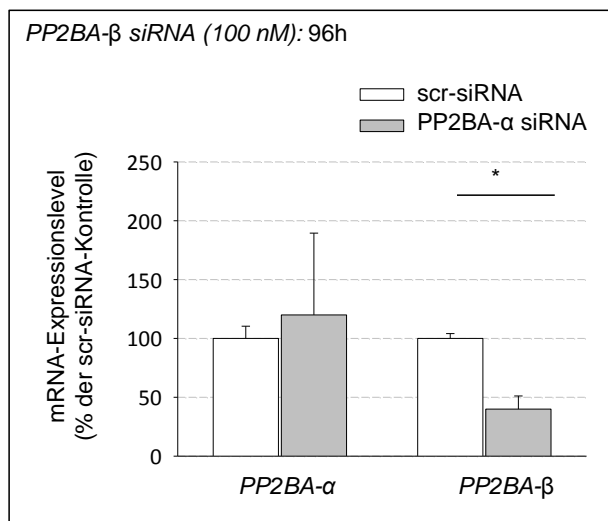


Abb. 3.6: Spezifische Reduktion der PP2BA- β mRNA-Expression unter Verwendung von siRNA

Quantifizierung der mRNA-Expression von PP2BA- α und PP2BA- β mittels qRT-PCR nach Verwendung von PP2BA- β siRNA (100 nM, 96 h) in Bezug zur mit scr-siRNA transfizierten Kontrolle. N=3; n=10-11; *p<0,05.

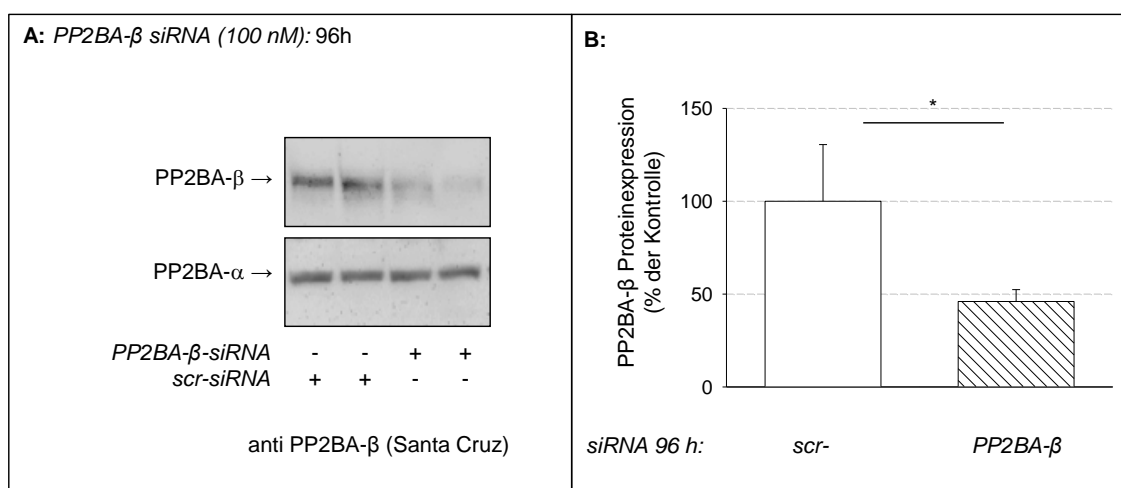


Abb. 3.7: Spezifische Reduktion der PP2BA- β Proteinexpression unter Verwendung von siRNA

A: HEK293-Zellen wurden mit PP2BA- β siRNA (100 nM) transfiziert und nach 96 h die Proteinexpression unter Verwendung des anti PP2BA- β Antikörpers (PP2BA- β) bestimmt. **B:** Quantifizierung der PP2BA- β Proteinexpression nach Herunterregulation mit siRNA in Bezug zur mit scr-siRNA transfizierten Kontrolle. N=4, n=10-12; *p<0,05.

3.3 Analyse des Einflusses des aktivierten Mineralokortikoid-Rezeptors und Calcineurins auf die Transkriptionsaktivität verschiedener zytosolischer Signalwege

3.3.1 Einfluss des Mineralokortikoid-Rezeptors und Calcineurins auf die CREB-Transkriptionsaktivierung

Um zu klären, ob eine der beiden katalytischen Calcineurin-Isoformen über die Aktivierung des MR eine Inhibierung der cAMP/CREB-Signalkaskade auslöst, wurde ein CRE-SEAP-Reportergen-Assay (siehe 2.8), unter Herunterregulation von PP2BA- α bzw. PP2BA- β , durchgeführt.

Abb. 3.8 A zeigt die inhibierende Wirkung des aktivierten MR auf die durch Forskolin stimulierte cAMP/CREB-Signalkaskade in scr-siRNA transfizierten HEK293-Zellen. Forskolin (10 μ M) führte zu einer starken Aktivierung der CRE-Transkriptionsaktivität (914% \pm 59), welche bei gleichzeitiger Stimulation des MR mit Aldosteron (10 nM) vermindert wurde (440 % \pm 28). Eine Stimulation der Zellen mit Aldosteron zeigte keinen signifikanten Einfluss auf die Aktivität des CRE-Reporters⁷³.

Der Einfluss der Aldosteron-induzierten Inhibierung auf die Forskolin-stimulierte CRE-Transkriptionsaktivität nach siRNA-Behandlung ist in Abb. 3.8 B dargestellt. Eine Stimulation der cAMP/CREB-Signalkaskade mit Forskolin (10 μ M) und gleichzeitige MR-Aktivierung mit Aldosteron (10 nM) führte unter Kontrollbedingungen sowie bei der Herunterregulation von PP2BA- α zu einer Inhibierung der CRE-SEAP-Transkriptionsaktivität (Abb. 3.8 B). Eine PP2BA- β Reduktion in den HEK-Zellen bewirkte bei MR-Aktivierung und Stimulation der cAMP/CREB-Signalkaskade eine signifikante Verminderung der Inhibierung der CRE-SEAP-Transkriptionsaktivität um ~60% (Abb. 3.8 B). Aus diesen Daten lässt sich schlussfolgern, dass die MR-Aktivierung die durch Forskolin stimulierte CRE-Transkriptionsaktivierung über die katalytische PP2BA- β Isoform inhibiert.

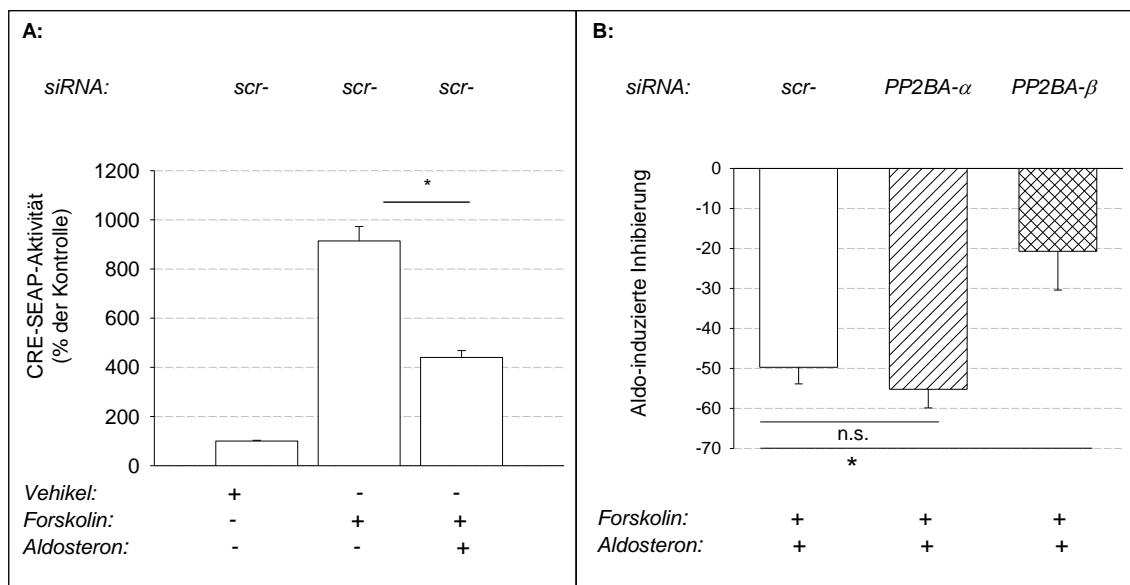


Abb. 3.8: Einfluss der MR-Aktivierung sowie der Herunterregulation von PP2BA- α/β auf die CRE-Transkriptionsaktivität

HEK293-Zellen wurden mit eGFP-MR, pCRE-SEAP, lacZ sowie scr-, PP2BA- α bzw. PP2BA- β siRNA (je 100 nM) transfiziert. Nach 24-stündiger Stimulation der Zellen mit Vehikel/Forskolin (10 μ M) bzw. Aldosteron (10 nM, Aldo) und Forskolin (10 μ M) in Kombination wurde die CRE-Transkriptionsaktivität (CRE-SEAP-Reportergen-Assay) bestimmt. **A:** zeigt die CRE-Transkriptionsaktivität in mit scr-siRNA transfizierten Kontrollzellen. N=5; n=15; *p<0,05. **B:** zeigt die berechnete Aldosteron-induzierte Inhibierung in Abhängigkeit von PP2BA- α und PP2BA- β .

3.3.2 Einfluss von Mineralokortikoid-Rezeptor und Calcineurin auf die MEF2-Transkriptionsaktivierung

3.3.2.1 Konstruktion eines MEF2-SEAP-Plasmides

Für die Durchführung eines MEF2-SEAP-Reportergen-Assays wurde im Rahmen dieser Arbeit ein pMEF2-SEAP-Plasmid konstruiert (siehe 2.6.8). Für eine Signalverstärkung im jeweiligen MEF2-SEAP-Reportergen-Assay wurde die MEF2-Konsensussequenz der Promotorregion von MEF2-abhängigen Genen (SABiosciences, Qiagen) (Tab. 2.7) in dreifacher Wiederholung für die Herstellung eines Oligohybridisierungsproduktes (75 bp, Abb. 3.9 A) eingesetzt. Die flankierenden Basenpaare des Oligohybridisierungsproduktes sowie die Restriktionsendonukleasen (KpnI, NheI), die den pSEAP-basic linearisieren (~4,7 kb, Abb. 3.9 B), wurden so ausgewählt, dass eine korrekte Ligation des MEF2-Oligohybridisierungsproduktes in den pSEAP-basic (Abb. 3.9 C; Tab. 2.4, 2.6.12) möglich war. Durch Sequenzierung wurde eine korrekte Orientierung der MEF2-Konsensussequenz in den pSEAP-basic überprüft und verifiziert (siehe 2.6.2; Abb. 3.9 C).

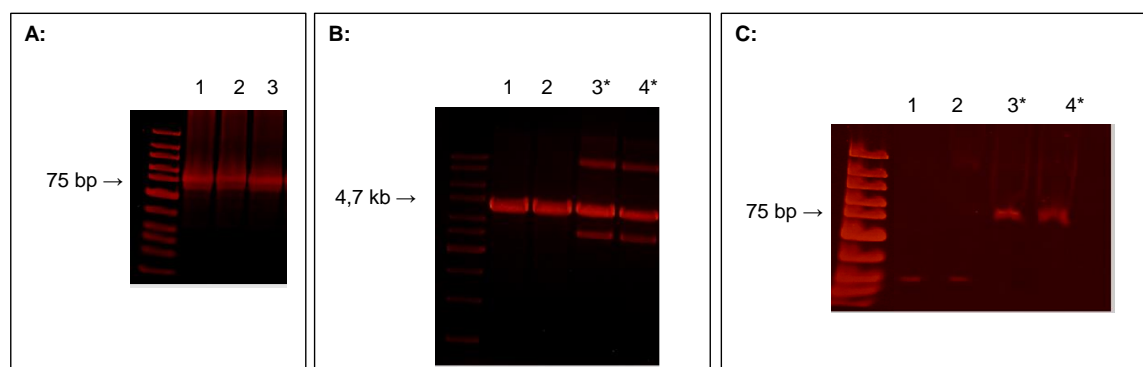


Abb. 3.9: Konstruktion eines MEF2-SEAP-Plasmides

A: Oligohybridisierung: MEF2-DNA-Fragmente (Spur 1-3) wurden im PAGE-Gel aufgetrennt, das Reaktionsprodukt der richtigen Größe (75 bp) aus dem Gel eluiert und die DNA durch Fällung gewonnen. **B:** Linearisierung des SEAP-basic durch Restriktion (KpnI, NheI). Die Banden der gewünschten Größe (Spur 1, 2) wurden aus dem Gel extrahiert (Spur 3*, 4* zeigen unverdauten pSEAP-basic). Ligation des MEF2-Oligohybridisierungsproduktes (75 bp; **A**) in den linearisierten pSEAP-basic (**B**) **C:** zeigt einen DNA-Kontrollverdau von Plasmid-DNA verschiedener *E.coli*-Klone (KpnI, NheI). Nach Isolierung der Plasmid-DNA wurden Klone 3* und 4* (**C**) als positive Klone mittels Sequenzierung identifiziert.

3.3.2.2 Stimulation der MEF2-Transkriptionsaktivität durch aktivierten Mineralokortikoid-Rezeptor

Eine Anwendung des MEF2-SEAP-Reporter-Gen-Assays sollte klären, ob der aktivierte MR in der Lage ist, die MEF2-Transkriptionsaktivität zu beeinflussen. Eine MR-Aktivierung durch Aldosteron (10 nM) zeigte eine signifikante Stimulation der MEF2-Transkriptionsaktivierung im Vergleich zur Kontrolle (Vehikel) (Abb. 3.10).

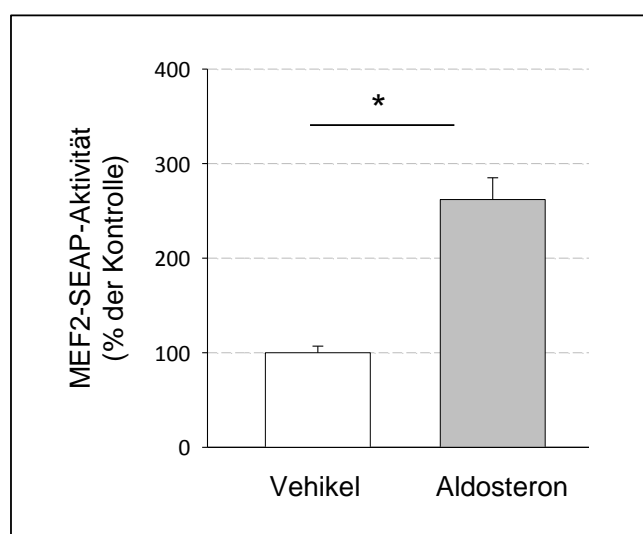


Abb. 3.10: Stimulation der MEF2-Transkriptionsaktivität durch MR-Aktivierung

HEK293-Zellen wurden mit eGFP-MR, MEF2-SEAP sowie lacZ transfiziert, für 24 h mit Vehikel/Aldosteron (10 nM) stimuliert und die MEF2-Transkriptionsaktivität mittels MEF2-SEAP-Reporter-Gen-Assay bestimmt. N=3; n=12; *p<0,05.

Im Gegensatz dazu bewirkte die mit Dexamethason (100 nM) induzierte Stimulation des GRs, dem nächsten Verwandten des MR, keine MEF2-Transkriptionsaktivität (Abb. 3.11). Hierdurch konnte gezeigt werden, dass die Induktion der MEF2-Transkriptionsaktivität MR-spezifisch verläuft.

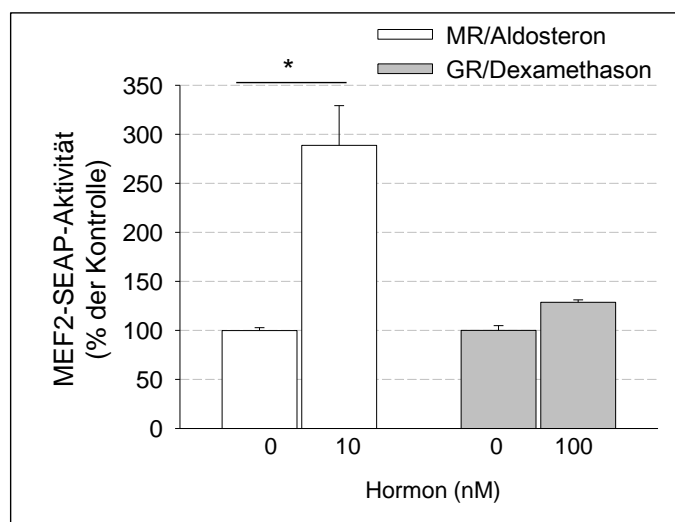


Abb. 3.11: MEF2-Transkriptionsaktivität nach MR- bzw. GR-Stimulation

HEK293-Zellen wurden mit eGFP-MR bzw. eGFP-GR, MEF2-SEAP sowie lacZ transfiziert. Nach 24-stündiger Stimulation mit Vehikel/Aldosteron (10 nM)/Dexamethason (100 nM) wurde die Transkriptionsaktivität mittels MEF2-SEAP-Reporter-Gen-Assay bestimmt. N=2-3; n=3-8; *p<0,05.

Um zu klären, ob eine der beiden katalytischen Calcineurin-Isoformen über eine MR-Stimulation eine MEF2-Transkriptionsaktivierung induziert, wurde ein MEF2-SEAP-Reporter-Gen-Assay (siehe 2.9), unter Herunterregulation von PP2BA- α bzw. PP2BA- β , durchgeführt. Mit scr-siRNA transfizierte Kontrollzellen (100 nM, 96 h) zeigten eine Stimulation der MEF2-Transkriptionsaktivität bei Aldosteron induzierter Aktivierung des MR an (Abb. 3.12). Eine Herunterregulation einer der beiden katalytischen Calcineurin-Isoformen, PP2BA- α bzw. PP2BA- β , zeigte keine Veränderung der MEF2-Transkriptionsaktivität im Vergleich zu Kontrollbedingungen (scr-siRNA, siehe Abb. 3.12).

Somit lässt sich aus diesen Ergebnissen ableiten, dass die Transkription MEF2-abhängiger Gene durch MR-Aktivierung induziert wird (Abb. 3.10), der MR-Effekt dabei aber nicht über Calcineurin vermittelt wird (Abb. 3.12).

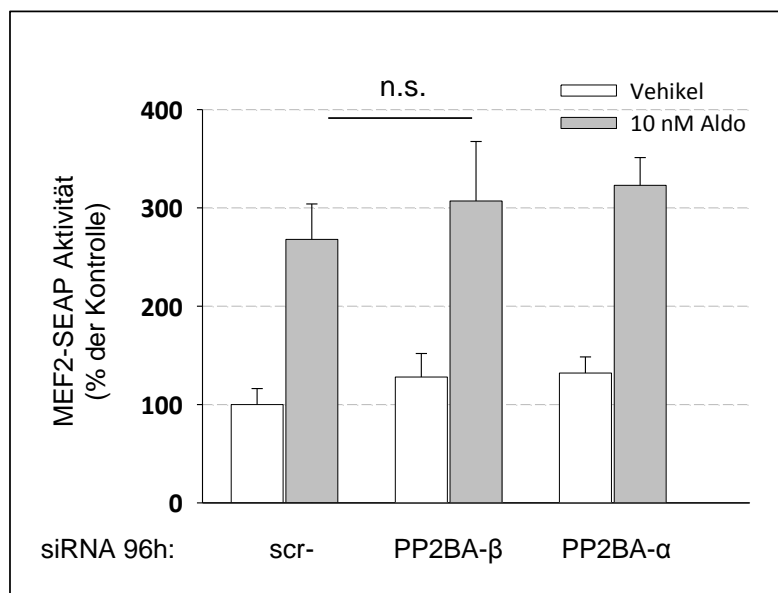


Abb. 3.12: MEF2-Transkriptionsaktivität nach MR-Stimulation und spezifischer Reduktion von PP2BA- α und PP2BA- β durch siRNA

HEK293-Zellen wurden mit eGFP-MR, MEF2-SEAP, lacZ sowie scr-, PP2BA- α bzw. PP2BA- β siRNA (100 nM, 96 h) transfiziert. Nach 24-stündiger Stimulation der Zellen unter Kontrollbedingungen (Vehikel)/Aldosteron (10 nM) wurde die MEF2-Transkriptionsaktivität mittels MEF2-SEAP-Reporter-Gen-Assay bestimmt. N=3; n=9-18; *p<0,05.

3.3.3 Einfluss von Mineralokortikoid-Rezeptor und Calcineurin auf die NFAT-Transkriptionsaktivierung

Eine Anwendung des NFAT-SEAP-Reporter-Gen-Assays sollte klären, ob der aktivierte MR in der Lage ist, die NFAT-Transkriptionsaktivierung zu beeinflussen. Eine MR-Stimulation induzierte eine signifikante Erhöhung der NFAT-Transkriptionsaktivität im Vergleich zu Kontrollbedingungen (Vehikel) (Abb. 3.13).

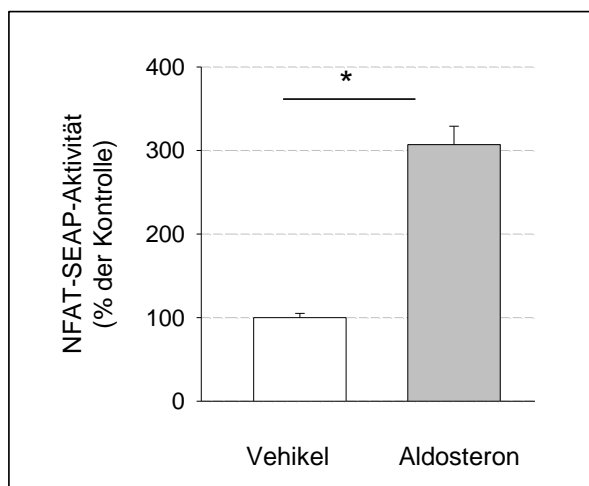


Abb. 3.13: Stimulation der NFAT-Transkriptionsaktivität durch MR-Aktivierung

HEK293-Zellen wurden mit eGFP-MR transfiziert, für 24 h mit Vehikel / Aldosteron (10 nM) stimuliert und NFAT-Transkriptionsaktivität mittels NFAT-SEAP-Reporter-Gen-Assay bestimmt. N=3; n=9; *p<0,05.

Im Gegensatz dazu bewirkte die mit Dexamethason (100 nM) induzierte Stimulation des GRs keine NFAT-Transaktivierungsaktivität (Abb. 3.14). Aus diesen Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass die Aktivierung des MR spezifisch die NFAT-abhängige Transaktivierungsaktivität induziert.

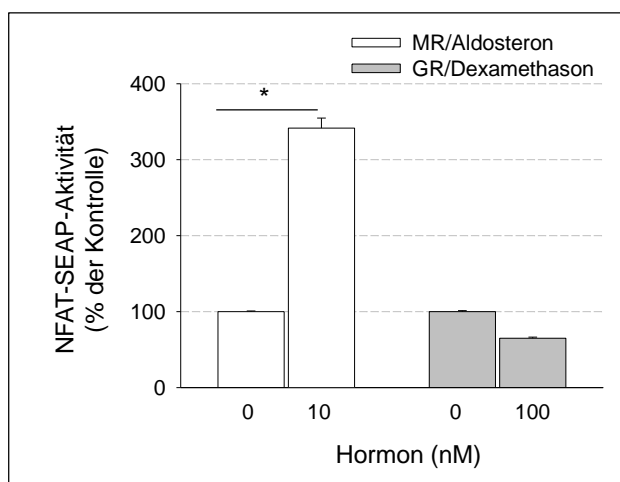
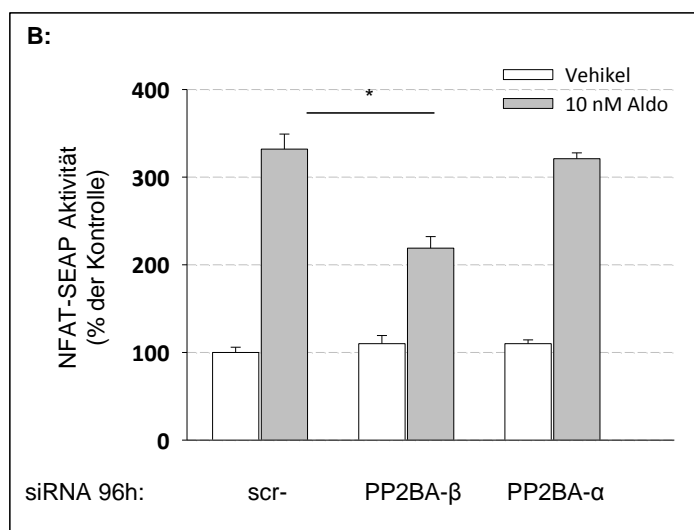


Abb. 3.14: NFAT-Transkriptionsaktivität nach MR- bzw. GR-Stimulation

HEK293-Zellen wurden mit eGFP-MR bzw. eGFP-GR, NFAT-SEAP sowie lacZ transfiziert. Nach 24-stündiger Stimulation mit Vehikel/Aldosteron (10 nM)/Dexamethason (100 nM) wurde die Transkriptionsaktivität mittels NFAT-SEAP-Reporter-Gen-Assay bestimmt. N=2-4; n=3-6; *p<0,05.

Um zu klären, ob eine der beiden katalytischen Calcineurin-Isoformen über eine MR-Stimulation eine NFAT-Transkriptionsaktivierung induziert, wurde ein NFAT-SEAP-Reportergen-Assay (siehe 2.9), unter Herunterregulation von PP2BA- α bzw. PP2BA- β , durchgeführt. Mit scr-siRNA transfizierte Kontrollzellen (100 nM, 96 h) zeigten eine Stimulation der NFAT-Transkriptionsaktivierung bei Aldosteron induzierter MR-Aktivierung an (Abb. 3.13). Die durch Aldosteron induzierte NFAT-Transkriptionsaktivität wurde durch die Herunterregulation von PP2BA- α im Vergleich zu mit scr-siRNA transfizierten Kontrollzellen nicht verändert. Es wurde eine signifikant verminderte NFAT-Transkriptionsaktivität durch Herunterregulation von PP2BA- β , im Vergleich zur Kontrolle (scr-siRNA) um 51% detektiert (Abb. 3.15). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die Transkription NFAT-abhängiger Gene durch MR-Aktivierung Calcineurin- β -abhängig beeinflusst wird.



bestimmt. N=4;n=11-22; *p<0,05.

Abb. 3.15: NFAT-Transkriptionsaktivität nach MR-Stimulation und spezifischer Reduktion von PP2BA- α und PP2BA- β durch siRNA

HEK293-Zellen wurden mit eGFP-MR, NFAT-SEAP, lacZ sowie scr-, PP2BA- α bzw. PP2BA- β siRNA (100 nM, 96 h) transfiziert. Nach 24-stündiger Stimulation der Zellen mit Vehikel/Aldosteron (10 nM) wurde die NFAT-Transkriptionsaktivität mittels NFAT-SEAP-Reportergen-Assay

3.3.4 Mechanistische Analyse der MR-induzierten MEF2- und NFAT-Transkriptionsaktivität

3.3.4.1 Dosis-Wirkungsbeziehung der MR-vermittelten MEF2- und NFAT-Transkriptionsregulation im Vergleich zur klassischen GRE-Aktivierung

Der MR bindet klassisch wie sein naher Verwandter der GR, an das gleiche Hormon-responsive Element, GRE^{29 28}.

Abb. 3.16 zeigt die Dosis-Wirkungsbeziehung von GRE-, MEF2- und NFAT-Transkriptionsaktivität in Abhängigkeit von verschiedenen Aldosteron-Konzentrationen. Eine Aktivierung der GRE-abhängigen Genexpression (GRE-SEAP-Reportergen-Assay) durch den MR findet bereits bei niedrigen Aldosteron-Konzentrationen ($EC_{50} = 0,1 \pm 0,02$ nM) statt. Im Vergleich dazu werden MEF2- sowie NFAT-Signalweg bei deutlich höheren Aldosteron-Konzentrationen aktiviert. Dies ist an den EC_{50} -Werten ersichtlich. Die MEF2- und NFAT-Aktivierungen fallen deutlich geringer aus, als die klassische GRE-SEAP-Transkriptionsaktivität, sichtbar durch eine verminderte maximale Geschwindigkeit (V_{max}) (Abb. 3.16). Das bedeutet, dass die entsprechenden maximalen SEAP-Aktivitäten hier erst bei deutlich höheren Aldosteron-Konzentrationen erreicht werden.

Aus diesen Daten lässt sich ableiten, dass die MR-abhängige Aktivierung der MEF2- sowie NFAT-abhängigen Signalkaskade bei pathophysiologisch erhöhten Aldosteron-Konzentrationen auftreten kann.

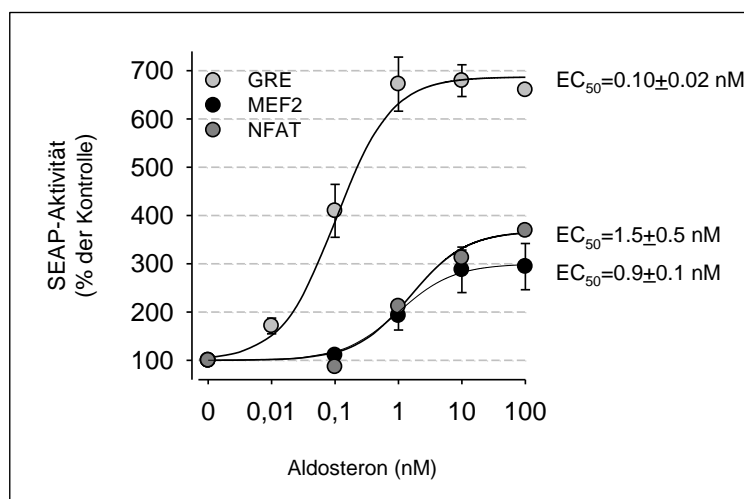


Abb. 3.16: Dosis-Wirkungsbeziehung von GRE-, NFAT- und MEF2-Transkriptionsaktivität in Abhängigkeit verschiedener Aldosteron-Konzentrationen

HEK293-Zellen wurden mit eGFP-MR, GRE-SEAP/MEF2-SEAP oder NFAT-SEAP sowie lacZ transfiziert. Nach 24-stündiger Stimulation mit Aldosteron (0,01-100 nM) wurde die Transkriptionsaktivität mittels

GRE-, MEF2- bzw. NFAT-SEAP-Reportergen-Assay bestimmt. N=2-4; n=6-12; *p<0,05.

3.3.4.2 Einfluss der MR-Domänen auf die MEF2-/NFAT-Transkriptionsaktivität

MEF2- bzw. NFAT-SEAP-Reporter-Gen-Assays wurden unter Verwendung von trunkierten MR-Varianten, denen zum einen N-terminal die A/B-Domäne (MR^{CDEF}) bzw. die A/B- und zusätzlich die DNA-Bindungsdomäne (MR^{DEF}) fehlen, durchgeführt. Fehlen im MR-Protein die Regionen, die für Kofaktor- und DNA-Bindung (MR^{DEF}) wichtig sind, konnte weder eine MEF2- noch eine NFAT-Transkriptionsaktivität detektiert werden (Abb. 3.17). Unter Verwendung der trunkierten MR^{CDEF} Variante konnte eine zum kompletten MR (MR^{ABCDEF}) vergleichbare MEF2-SEAP-Aktivität gemessen werden, die NFAT-SEAP-Aktivität war hingegen reduziert. Die A/B-Domäne des MR ist für die MR-abhängige Aktivierung des NFAT-Reporters von Bedeutung.

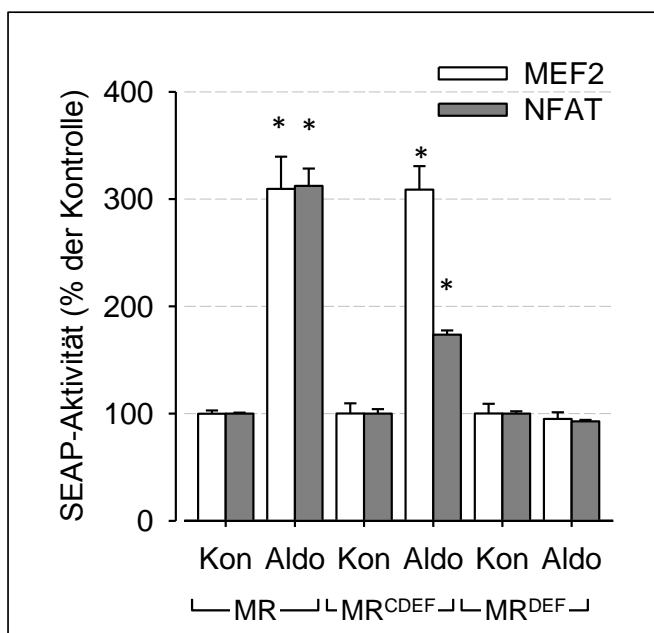


Abb. 3.17: NFAT-/MEF2-SEAP-Transkriptionsaktivität in Abhängigkeit der trunkierten MR-Varianten MR^{DEF} und MR^{CDEF}

HEK293-Zellen wurden mit MEF2-SEAP, NFAT-SEAP und lacZ sowie unterschiedlichen MR-Konstrukten transfiziert: dem kompletten MR (MR^{ABCDEF}), der trunkierten MR-Version (MR^{CDEF}), der die N-terminale A/B-Domäne fehlt sowie der MR-Version, der die A/B- und zusätzlich die DNA-Bindungsdomäne (MR^{DEF}) fehlen. Nach 24-stündiger Stimulation unter Kontrollbedingungen (Kon, DMSO 0,1% (v/v)) bzw. Aldosteron (Aldo, 10 nM) wurde die

Transkriptionsaktivität mittels NFAT- bzw. MEF2-SEAP-Reporter-Gen-Assay bestimmt. N=2-4; n=3-5; *p<0,05.

3.3.4.3 Einfluss von HSP90 auf die MR-induzierte MEF2-/NFAT-Transkriptionsaktivität

MR sowie Calcineurin sind Klientenproteine des Chaperons HSP90^{181,182}. Eine Verwendung des HPS90-Inhibitors Geldanamycin blockiert die Bindung von MR-HPS90 und verhindert die durch den MR hervorgerufene Inhibierung des Forskolin-stimulierten CRE-Signalweges⁷³. Die Verwendung von Geldanamycin (2 μ M) verhinderte ebenfalls eine Stimulation der MEF2- sowie NFAT-Transkriptionsaktivität im Vergleich zur Stimulation des MR mit Aldosteron (Abb. 3.18).

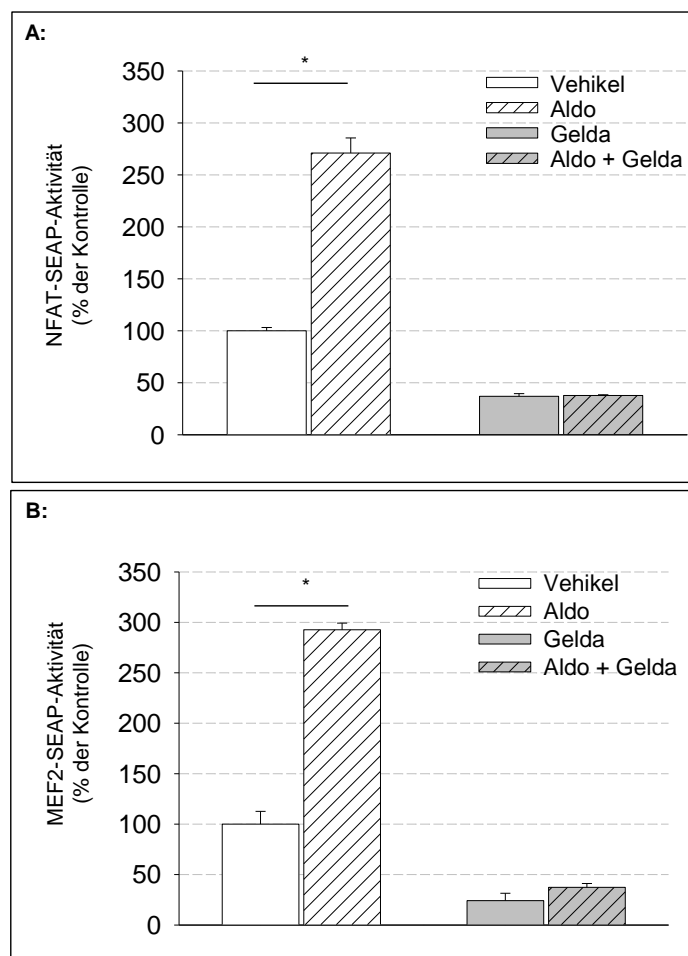


Abb. 3.18: Einfluss des HSP90-Inhibitors Geldanamycin auf die NFAT- bzw. MEF2-Transkriptionsaktivität

HEK293-Zellen wurden mit eGFP-MR, NFAT-SEAP (A) oder MEF2-SEAP (B) sowie lacZ transfiziert. Nach 24-stündiger Stimulation unter Kontrollbedingungen (Vehikel bzw. Aldosteron (10 nM, Aldo) \pm Geldanamycin (2 μ M, Gelda) wurde die Transkriptionsaktivität mittels NFAT- bzw. MEF2-SEAP-Reporter-Gen-Assay bestimmt. N=2-5; n=3-6; *p<0,05.

3.4 Analyse der MR-PP2B Interaktion

Für einen Nachweis einer möglichen Interaktion von MR und Calcineurin wurden HEK293-Zellen untersucht, die nicht transfiziert, mit eGFP (Negativkontrolle) bzw. eGFP-MR transfiziert und anschließend für 2 h mit Vehikel (Kontrollbedingungen) oder Aldosteron (10 nM) stimuliert wurden. Anschließend erfolgte eine Isolation des eGFP/eGFP-MR durch einen monoklonalen anti eGFP-Antikörper, der an sogenannte MACS Micro Beads gekoppelt ist (siehe 2.10). Dieser Antikörper erkennt und bindet spezifisch eGFP-gekoppelte Proteine eines Zelllysates und ermöglicht die Isolierung des im Lysat vorhandenen eGFP-MR mitsamt seiner Interaktionspartner (Co-Präzipitate, Eluat). Anschließend wurden eGFP bzw. die an eGFP-MR gekoppelten Proteine mittels Westernblot nachgewiesen (siehe 2.7.6) (Abb. 3.19). Abb. 3.19 A und 3.19 B zeigen die Spezifität des an die MACS Micro Beads gekoppelten monoklonalen anti eGFP-Antikörpers. eGFP, als auch an eGFP gekoppelte Proteine (eGFP-MR), können eluiert werden und anschließend im Eluat durch Verwendung des anti eGFP-Antikörpers mittels Westernblot nachgewiesen werden (Tab. 2.11). Kontrolllysate (mock, Vehikel) zeigten keine unspezifischen Co-Präzipitationen (Abb. 3.19).

Für alle in dieser Arbeit durchgeführten Co-Immunopräzipitationen diente ein Vergleich von eGFP mit eGFP-MR transfizierten Zellen zur Überprüfung auf mögliche unspezifische Präzipitationen durch den anti-eGFP-Antikörper.

Eine Anreicherung des MR mit PP2BA- β in unstimulierten eGFP-MR transfizierten Zellen konnte durch Verwendung des anti-Pan- α Antikörpers verifiziert werden (Abb. 3.20 A, Spur 3-4). Mittels anti-Pan- α Antikörpers wurde auch eine schwache PP2BA- β Bande in mit eGFP transfizierten Kontrollzellen detektiert, was auf eine schwache nicht spezifische Immunopräzipitation hinweist (Abb. 3.20 A und B). Aus diesem Grund ist ein Vergleich zwischen eGFP und eGFP-MR transfizierten Lysaten notwendig, um eine MR-abhängige Co-Immunopräzipitation festzustellen.

Für die Generierung unabhängiger Daten wurde für den Westernblot in Abb. 3.20 C ein PP2BA Antikörper der Firma AbDSerotec (Tab. 2.10) verwendet und eine Anreicherung des eGFP-MR mit PP2BA- β (Abb. 3.20 A, Spur 3, 4) bestätigt, jedoch keine Interaktion mit PP2BA- α im Vergleich zur mit eGFP transfizierten Kontrolle (Abb. 3.20 A, B, C).

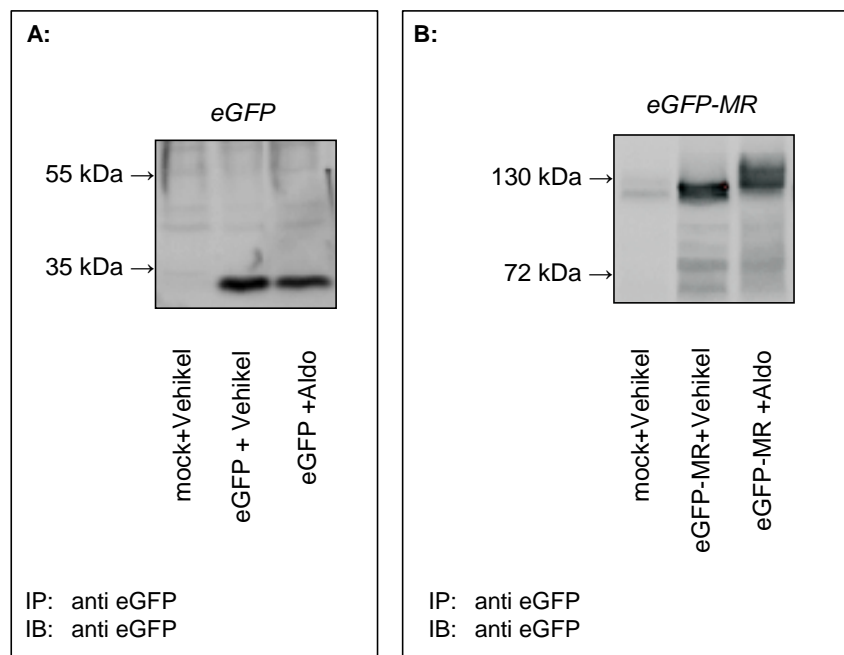


Abb. 3.19: Nachweis der Spezifität des in der Co-Immunopräzipitation verwendeten monoklonalen anti eGFP-Antikörpers

Untransfizierte (mock), mit eGFP (Negativkontrolle) bzw. eGFP-MR transfizierte HEK293-Zellen wurden unter Kontrollbedingungen (Vehikel, 0,1% DMSO) bzw. mit Aldosteron (10 nM) für 2 h stimuliert. Die Isolation von eGFP und eGFP-MR aus Zelllysaten erfolgte mittels anti eGFP-Antikörpers (Immunopräzipitation, IP). eGFP bzw. eGFP-MR wurden mittels Westernblot (IB, Immunoblot) unter Verwendung des anti eGFP-Antikörpers (Santa Cruz) detektiert.

Eine Interaktion von MR und PP2BA- β konnte unter Kontrollbedingungen (Vehikel) und Stimulation (Aldosteron) in eGFP-MR Eluaten nachgewiesen werden und ist HSP90-abhängig (Abb. 3.20 B, Spur 3,4 und Abb. 3.20 C). Die MR-PP2BA- β Interaktion ist HSP90-vermittelt, da durch Inkubation der HEK293-Zellen mit dem HSP90 Inhibitors Geldanamycin keine MR-PP2BA- β Interaktion im Eluat mehr detektiert werden konnte (Abb. 3.20 C).

Abb. 3.19 B und Abb. 3.22 A (Spur 3) zeigen ein diffuses MR-Proteinsignal in mit Aldosteron behandelten Zellen, wahrscheinlich hervorgerufen durch posttranslationale Modifizierungen des aktivierten MR. Aus diesem Grund sieht man eine Verschiebung der Lauffront des Proteins im Vergleich zur mit Vehikel behandelten Probe. Für den MR sind verschiedene potentielle posttranslationale Modifizierungen (PTM) wie z. B. Phosphorylierung, Acetylierung, SUMOylierung und Ubiquitinylierung beschrieben ²³.

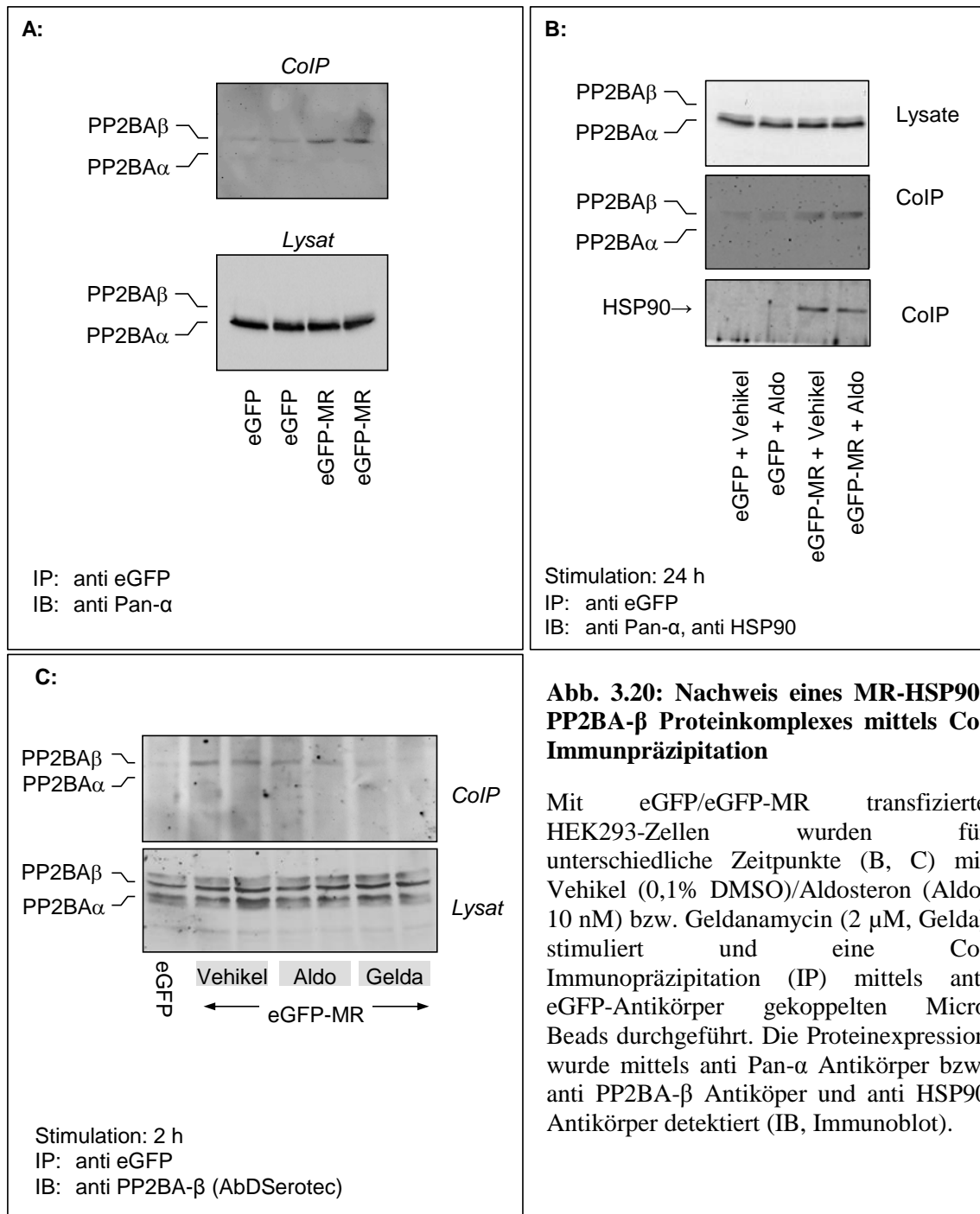


Abb. 3.20: Nachweis eines MR-HSP90-PP2BA- β Proteinkomplexes mittels Co-Immunpräzipitation

Mit eGFP/eGFP-MR transfizierte HEK293-Zellen wurden für unterschiedliche Zeitpunkte (B, C) mit Vehikel (0,1% DMSO)/Aldosteron (Aldo, 10 nM) bzw. Geldanamycin (2 μ M, Gelda) stimuliert und eine Co-Immunopräzipitation (IP) mittels anti eGFP-Antikörper gekoppelten Micro Beads durchgeführt. Die Proteinexpression wurde mittels anti Pan- α Antikörper bzw. anti PP2BA- β Antikörper und anti HSP90 Antikörper detektiert (IB, Immunoblot).

Zusätzlich konnte ebenfalls eine MR-HSP90 Interaktion durch Co-Immunopräzipitation nachgewiesen werden (Abb. 3.21). Die Inkubation der HEK293-Zellen mit Geldanamycin führte ebenfalls zu einer stark reduzierten MR-HSP90 Interaktion, die nicht durch eine MR-Degradation verursacht wurde (Abb.3.21 B).

Aus diesen Daten lässt sich ableiten, dass eine HSP90-vermittelte MR-PP2BA- β Interaktion existiert, unabhängig vom Aktivierungszustand des MR.

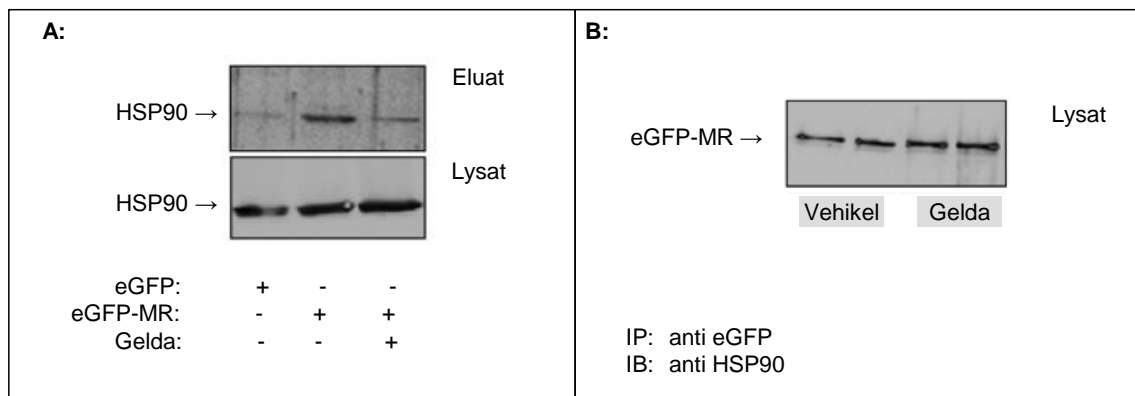


Abb. 3.21: Nachweis einer HSP90-sensitiven Co-Immunopräzipitation von eGFP-MR mittels Geldanamycin

Mit eGFP/eGFP-MR transfizierte HEK293-Zellen wurden für 2 h unter Kontrollbedingungen (Vehikel, 0,1% DMSO)/ Geldanamycin (Gelda, 2 μ M) stimuliert und eine Co-Immunopräzipitation mittels anti-eGFP-Antikörper gekoppelten Micro Beads durchgeführt. **A)** Die Analyse der MR-HSP90 Interaktion erfolgte nach Immunopräzipitation des eGFP-MR mittels des anti-HSP90 Antikörpers im Eluat. **B)** Analyse der MR-Expression nach Kontroll- bzw. Geldanamycin-Behandlung durch anti eGFP-Antikörper.

3.5 Analyse des Mineralokortikoid-Rezeptor Einflusses auf die subzelluläre Lokalisation des Calcineurins

Ohne seinen Liganden ist der MR im Zytosol der Zellen lokalisiert und wird durch einen Heterokomplex bestehend aus HSP90/HSP70/p23 und verschiedener Immunophilinen (IMMs) stabilisiert und vor Degradation geschützt³³. Eine MR-Stimulation führt zu einer Translokation des Rezeptors mit seinen Interaktionspartnern in den Zellkern, wo er an Hormon-responsive Elemente (z. B.: GRE) der DNA bindet und die Expression verschiedener Genen beeinflusst^{33,46,65,67,68}.

Aus diesen Gründen sollte geklärt werden, ob eine HSP90-abhängige MR-PP2BA- β Interaktion unabhängig vom Aktivierungszustand des MR besteht. Außerdem sollte analysiert werden, ob PP2BA nach Aktivierung des MR⁷³ sowohl im Zytosol wirken kann (NFAT-Dephosphorylierung und NFAT-Aktivierung) als auch durch Umverteilung in den Zellkern die Aktivität weiterer Transkriptionsfaktoren wie MEF2 und CREB beeinflusst. Um diese Fragestellungen zu klären, wurde die Umverteilung des Calcineurins nach MR-Aktivierung durch das Verhältnis des PP2BA- β Gehaltes von Zytosol zu Zellkernfraktion bestimmt (3.5.1) sowie durch Immunfluoreszenz (3.5.2) untersucht.

3.5.1 Analyse von Zellkern- und Zytosolfraction

MR-RFP transfizierte HEK293-Zellen wurden mit DMSO (Kontrollbedingungen), Aldosteron (10nM) bzw. Geldanamycin (2 μ M) für 2 h stimuliert und im Anschluss die Zellkern- bzw. Zytosol-Fraktion mittels Active Motif Kit isoliert (siehe 2.7.2) und die Konzentration der Proteinlysate mittels Bradford-Assay bestimmt (siehe 2.7.3.2). Die Proteinexpression von MR, PP2BA- α , PP2BA- β , HSP90 und β -Actin wurden mittels Westernblot (siehe 2.7.5) bestimmt.

Eine MR-Aktivierung mit Aldosteron (10 nM, 2 h) induzierte eine Translokation des Rezeptors vom Zytosol in den Zellkern (Abb. 3.22 A, Spur 1-4). Die PP2BA- α Expression in der Zellkern- sowie Zytosol-Fraktion wurde durch MR-Aktivierung nicht verändert (Abb. 3.22 A, Spur 1-4). Durch MR-Stimulation konnte eine erhöhte PP2BA- β Proteinexpression im Zellkern im Vergleich zur zytosolischen Fraktion sowie im Vergleich zu Kontrollbedingungen verifiziert werden (Abb. 3.22 A, Spur 1-4). HSP90 konnte im Zytosol, als auch in geringerer Konzentration im Zellkern detektiert werden. Der Einfluss des HSP90 Inhibitors Geldanamycin (2 μ M) auf die Proteinverteilung von

MR, PP2BA- α und PP2BA- β ist in Abb. 3.22 A, Spur 5-8, dargestellt. Geldanamycin bewirkt eine Dissoziation des HSP90 vom MR im Zytosol, wodurch auch die MR-PP2BA- β Interaktion verschlechtert wird (Abb. 3.22 A, Spur 5-8). Der MR transloziert deutlich schlechter unter Geldanamycin in den Zellkern (Abb. 3.22 A, Spur 7-8). PP2BA β liegt nach Geldanamycin-Behandlung vornehmlich zytosolisch vor. Geldanamycin verhindert den PP2BA- β Import in den Zellkern auch während MR-Aktivierung durch Aldosteron. β -Actin diene als Beladungskontrolle (Abb. 3.22 A).

Eine Quantifizierung der subzellulären Lokalisation von MR, PP2BA- α und PP2BA- β in der Zelle in Abhängigkeit von unterschiedlichen Stimuli (Kontrollbedingungen (Vehikel)/Aldosteron (10 nM, Aldo)/ \pm Geldanamycin (2 μ M)) von vier voneinander unabhängigen Versuchen ist in Abb. 3.22 B und C dargestellt. Eine MR-Stimulation führte zu einer signifikanten Umverteilung des Rezeptors aus dem Zytosol in den Zellkern um \sim 48%. Dabei änderte sich auch die subzelluläre Lokalisation der katalytischen PP2BA- β Isoform des Calcineurins, jedoch nicht die der PP2BA- α Isoform. Rund 45% des PP2BA- β war nach MR-Stimulation vermehrt im Zellkern lokalisiert. Eine solche Umverteilung von PP2BA- β und MR konnte nach Stimulation der Zellen mit dem HSP90 Inhibitor Geldanamycin nicht mehr beobachtet werden.

Aus diesen Ergebnissen lässt sich ableiten, dass Aldosteron eine Kerntranslokation von MR und PP2BA- β induziert. Die Verwendung des HSP90-Inhibitors Geldanamycin verhindert die subzelluläre Umverteilung des MR sowie der PP2BA- β Isoform des Calcineurin vom Zytosol in den Zellkern. Eine Umverteilung des PP2BA- α findet nicht statt. Diese Daten unterstützen die HSP90-abhängige MR-PP2BA- β Interaktion.

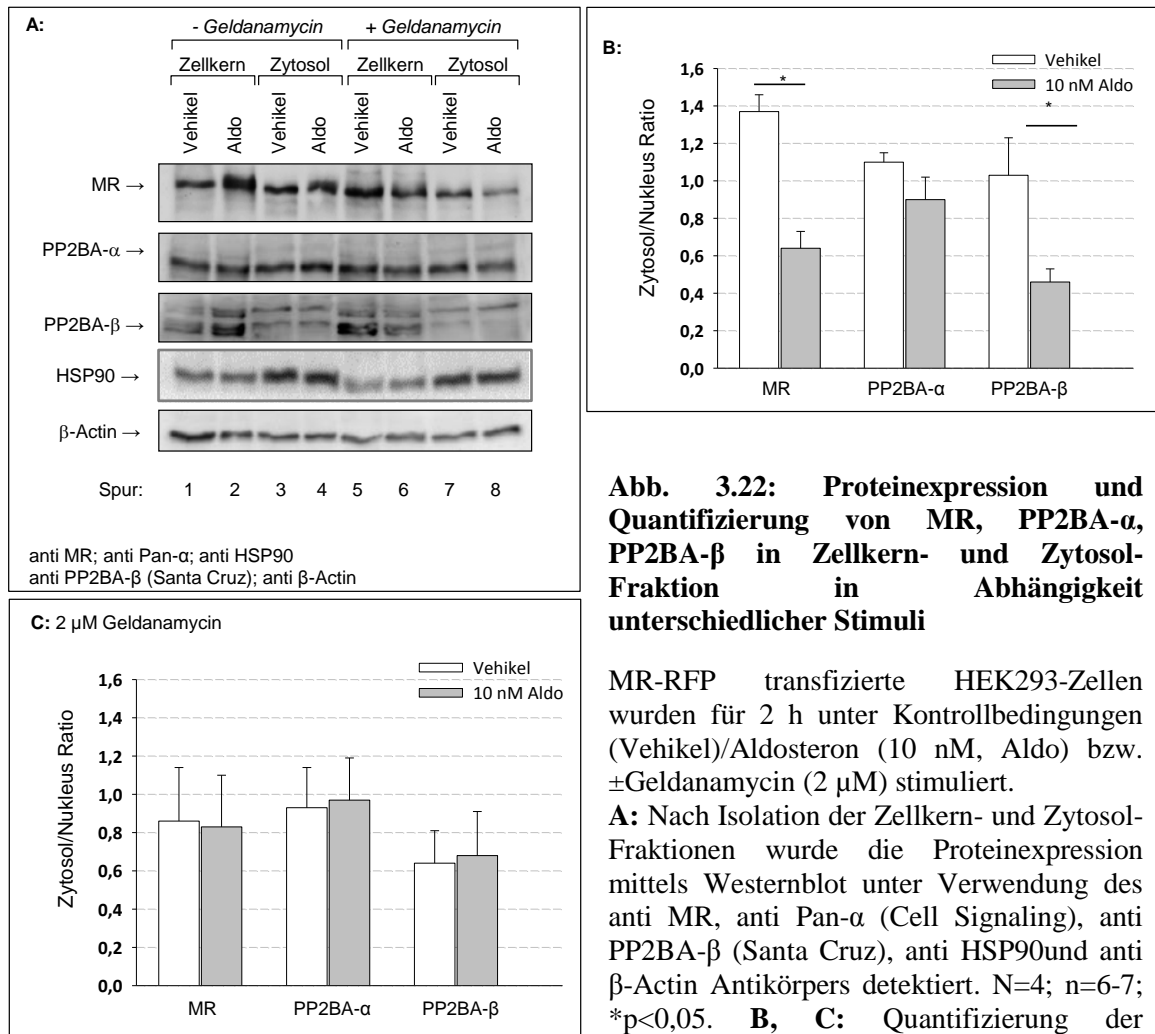


Abb. 3.22: Proteinexpression und Quantifizierung von MR, PP2BA- α , PP2BA- β in Zellkern- und Zytosol-Fraktion in Abhängigkeit unterschiedlicher Stimuli

MR-RFP transfizierte HEK293-Zellen wurden für 2 h unter Kontrollbedingungen (Vehikel)/Aldosteron (10 nM, Aldo) bzw. \pm Geldanamycin (2 μ M) stimuliert.

A: Nach Isolation der Zellkern- und Zytosol-Fractionen wurde die Proteinexpression mittels Westernblot unter Verwendung des anti MR, anti Pan- α (Cell Signaling), anti PP2BA- β (Santa Cruz), anti HSP90 und anti β -Actin Antikörpers detektiert. N=4; n=6-7; * $p < 0,05$. **B, C:** Quantifizierung der subzellulären Lokalisation von MR, PP2BA-

α und PP2BA- β in HEK293-Zellen. Dargestellt ist die Zytosol/Nukleus-Ratio.

3.5.2 Immunfluoreszenz

Die Immunfluoreszenz-Analyse wurde verwendet um die subzelluläre Lokalisation des MR und PP2Bs mittels einer zweiten differentiellen Methode nachzuweisen (siehe 2.10). MR-RFP/RFP transfizierte HEK293-Zellen wurden unter serumfreien Bedingungen für 2 h unter den angegebenen Bedingungen stimuliert (Kontrollbedingungen (0,1 % DMSO) bzw. Aldosteron (10 nM)) und anschließend fixiert. PP2BA wurde mittels des Primär-Antikörpers Pan- α (Abb. 3.23)/ PP2BA- β (Abb. 3.25) sowie eines grün fluoreszierenden Sekundär-Antikörpers angefärbt. Der MR hingegen leuchtete rot durch seine Fluoreszenzmarkierung. Die Zellkerne wurden zur genauen Bestimmung der Translokation von MR und PP2BA mit DAPI angefärbt.

Die Lokalisation von PP2BA wurde in Abhängigkeit von der MR-Aktivierung bestimmt. In fünf voneinander unabhängigen Versuchen wurden unter Verwendung des Pan- α Antikörpers verschiedene Wells des Objektträgers fotografiert. Unter Kontrollbedingungen wurden insgesamt 611 und nach Aldosteron-Stimulation 1578 mit MR-RFP transfizierte Zellen auf die Lokalisation des PP2BAs untersucht und ausgezählt.

Der rotfluoreszierende MR (MR-RFP) ist unter Kontrollbedingungen (Vehikel) im Zytosol lokalisiert (rot), ebenso die Phosphatase Calcineurin (grün) (Abb. 3.23). Eine MR-Stimulation (10 nM Aldosteron) MR transfizierter Zellen bewirkte einen signifikant erhöhten im Zellkern lokalisierten Anteil des PP2BA (~37%) (Abb. 3.23). Dies entspricht dem Ergebnis der PP2BA vermittelten Umverteilung nach MR-Aktivierung, nachgewiesen durch den Pan- α Antikörper, dargestellt in Abb. 3.23 und 3.24 und zeigt, dass es sich bei der umverteilten Calcineurin-Isoform um PP2BA- β handelt.

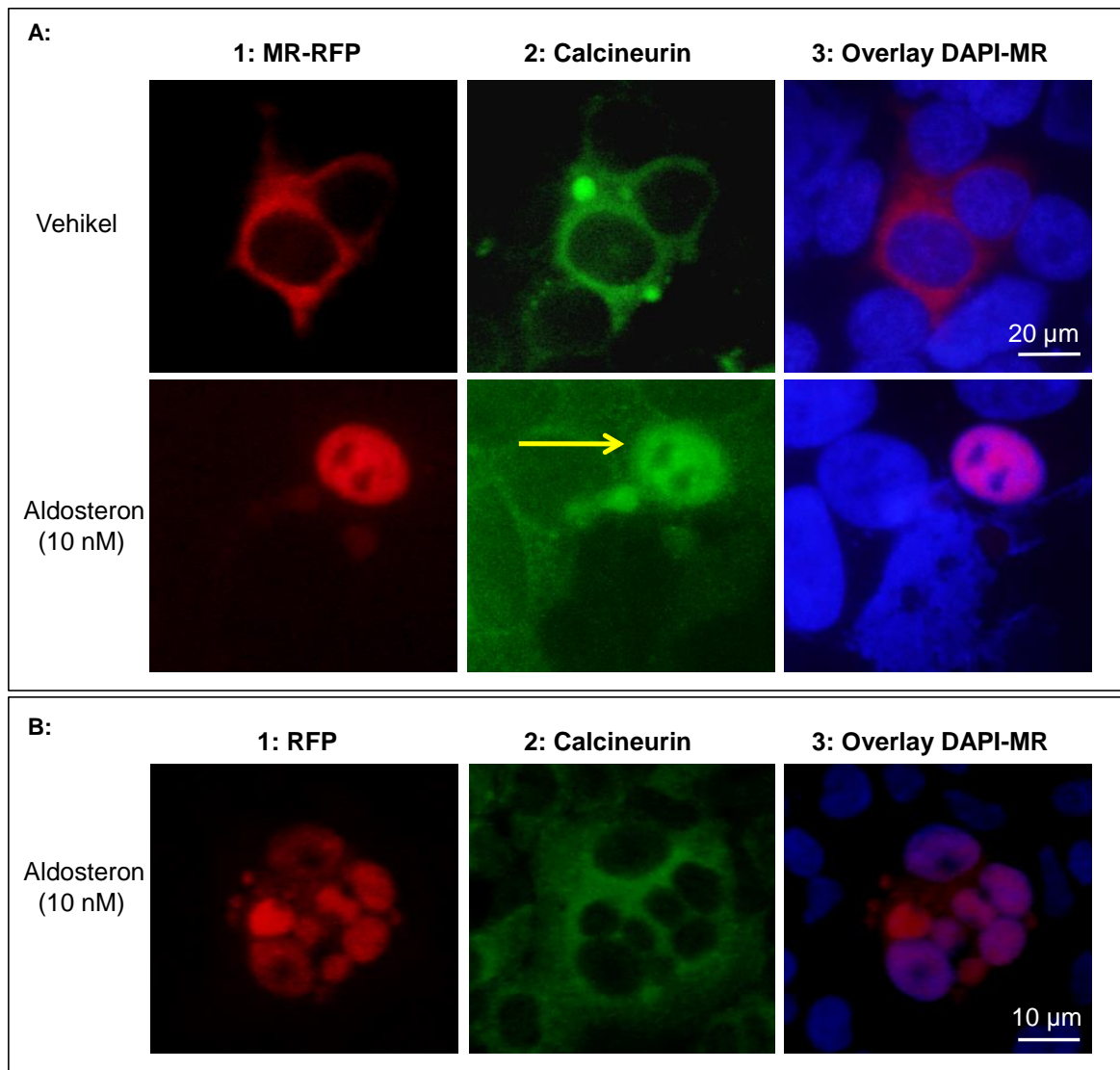


Abb. 3.23: Nachweis der Lokalisation von PP2BA nach MR-Aktivierung mittels Immunfluoreszenz

HEK293-Zellen wurden mit MR-RFP (**A**) oder RFP (**B**) transfiziert, für 2 h unter Kontrollbedingungen (Vehikel) bzw. mit Aldosteron (10nM) stimuliert. Anschließend wurden die Zellen auf dem Objektträger fixiert und PP2BA mittels Primär-Antikörper (anti Pan- α) und Sekundär-Antikörper (anti Oregon-Green; **B**: grün) sowie die Zellkerne (DAPI, blau) angefärbt. **1:** Lokalisation des MR (rot). **2:** Lokalisation von PP2BA (grün) **3:** Overlay von MR (rot) und Zellkernen (blau). Ein Zellausschnitt von 20 μm (**A**) bzw. 10 μm (**B**) ist gezeigt. **A:** N=5; n=611-1578 Zellen; *p< 0,05 (Chi²-Test). **B:** RFP: N=2; n=157-174; *p< 0,05 (Chi²-Test).

In MR-RFP transfizierten Zellen konnte unter Kontrollbedingungen (Vehikel, 0,1%) eine Lokalisation von Calcineurin im Zellkern von 7-8% ermittelt werden und entspricht der Verteilung von mit RFP transfizierten Kontrollzellen (RFP, Vehikel) (Abb. 3.24).

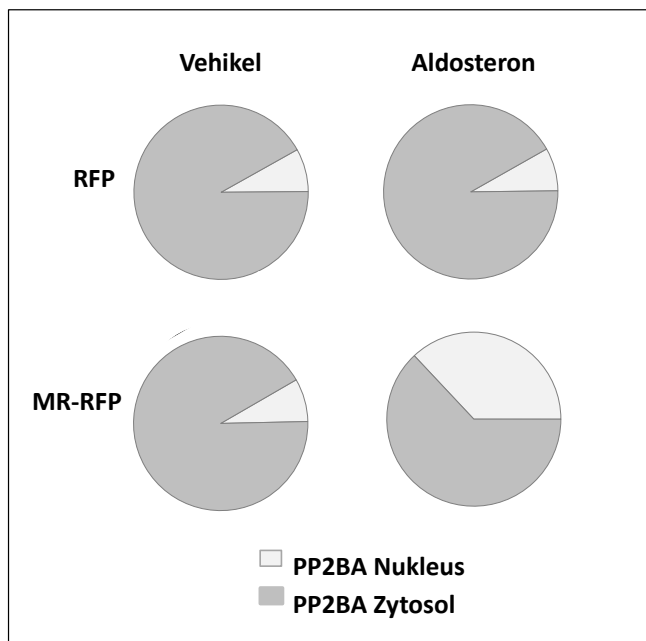


Abb. 3.24: Quantifizierung der Lokalisation von PP2BA nach MR-Aktivierung in RFP und MR-RFP transfizierten HEK293-Zellen

Auswertung der Zytosol/Nukleus-Verteilung von RFP (Kontrolle) und MR-RFP in HEK293-Zellen in Abhängigkeit der MR-Stimulation mit Vehikel bzw. Aldosteron (10 nM). (RFP: N=2; n=157-174; *p<0,05; MR-RFP: N=5; n=611-1578 Zellen; *p<0,05; Chi²-Test).

Um genauer zwischen den beiden PP2BA Isoformen, PP2BA- α und PP2BA- β , differenzieren zu können, wurde anschließend die subzelluläre Lokalisation von PP2BA- β in Abhängigkeit von der MR-Aktivierung untersucht. Die katalytische β -Isoform des Calcineurins wurde durch Verwendung des PP2BA- β Antikörpers (Santa Cruz Biotechnology und Alexa Fluor 488, Tab 2.14) in zwei voneinander unabhängigen Versuchen angefärbt, verschiedene Wells des Objektträgers fotografiert und insgesamt jeweils 102-237 Zellen ausgezählt.

Der rotfluoreszierende MR (MR-RFP) ist unter Kontrollbedingungen (Vehikel, 0,1 % DMSO) im Zytosol lokalisiert (rot), ebenso die Phosphatase Calcineurin (grün). Eine MR-Aktivierung (Aldosteron, 10 nM) erhöht signifikant den im Zellkern lokalisierten Anteil der katalytischen Calcineurin-Isoform PP2BA- β um ~ 37% (Abb. 3.25). Dies entspricht dem Ergebnis der PP2BA vermittelten Umverteilung nach MR-Aktivierung, nachgewiesen durch den Pan- α Antikörper, dargestellt in Abb. 3.23 und 3.24. Dies zeigt, dass es sich bei der umverteilten Calcineurin-Isoform um PP2BA- β handelt.

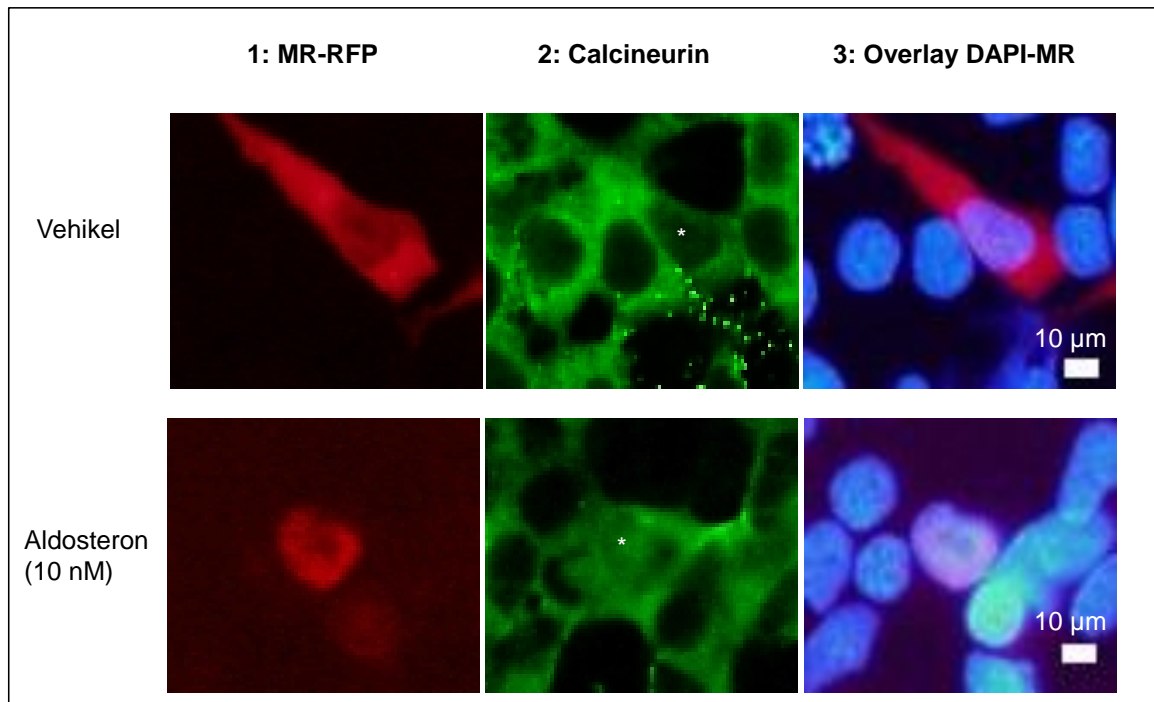


Abb. 3.25: Nachweis der Lokalisation von PP2BA- β nach MR-Aktivierung mittels Immunfluoreszenz

HEK293-Zellen wurden mit 0,25 μg MR-RFP transfiziert, für 2 h unter Kontrollbedingungen (Vehikel) bzw. mit Aldosteron (10nM) stimuliert. Anschließend wurden die Zellen auf dem Objektträger fixiert und PP2BA- β mittels Primär-Antikörper (anti PP2BA- β , Santa Cruz) und Sekundär-Antikörper (anti Alexa Fluor 488) (B: grün) angefärbt. Die Zellkerne wurden mittels DAPI gefärbt (blau). **A:** Lokalisation des MR (rot). **B:** Lokalisation von PP2BA- β (grün) **C:** Overlay von MR (rot) und Zellkernen (blau). Ein Zellausschnitt von 10 μm ist gezeigt. MR-RFP: N=2; n=102-237 Zellen; * $p < 0,05$ (Chi^2 -Test).

3.6 Einfluss der Mineralokortikoid-Rezeptor induzierten PP2BA-abhängigen Genexpression

Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, ob der MR Calcineurin-abhängig die mRNA Expression des proinflammatorischen Gens eNOS (endotheliale NO-Synthase), ein NFAT-abhängiges Gen, das vier NFAT-Bindestellen besitzt, beeinflusst¹⁸³. Die Abhängigkeit der eNOS mRNA-Expression von der MR-Aktivierung sowie von PP2BA- β wurde untersucht (Abb. 3.26). Da nach 6-stündiger MR-Stimulation eine erhöhte Calcineurin-Aktivität detektiert wurde⁷³, erfolgte eine Stimulation von mit eGFP-MR transfizierten HEK293-Zellen unter Kontrollbedingungen (Vehikel) bzw. mit Aldosteron (10 nM) für 6 h. Eine signifikant erhöhte eNOS mRNA-Expression (um ~40%) konnte nach MR-Aktivierung verifiziert werden. Dieser Effekt ist nicht zu beobachten, wenn PP2BA- β mittels siRNA (100 nM, 96h) in den Zellen herunterreguliert wird (Abb. 3.26).

Aus diesen Daten lässt sich ableiten, dass die MR-Aktivierung PP2BA- β -abhängig das eNOS mRNA-Expressionslevel erhöht.

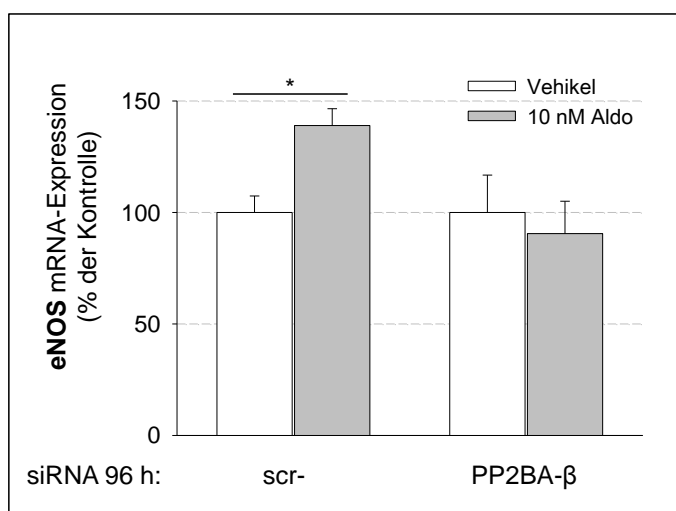


Abb. 3.26: eNOS mRNA-Expressionslevel 96 h nach siRNA-Transfektion

Mit eGFP-MR transfizierte HEK293-Zellen wurden für 6 h unter Kontrollbedingungen (Vehikel) bzw. mit Aldosteron (10 nM) stimuliert. Die mRNA-Expression wurde mittels qRT-PCR quantifiziert N=3, n=6-8; *p<0,05.

3.7 Rolle endogener Inhibitoren des Calcineurin

Eine MR-Stimulation führt zu einer erhöhten Calcineurin-Aktivität, ohne die Expression der beiden Calcineurin-Isoformen, PP2BA- α und PP2BA- β , zu beeinflussen⁷³. Außerdem treten die Aldosteron/MR/PP2B Effekte auf die CREB-/NFAT-Signalkaskade Calcium-unabhängig auf.

Eine Möglichkeit die Aktivität des Calcineurins zu regulieren, ist eine Veränderung der Expression endogener Calcineurin Inhibitoren, wie CAIN oder RCAN1^{105 152 111}. CAIN und RCAN1 können direkt an Calcineurin binden und so dessen Aktivität inhibieren.

Aus diesem Grund wurde die mRNA-Expression von CAIN und RCAN1 in Abhängigkeit von MR-Stimulation in HEK293-Zellen analysiert. Die Zellen wurden für 6 h mit Vehikel (Vehikel) bzw. Aldosteron (10 nM) inkubiert. Abb. 3.27 zeigt eine leichte Abnahme der CAIN mRNA Expression um ~30% nach MR-Aktivierung, wohingegen die RCAN1 mRNA Expression durch MR-Aktivierung nicht beeinflusst wurde (Abb. 3.27). Folglich führt eine MR-Aktivierung zu einer veränderten Expression endogener PP2BA-Inhibitoren, wodurch eventuell die erhöhte PP2BA-Aktivität erklärbar ist.

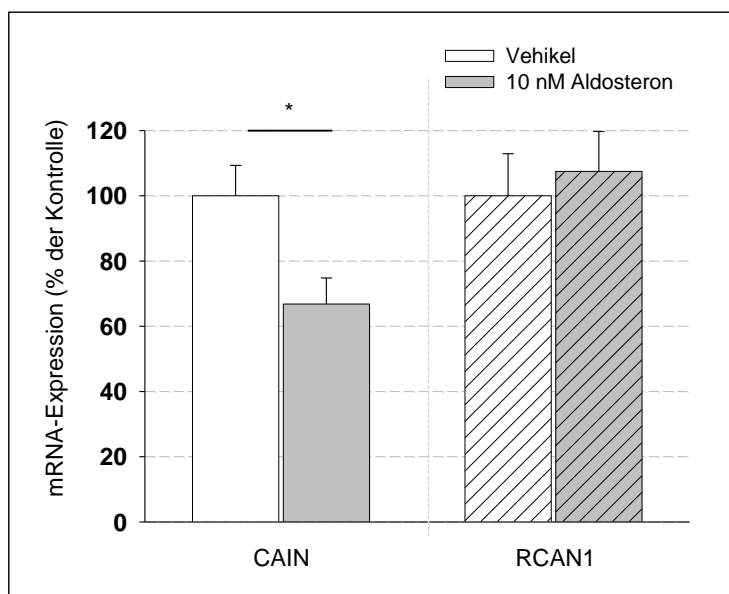


Abb. 3.27: CAIN und RCAN1 mRNA-Expression nach MR-Stimulation

Mit eGFP-MR transfizierte HEK293-Zellen wurden für 6 h unter Kontrollbedingungen (Vehikel) bzw. mit Aldosteron (10 nM) stimuliert. Die mRNA-Expression wurde mittels qRT-PCR quantifiziert. CAIN: N=3; n=8; *p<0,05. RCAN1: N=3; n=7-8; *p<0,05.

Zusammenfassung der Ergebnisse:

- 1. Die ubiquitär exprimierten katalytischen Calcineurin-Isoformen, PP2BA- α und PP2BA- β , wurden unabhängig voneinander auf mRNA- sowie Proteinexpressionsniveau in HEK293-Zellen mittels spezifischer siRNA um ~ 60 % herunterreguliert.*
- 2. Eine durch den aktivierten MR hervorgerufene Inhibierung der durch Forskolin stimulierten CRE-Transkriptionsaktivierung wird über die katalytische PP2BA- β -Isoform vermittelt.*
- 3. Eine MR-Aktivierung induziert die MEF2-abhängige Genexpression. Dieser MR-Effekt wird weder über PP2BA- α noch PP2BA- β vermittelt.*
- 4. Die NFAT-Transkriptionsaktivierung wird durch MR-Stimulation PP2BA- β -abhängig beeinflusst.*
- 5. Die MEF2- sowie NFAT-SEAP-Reportergen-Aktivierung wird spezifisch durch den MR, nicht aber über den GR, reguliert.*
- 6. HSP90 spielt eine wichtige Rolle bei der NFAT- und MEF2-Transkriptionsaktivierung.*
- 7. Es existiert eine HSP90-vermittelte MR-PP2BA- β -Interaktion, unabhängig vom Aktivierungszustand des MR.*
- 8. Nach MR-Aktivierung findet eine HSP90-abhängige Umverteilung von MR und PP2BA- β in den Zellkern statt.*
- 9. Eine MR-Aktivierung führt zu einer veränderten Expression des endogenen Calcineurin-Inhibitors CAIN sowie zu einer PP2BA- β -abhängigen Erhöhung der eNOS mRNA-Expression.*

4. Diskussion

Verschiedene Tier- sowie Patientenstudien zeigen, dass der MR und Aldosteron an der Entstehung von Erkrankungen des renokardiovaskulären Systems beteiligt sind^{2,6,52,58-61,64,74,77,184-186}. In nicht-epithelialen Geweben induziert der MR pathophysiologische Veränderungen, die sich durch endotheliale Dysfunktion, Fibrose und Veränderungen an Gefäßen (Gefäßentzündung, Gefäß-Remodeling) äußern und zu sekundären Endorganschäden wie Herz- und Niereninsuffizienz führen^{6,7}. Die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen dieser Veränderungen sind unbekannt. Bekannt ist, dass die Wirkung von Steroidhormonrezeptoren wie Östrogen-Rezeptor (ER), Progesteron-Rezeptor (PR) und Glukokortikoid-Rezeptor (GR) nicht über einen einfachen An- und Ausschaltmechanismus ablaufen, sondern über komplexe nicht-genotrope Wechselwirkungen mit anderen Signalkaskaden in der Zelle¹⁸⁷⁻¹⁸⁹.

Der MR beeinflusst verschiedene Komponenten zytosolischer Signalkaskaden z. B: Ca^{2+} - oder cAMP-Konzentrationen oder die Aktivität von Protein-Kinasen und extrazellulär regulierter Kinasen^{2,46,65,67,68}. Hinweise, die eine putative pathophysiologische Relevanz zwischen PP2B, CREB und MR vermuten lassen, basieren auf pharmakologischen Nachweisen. Die schädliche Wirkung des MR konnte durch Cyclosporin A (CyP-CsA) oder Takrolimus (FKBP12-FK506) in zwei unabhängigen *in vivo* Studien deutlich vermindert werden^{87,88}.

Die durch Aldosteron/MR hervorgerufene Konzentrations-abhängige Inhibierung der CRE-SEAP-Transkriptionsaktivierung, die auch in OK- und VSMC-Zellen beobachtet wurde, konnte nicht durch den mittels Dexamethason aktivierten GR verifiziert werden, wodurch hiermit ein MR-spezifischer Effekt gefunden wurde.

Ein mögliches Zusammenspiel von MR, PP2B und cAMP/CREB-Signalkaskade wurde durch Grossmann et. al analysiert⁷³. Eine durch den aktivierten MR induzierte Dephosphorylierung des Transkriptionsfaktors CREB und daraus resultierende Inhibierung der cAMP/CREB-Signalkaskade in HEK293-Zellen wird durch eine erhöhte PP2B-Aktivität vermittelt und durch die Verwendung von Cyclosporin A (CyP-CsA) und Geldanamycin aufgehoben, nicht aber durch Okadainsäure. Okadainsäure hemmt spezifisch, schon bei sehr geringen Konzentrationen, die Phosphoprotein-Phosphatasen PP1 und PP2A^{105,190}. Somit kann geschlussfolgert werden, dass eine Dephosphorylierung von CREB nach MR-Stimulation spezifisch durch Calcineurin, nicht aber durch PP1 oder PP2A, hervorgerufen wird.

In Vorversuchen zu dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine MR-Aktivierung einen hemmenden Einfluss auf die cAMP/CREB-Signalkaskade durch eine Zunahme der PP2B-Aktivität vermittelt⁷³. Taigen et al. zeigten einen Zusammenhang zwischen einer erhöhten PP2B-Aktivität, verbunden mit erhöhten PP2BA- β mRNA- sowie Proteinexpression durch hypertrophe Stimuli in neonatalen Rattenkardiomyocyten¹⁶¹. Aus diesem Grund wurde im Rahmen dieser Arbeit überprüft, ob die Zunahme der PP2B-Enzymaktivität nach MR-Stimulation möglicherweise durch eine erhöhte Expression einer der beiden katalytischen Isoformen, PP2BA- α - oder PP2BA- β , hervorgerufen werden könnte. Eine Überprüfung der Proteinexpression von PP2BA- α - oder PP2BA- β mittels Westernblot vor und nach Aldosteron-Stimulation zeigte, dass eine Inhibierung der cAMP/CREB-Signalkaskade nach MR-Stimulation durch eine reine Zunahme der PP2B-Aktivität und nicht durch eine veränderte PP2BA- α - oder PP2BA- β -Proteinexpression vermittelt wird (Abb. 3.1).

Verschiedene Studien zeigen, dass der MR mit zytosolischen Signalkaskaden in Wechselwirkung tritt. Dabei werden über veränderte Calcium-Konzentrationen oder veränderte Aktivitäten von Proteinkinasen (PKA, PKC, PKD) andere Transkriptionsfaktoren beeinflusst^{46,65,67,68}. In Vorversuchen zu dieser Arbeiten konnte nachgewiesen werden, dass die PP2B-Aktivitätssteigerung nicht mit einer veränderten intrazellulären Ca^{2+} oder cAMP-Konzentration korreliert⁷³. Des Weiteren konnte durch Verwendung spezifischer Inhibitoren eine Aktivierung von p38 oder der extrazellulär regulierten Kinase (ERK) sowie eine Beteiligung der Proteinkinase C (PKC) an der MR-induzierten Inhibierung der durch Forskolin stimulierten cAMP/CREB-Signalkaskade ausgeschlossen werden⁷³.

4.1 Rolle von endogenen Calcineurin-Inhibitoren

Neben der klassischen Aktivierung von PP2B durch Calcium⁹⁷, kann die Phosphatase-Aktivität *in vivo* auch durch verschiedene PP2B-Bindungsproteine, sogenannte endogene PP2B-Inhibitoren wie CAIN oder RCAN1, die die PP2B-Aktivität in der Zelle auf unterschiedliche Weise regulieren, gesteuert werden^{105,111,152}. Während CAIN inhibierend durch direkte Bindung an den C-terminus des Calcineurins wirkt, ist die RCAN1-Konzentration ausschlaggebend für eine Inhibierung oder Aktivierung von PP2B^{105,111,152} 154.

Um zu klären, ob der stimulierte MR einen Einfluss auf die mRNA-Expression der endogenen Inhibitoren wie CAIN und RCAN1 hat, wurde deren mRNA-Expressionsniveau vor und nach Aldosteron-Stimulation bestimmt (Abb. 3.27). Aldosteron/MR bewirkten eine Abnahme der CAIN mRNA-Expression um ~30%, wohingegen die RCAN1 mRNA-Expression unbeeinflusst blieb. Die veränderte CAIN mRNA-Expression in der Zelle nach MR-Stimulation (Abb. 3.27) erklärt nicht die durch den MR hervorgerufene PP2BA- β Umverteilung in den Zellkern (Abb. 3.23 - Abb. 3.25). CAIN könnte aber möglicherweise einen Beitrag zur zytosolischen MR-induzierten PP2BA- β -Aktivität durch Aufhebung der Inhibierung leisten. Aus diesem Grund sollte in weiterführenden Experimenten überprüft werden, ob durch MR-Aktivierung auch eine Abnahme des CAIN Protein-Expressionsniveaus nachgewiesen werden kann und somit über CAIN ein möglicher Mechanismus für die Zunahme der PP2B-Aktivität nach MR-Stimulation beschrieben werden könnte.

Eine weitere Möglichkeit PP2B zu aktivieren, wäre über eine gezielte proteolytische Spaltung von PP2B durch die Cysteinprotease Calpain möglich¹⁹¹. Calpain entfernt gezielt das autoinhibitorische Peptid (AID) von CnA, wodurch PP2B aktiviert wird¹⁹¹. Gegen eine PP2B-Spaltung durch Calpain, hervorgerufen durch Aldosteron/MR spricht jedoch, dass anhand von Protein-Expressionsanalysen keine veränderten Proteingrößen durch mögliche Spaltung von PP2B durch Calpain sowie keine zusätzlichen Proteinbanden im Gel von PP2BA- α oder PP2BA- β nach MR-Aktivierung mit Aldosteron im Vergleich zu Kontrollbedingungen detektiert wurden. Aus diesem Grund wurde eine mögliche Aktivierung von PP2B durch Calpain im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter untersucht.

4.2 Analyse der nicht-genotropen MR-induzierten Wechselwirkung über Calcineurin auf verschiedene zytosolische Signalkaskaden

Mittels Durchführung verschiedener SEAP-Reportergen-Assays (CRE-, MEF2-, NFAT-SEAP) bei gleichzeitiger PP2BA- α - bzw. PP2BA- β -Reduktion wurde der Einfluss des mit pathophysiologischer Aldosteron-Konzentration (10 nM) aktivierten MR auf die (i) CRE-, (ii) MEF2- und (iii) NFAT-Transkriptionsaktivität untersucht, um aufzuklären über welche PP2BA-Isoform (PP2BA- α oder PP2BA β) die spezifischen MR-Effekte vermittelt werden.

(i) Wechselwirkung von Mineralokortikoid-Rezeptors/Calcineurin mit der cAMP/CREB-Signalkaskade

Eine durch den aktivierten MR hervorgerufene Inhibierung der durch Forskolin stimulierten CRE-Transkriptionsaktivierung wird über PP2BA- β , nicht über PP2BA- α , vermittelt (Abb. 3.8 B). Obwohl das funktionale Proteinlevel von PP2BA- β in den Zellen nicht vollständig reduziert werden konnte (Abb. 3.7 B), wurde eine deutliche Verminderung der Inhibierung der CRE-Transkriptionsaktivierung (~60%) detektiert (Abb. 3.8 B). Die Inhibierung der CRE-abhängigen Genexpression nach MR-Stimulation wird durch eine vermehrte CREB-Dephosphorylierung vermittelt⁷³. Dies hat negative Auswirkungen auf das natürliche Redox-Gleichgewicht der Zellen. Die Expression des Enzyms Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6PD) wird über den cAMP/CREB-Signalweg reguliert^{73,74}. G6PD leistet einen wichtigen Beitrag für die Aufrechterhaltung des intrazellulären Redox-Zustandes der Zellen, da sie aus Glukose-6-Phosphat, NADP⁺ (Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat) und Wasser im ersten und geschwindigkeitsbestimmenden Schritt des Pentose-Phosphatweges das Reduktionsäquivalent NADPH bildet¹⁹². Erhöhte intrazelluläre Konzentrationen von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) werden durch reduziertes Glutathions (GSH), welches mittels Glutathion-Peroxidase in oxidiertes Glutathion (GSSG) umgewandelt wird, abgefangen. Für die Regenerierung des reduzierten GSH aus GSSG benötigt das Enzym Glutathion-Reduktase NADPH¹⁹². GSH ist ein wichtiges Antioxidans des Stoffwechsels, welches bei erhöhtem oxidativem Stress die Zellen vor Schäden durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS), wie Wasserstoffperoxid, schützt¹⁹². Eine Abnahme des NADPH-Levels führt zu erhöhten ROS-Konzentrationen in Gefäßen und zu einer Abnahme der im Endothel verfügbaren Stickstoffmonoxid (NO)-Konzentration, wodurch Gefäßentzündungen entstehen⁷⁴. Eine MR-Blockade mit Spironolaktone verhindert die Aldosteron-induzierte Vaskulopathie und führt zu einem verbesserten Gefäßreaktionsvermögen^{74,192-194}. Tian et al. beschrieben einen Zusammenhang zwischen reduzierter G6PD-Expression mit einem verminderten NADPH-Level in Fibroblasten aus G6PD-defizienten Patienten mit einer erhöhten Anfälligkeit für einen durch H₂O₂ hervorgerufenen Zelltod.^{194,195} Grossmann et al. zeigten in glatten Gefäßmuskelzellen (VSMC), dass der stimulierte MR über eine reduzierte G6PD mRNA-Expression sowie eine reduzierte G6PD-Aktivität in der Lage ist sein pathophysiologisches Potential zu vermitteln⁷³. Der Einsatz von Cyclosporin A (CyP-CsA) verhinderte eine Abnahme der G6PD mRNA-Expression⁷³, wodurch

wiederum ein Zusammenspiel des MR mit PP2BA- β bekräftigt wird (Abb. 5.1). Dieses Zusammenspiel führt letztendlich zu kardiovaskulären Erkrankungen aufgrund eines verringerten Schutzes der Zellen vor reaktiven Sauerstoffspezies.

Wechselwirkung von Mineralokortikoid-Rezeptors/Calcineurin mit (ii) NFAT- und (iii) MEF2-Signalkaskade

PP2B beeinflusst nicht nur die Regulation des Transkriptionsfaktors CREB und somit die CRE-abhängigen Genexpression, sondern auch andere Transkriptionsfaktoren wie NFAT und MEF2^{76,77,93,97}.

(ii) Hypertrophe Stimuli wie AngII und Phenylephrin führen über eine Aktivierung von PP2B/NFAT zur Stimulation der Expression von Genen der Hypertrophie-Antwort und somit zur Entstehung von kardialer Hypertrophie. *In vivo* führte eine konstitutive Expression von PP2B und NFAT im Mäuseherzen zu einer massiven Herzhypertrophie, die durch Blockade von PP2B mittels Cyclosporin A (CyP-CsA) und Takrolimus (FKBP12-FK506) inhibiert werden konnte⁸⁶.

PP2B/NFAT sind beteiligt an Gefäß-Remodeling, Gefäß-Proliferation und Gefäß-Alterung sowie an der Hochregulation von inflammatorischen Regulatoren wie RANTES oder Osteopontin⁸¹⁻⁸⁵. Diese charakteristischen Merkmale werden auch bei der MR-induzierten Vaskulopathie beobachtet⁷³. Aus diesem Grund wurden im Rahmen dieser Arbeit ein mögliches Zusammenspiel von MR und PP2B auf die NFAT-abhängige Transkriptionsaktivierung untersucht.

Es konnte eine Stimulation der NFAT-abhängigen Genexpression nach MR-Aktivierung detektiert werden (Abb. 3.13). Diese MR-abhängige Induktion des NFAT-SEAP-Reporters wird über PP2BA- β reguliert (Abb. 3.15), da eine Reduktion von PP2BA- β um ~60% eine signifikante Abnahme der MR-induzierten NFAT-Transkriptionsaktivität um ~51% bewirkte. Eine PP2BA- α Reduktion hatte keinen Einfluss auf die MR-induzierte NFAT-Transkriptionsaktivierung (Abb. 3.15). Im Gegensatz dazu bewirkte die mit Dexamethason (100 nM) induzierte Stimulation des GR keine NFAT-Transkriptionsaktivierung (Abb. 3.14).

Aus diesen Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass über den MR, nicht aber über den GR, eine Aktivierung der NFAT-abhängigen Transkription induziert wird.

Eine MR-Stimulation durch Aldosteron führt über eine Aktivitätssteigerung von PP2BA- β zu einer NFAT-Transkriptionsaktivierung und weist auf einen möglichen

Mechanismus hin wie der MR seine pathophysiologischen MR-Effekte vermitteln kann. Aus diesem Grund wurde anschließend der Einfluss der MR-induzierten PP2BA-abhängigen Genexpression untersucht.

Analyse des Einflusses der MR-induzierten PP2BA-abhängigen Genexpression

Die pathophysiologische Relevanz der Wechselwirkung des aktivierten MR über PP2BA- β mit der NFAT-Signalkaskade im Organismus sollte durch Überprüfen der Expression des NFAT-abhängigen proinflammatorischen Gens eNOS erfolgen ¹⁸³. Abb. 3.26 zeigt eine durch den aktivierten MR hervorgerufene PP2BA- β abhängige Erhöhung der eNOS mRNA-Expression um ~40% nach 6-stündiger MR-Stimulation.

Ritter et al. zeigten eine erhöhte, durch einen hypertrophen Stimulus (AngII) hervorgerufene eNOS-Expression in Kardiomyocyten vermittelt durch PP2B/NFAT nach Angiotensin II-Rezeptor-Aktivierung und verifizierten vier NFAT-Bindestellen im eNOS-Promotor durch EMSA (*electrophoretic mobility shift assay*)-Analysen ¹⁸³.

Im Organismus wird eNOS konstitutiv im Endothel von Blut- und Lymphgefäßen exprimiert ¹⁹². eNOS regeneriert aus L-Arginin durch Reduktion von Sauerstoff das gasförmige, freie Radikal NO (Stickoxid) und L-Citrullin. Für die Funktionalität der eNOS spielen die Kofaktoren NADPH, regeneriert durch die G6PD sowie Tetrahydrobiopterin (BH₄), NADPH-abhängig regeneriert durch Tetrahydrofolat-Reduktase, eine entscheidende Bedeutung ^{194,195}.

Unter physiologischen Bedingungen wirkt das durch die eNOS gebildete NO Gefäß schützend, da es leicht in glatte Gefäßmuskelzellen diffundiert und dort als Vasodilatator, durch Stimulation der löslichen Guanylatzyklase, die durch Bildung von cGMP die Proteinkinase G (PKG) aktiviert, eine Relaxation der Gefäße bewirkt ¹⁹⁶. Die pathophysiologische Relevanz von NO konnte durch verschlechterte endotheliale Vasorelaxation, assoziiert mit oxidativen Gefäßschäden bei Arteriosklerose und Hypercholesterinämie, beobachtet werden ^{197,198}. Erhöhter oxidativer Stress für Zellen entsteht bei erhöhter Superoxid-Bildung unter NADPH-Mangelbedingungen bei geringer NO-Verfügbarkeit sowie durch Peroxinitrit-Anion (ONOO⁻), einem sehr reaktiven Sauerstoffradikal, welches bei unphysiologisch hohen Konzentrationen von Superoxid und NO entsteht ^{74,192,199,200}. Peroxinitrit fördert die Entkopplung der eNOS und somit das Entstehen von kardiovaskulären Krankheiten ²⁰¹. Leopold et al. detektierten eine Verschiebung des Gleichgewichtes vom aktivem eNOS-Dimer zum inaktivem eNOS-Monomer (entkoppelte eNOS) mit zunehmender

Aldosteron-Konzentration⁷⁴. Eine Reduktion der NO-Bildung durch entkoppelte eNOS wird z. B. unter NADPH-Mangelbedingungen bei reduzierter G6PD-Expression hervorgerufen und führt zu kardiovaskulären Erkrankungen durch vermehrte Superoxid-Produktion^{74,192,199}. Dies könnte darauf hindeuten, dass der MR über eine PP2BA- β -Aktivierung und daraus resultierende Abnahme der G6PD-Expression einen NADPH-Mangel erzeugt, der wiederum zur Verschiebung des Gleichgewichtes hin zur entkoppelten eNOS führt. Ob die erhöhte eNOS mRNA-Expression nach MR-Stimulation über PP2BA- β (Abb. 3.26) mit einer vermehrt entkoppelten eNOS unter Bildung von Superoxiden unter reduzierter NO-Bildung einhergeht, muss durch weiterführende Experimente geklärt werden. In zukünftigen Experimenten könnte in Endothelzellen durch (i) Messung des Umsatzes von L-Arginin in L-Citrullin die eNOS-Aktivität in Abhängigkeit von der MR-Stimulation mit Aldosteron und unter Herunterregulation von PP2BA- β mittels PP2BA- β siRNA überprüft werden^{74,202}. Zusätzlich könnte über (ii) Westernblot-Analysen durch Verwendung von entsprechenden Antikörpern, die zwischen dem aktiven funktionalen eNOS-Dimer und dem inaktivem Monomer der entkoppelten eNOS differenzieren können, aufgeklärt werden, inwieweit eine MR-Stimulation über PP2BA- β die eNOS-Funktionalität und deren Beitrag auf die ROS-Akkumulation beeinflusst. Eine möglicherweise erhöhte ROS-Akkumulation könnte durch (iii) Quantifizierung des oxidativen Stresses durch DCF (6-Carboxy-2'-7'-Dichlorodihydrofluorescein)-Fluoreszenz-Messungen ermittelt werden⁷⁴. Anhand der dabei ermittelten Daten könnten Rückschlüsse auf die funktionale oder pathophysiologische Relevanz von MR/PP2B auf die eNOS-Expression für den Organismus gezogen werden.

Im Rahmen der kardiovaskulären Pathophysiologie rücken PP2B/NFAT immer stärker in den Fokus der Forschung. Gefäßveränderungen wie Proliferation, Remodeling und Alterung sowie die Hochregulation von inflammatorischen Genen wie RANTES oder Osteopontin sind in der Literatur beschrieben^{77,79,80 81-85}. Ob solche Veränderungen auch durch Aldosteron/MR/PP2BA- β /NFAT-Aktivierung hervorgerufen werden, muss in weiterführenden Experimenten geklärt werden. Entzündungsmarker wie Osteopontin, RANTES oder COX2 besitzen wie eNOS potentielle NFAT-Konsensussequenzen im Promotor^{84,203,204}. Durch Analyse der mRNA-Expression nach MR-Aktivierung unter Verwendung von PP2BA- β siRNA könnte klären, ob diese Entzündungsmarker verändert exprimiert und möglicherweise durch MR/PP2BA- β hochreguliert werden. Neben diesen Entzündungsmarkern könnten auch Gene analysiert werden, die

charakteristisch bei kardialer Hypertrophie im Körper verändert exprimiert werden z. B. ANF (*atrial natriuretic factor*), β -MHC (β -*myosin heavy chain*) und Skelett- α -Actin. Bueno et al. verifizierten eine erhöhte ANF-, β -MHC- und Skelett- α -Actin-Expression in Kardiomyocyten nach 14-tägiger hypertropher AngII-Stimulation¹⁶².

(iii) Im Zellkern führt eine Dephosphorylierung des Transkriptionsfaktors MEF2 durch PP2B^{94,142} zu einer Aktivierung MEF2-abhängiger Gene in verschiedenen embryonalen und adulten Geweben, v.a. Muskeln und Hirn^{148,149}.

Eine Stimulation des MR durch Aldosteron zeigte eine signifikante Stimulation der MEF2-abhängigen Genexpression (Abb. 3.10). Im Gegensatz dazu bewirkte die mit Dexamethason (100 nM) induzierte Stimulation des GRs, dem nächsten Verwandten des MR, keine MEF2-Transkriptionsaktivierung (Abb. 3.11). Somit konnte gezeigt werden, dass die Induktion der MEF2-Transkriptionsaktivierung MR-spezifisch verläuft. Dies korreliert mit der Inhibierung der Forskolin-stimulierten CRE-SEAP-Transkriptionsaktivierung, die nur für Aldosteron/MR, nicht aber für Dexamethason/GR, verifiziert werden konnte⁷³.

In einem weiteren Schritt wurde überprüft, ob die MR/Aldosteron-induzierte MEF2-Transkriptionsaktivierung PP2B-abhängig vermittelt wird, da in der Literatur drei Mechanismen für die Regulation der MEF2-Aktivität, unter anderem in Wechselwirkung mit NFAT, beschrieben wurden (siehe 1.5.4.3)¹⁴⁰. Neben der Regulation von physiologischen Prozessen in der Zelle gibt es auch Hinweise auf eine Beteiligung von MEF2, u.a. unter Beteiligung von NFAT an Stressantworten, Remodeling-Programmen und der Entstehung kardialer Schäden^{140,150,205}.

Zhang et al. zeigten eine Aufhebung der MEF2-Repression durch Histondeacetylasen (HDAC) nach Stressstimulation, wodurch eine Reprogrammierung der kardialen Genexpression induziert wird, die letztendlich zu einer eingeschränkten Herzfunktion führt¹⁵⁰. MEF2 wurde als Ziel der Ca^{2+} /CaM-abhängigen Kinase IV (CaMKIV) identifiziert. CaMKIV wird durch PP2B/NFAT3 aktiviert und induziert die kardiale Hypertrophie²⁰⁵.

Für den Nachweis einer möglichen PP2B-abhängigen Regulation MEF2-abhängiger Gene nach MR-Stimulation wurde die MEF2-SEAP-Transkriptionsaktivierung unter Herunterregulation von PP2BA- α bzw. PP2BA- β gemessen (Abb. 3.12). Hierbei konnte keine Beteiligung von PP2B an der Regulation der MEF2-abhängigen Genexpression durch Reduktion von PP2BA- α bzw. PP2BA- β nachgewiesen werden (Abb. 3.12).

Daraus lässt sich schlussfolgern, dass durch den aktivierten MR eine Zunahme der MEF2-Expression stattfindet, die nicht über PP2B reguliert wird (Abb. 5.1).

In zukünftigen Experimenten sollte aufgeklärt werden, ob der MR möglicherweise über MAPK-Signalwege eine Erhöhung der MEF2-Expression hervorruft, da in der Literatur eine Stimulation von MEF2 durch p38 sowie durch die extrazellulär regulierte Proteinkinase 5 (ERK5) beschrieben ist¹⁴⁰. Ob MEF2 durch p38 oder ERK5 aktiviert wird, hängt davon ab, an welcher Stelle MEF2 durch diese Kinasen phosphoryliert wird. ERK5 phosphoryliert MEF2 in der MADS-Domäne, p38 hingegen phosphoryliert MEF2 in der transkriptionalen Aktivierungsdomäne. Die Phosphorylierung und Aktivierung von MEF2 durch p38 steht im Zusammenhang mit der Entstehung von kardialer Hypertrophie durch Reprogrammierung der kardialen Genexpression¹⁴⁰.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine PP2BA- β abhängige über den MR stimulierte Regulation der Transkription CRE- sowie NFAT-abhängiger Gene, nicht aber die MEF2-abhängiger Gene, nachgewiesen werden.

Mechanistische Analyse der MR-induzierten MEF2- und NFAT-Transkriptionsaktivität

I) MR sowie sein nächster Verwandter der GR binden klassisch an das gleiche Hormon-responsive Element GRE und aktivieren beide die GRE-abhängige Genexpression^{28,29,206}. In Abb. 3.16 ist die Dosis-Wirkungsbeziehung von GRE-, MEF2- und NFAT-Transkriptionsaktivität in Abhängigkeit verschiedener Aldosteron-Konzentrationen dargestellt. Beim GRE-SEAP-Reportergen-Assay wurde eine maximale GRE-SEAP-Aktivität von ~700% gemessen. Davon leitet sich die mittlere effektive Konzentration (EC_{50}) bei halbmaximaler Geschwindigkeit ($1/2 V_{max}$) ab, die bei einer Aldosteron-Konzentration von $0,1 \pm 0,02$ nM liegt (Abb. 3.16). Im Gegensatz dazu sind die maximalen NFAT- bzw. MEF2-SEAP-Aktivitäten deutlich geringer (NFAT: ~380%; MEF2: 300%) und auch der Anstieg verläuft deutlich flacher, wodurch sowohl die maximalen SEAP-Aktivitäten, als auch die EC_{50} -Werte von MEF2- und NFAT-Aktivierungen bei deutlich höheren Aldosteron-Konzentrationen erreicht werden ($EC_{50 \text{ MEF2}} = 0,9 \pm 0,1$ nM Aldosteron; $EC_{50 \text{ NFAT}} = 1,5 \pm 0,5$ nM Aldosteron; Abb. 3.16).

Die klassische Aktivierung des MR erfolgt bei physiologischen Aldosteron-Konzentrationen von $EC_{50} = 0,1$ nM²⁰⁷. Dieser Wert korreliert mit dem

EC₅₀-Wert für die Aktivierung der GRE-abhängigen Genexpression (Abb. 3.16). Die schädliche Wirkung des MR wird durch zusätzliche Aktivierung bei höheren Aldosteron Konzentrationen hervorgerufen. Eine inadäquate Aktivierung des MR im kardiovaskulären System führt primär zur Vaskulopathien, sekundär führen diese Gefäßschädigungen zu Endorganschäden wie z. B: renale und kardiale Dysfunktion (kardiale Hypertrophie)^{2,6,52,64,74,77,184–186}. Aus den in dieser Arbeit ermittelten mittleren effektiven Aldosteron-Konzentrationen für die MEF2- und NFAT-Transkriptionsaktivierungen lässt sich ableiten, dass die MR-abhängige Aktivierung der MEF2- sowie NFAT-abhängigen Signalkaskade bei pathophysiologisch erhöhten Aldosteron-Konzentrationen auftreten kann.

II) HSP90, ein hochkonserviertes und essentielles Protein, wird in allen eukaryotischen Zellen exprimiert. Es sind bis zu 100 Proteine bekannt, die über HSP90 reguliert werden²⁰⁸. Neben der Regulation der Proteinfaltung und Proteindegradation, Signaltransduktion und Chaperone-Funktion, spielt HSP90 auch eine wichtige Rolle in Steroidhormonrezeptor-HSP90-Heterokomplexen^{209–212}.

Der Einfluss von HSP90 auf die MR-induzierte MEF2-/NFAT-Transkriptionsaktivität sollte genauer analysiert werden, da MR sowie Calcineurin als Klientenproteine des Chaperone HSP90 bekannt sind.^{181,182} Geldanamycin, ein HSP90-Inhibitor, blockiert die Bindung von MR und HSP90 und verhindert die Inhibierung des Forskolin-stimulierten CRE-Signalweges⁷³. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Geldanamycin eine Stimulation der MEF2- sowie NFAT-Transkriptionsaktivität, im Vergleich zur Stimulation des MR mit Aldosteron, verhinderte (Abb. 3.18).

Grossmann et al. zeigten, dass die Bindung von HSP90 an den MR entscheidend zu dessen Funktionalität beiträgt⁴³. Someren et al. verifizierten eine erhöhte durch HSP90/HSP70 hervorgerufene CaM-abhängige und CaM-unabhängige PP2B-Aktivierung durch Aldosteron¹⁸¹. Abb. 3.18 zeigt eine Stimulation der NFAT- bzw. MEF2-Transkription durch Aldosteron, die bei gleichzeitiger Stimulation mit Geldanamycin verhindert wurde. Dies korreliert mit Daten von Grossmann et al., die zeigen, dass Geldanamycin sowie Cyclosporin A (CyP-CsA) die inhibitorische Wirkung von Aldosteron/MR auf die Forskolin-stimulierte CRE-SEAP-Transkriptionsaktivität über PP2B verhindern⁷³.

III) Um Aufzuklären, welche MR-Domäne für die MEF2- bzw. NFAT-Transaktivierung verantwortlich ist, wurden Reporter-gen-Assays mit trunkierten MR-Varianten durchgeführt (Abb. 3.17).

(i) Unter Verwendung des MR^{DEF} (keine A/B-Domäne und DNA-Bindungsdomäne) konnte weder eine MEF2- noch eine NFAT-Transkriptionsaktivität detektiert werden (Abb. 3.17). Der MR besitzt verschiedene Kernlokalisierungssignale (NLS0, NLS1, NLS2), wodurch der unidirektionale Kernimport des MR gesteuert wird²⁴. Das im N-Terminus lokalisierte NLS0 kontrolliert primär hormon-unabhängig den Kernimport. NLS1, das in der DNA-Bindungsdomäne lokalisiert ist, wirkt zusammen mit NLS0 und NLS2 beim Agonist-stimulierten MR-Kernimport²⁴. Fehlen NLS0 und NLS1 (MR^{DEF}) wurde im Rahmen dieser Arbeit, weder eine MEF2- noch NFAT-Transkriptionsaktivierung gemessen (Abb. 3.17). Des Weiteren binden im Bereich der AF-1 (*activation function-1*)-Domäne (Abb. 1.1.) der A/B-Domäne des MR verschiedene Koaktivatoren, die entscheidend zur Transkriptionsaktivität beitragen²³.

(ii) Für die trunkierte MR^{CDEF} Variante wurde eine zum kompletten MR (MR^{ABCDEF}) vergleichbare MEF2-SEAP-Aktivierung gemessen, die NFAT-SEAP-Aktivierung war hingegen reduziert. Aus diesen Daten lässt sich schlussfolgern, dass die aminotermine Domäne (A/B-Domäne) des MR eine wichtige Rolle bei der NFAT-Transkriptionsaktivierung spielt. Möglicherweise finden bei der NFAT-Transkriptionsaktivierung Protein-Protein-Wechselwirkungen mit anderen Koaktivatoren statt, die spezifisch im N-terminalen Bereich des MR binden und die für die MEF2-Transkriptionsaktivierung wahrscheinlich nicht von Bedeutung sind.

Es ist wichtig in zukünftigen Experimenten zu überprüfen, ob trunkierte MR-Varianten (MR^{CDEF}, MR^{DEF}) auch in differenzierten Zelllinien (glatten oder aortalen Gefäßmuskelzellen (A10, A7r5) der Ratte oder in Nierenzellen des Opossums (OK)) einen Einfluss auf die NFAT- sowie MEF2-Transkriptionsaktivierung haben. Allerdings ist dies nur anteilig möglich, da diese Zellen endogen den MR exprimieren.

4.3 Analyse der Mineralokortikoid-Rezeptor-Calcineurin-Interaktion

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass HSP90 eine wichtige Rolle bei der NFAT- sowie MEF2-Transkriptionsaktivierung nach MR-Stimulation spielt, da Geldanamycin die NFAT/MEF2-Reporter-gen-Aktivierung verhinderte (Abb. 3.14). Grossmann et al. zeigten, dass eine Inhibierung der durch Forskolin stimulierten CRE-abhängigen Genexpression durch Cyclosporin A (CyP-CsA) und Geldanamycin verhindert werden kann⁷³. Aufgrund dessen wurde im Rahmen dieser Arbeit durch Co-Immunopräzipitation analysiert, ob ein Signalkomplex bestehend aus MR, PP2B und HSP90 in der Zelle vorliegt (Abb. 3.19 - 3.21). Aus den durch Co-Immunopräzipitation gewonnenen Daten kann geschlossen werden, dass eine HSP90-vermittelte MR-PP2BA- β -Interaktion, unabhängig vom Aktivierungszustand des MR existiert (Abb. 5.1). Möglicherweise wird diese MR-PP2BA- β -Interaktion über das Chaperon HSP90 vermittelt, da nach Geldanamycin-Gabe keine MR-PP2BA- β -Interaktion detektiert werden konnte (Abb. 3.20 C). Someren et al. verifizierten einen Einfluss von HSP90 auf die PP2B-Aktivierung durch Aldosteron und zeigten eine Interaktion von HSP90 mit PP2B *in vitro* und *in vivo*¹⁸¹. In Rattennierenzellen wurde eine nicht-genotrope Aldosteron-Wirkung über eine HSP90- und HSP70-abhängige Aktivierung von Calcineurin gezeigt⁸⁹.

MR sowie GR liegen in der Zelle als Heterokomplex aufgebaut aus einer Vielzahl von miteinander wechselwirkender Proteine wie HSP90/HSP70/p23 und verschiedener Immunophilinen (IMM) vor^{32,33,213-215}. Durch die Bindung des Chaperone-Komplexes wird der MR stabilisiert und vor Degradation durch den Ubiquitin-Proteasom-Signalweg geschützt²¹⁶. In diesem Komplex sind verschiedene IMM (z. B. FKBP51), die eine Peptidylprolyl-Isomerase (PPIase)-Domäne besitzen, gebunden. Zusätzlich zur PPIase-Aktivität besitzen die IMM eine Tetratricopeptid (TPR)-Domäne. Eine Interaktion der IMM mit HSP90 erfolgt über die 34 aa lange degenerative TPR-Domäne der IMM mit der TPR-Akzeptorstelle von HSP90^{217,218}. Über die PPIase-Domäne der IMM tritt der Heterokomplex mit Dynamitin in Wechselwirkung, welches wiederum mit Dynein, gebunden an Mikrotubuli, verbunden ist^{33,213,215,217,218}. Die Bindung der IMM, FKBP51 oder FKBP52, im Heterokomplex trägt entscheidend zur Funktionalität des Heterokomplexes bei. Eine Liganden-Bindung (Aldosteron/MR) bewirkt einen natürlichen Austausch des FKBP51 des im Zytosol lokalisierten Komplexes gegen FKBP52 (aktiver Komplex) und stimuliert die MR-Translokation in den Zellkern³³.

Verschiedene Studien zeigen, dass die Anwesenheit von HSP90 wichtig ist, um den MR in einer für die Ligandenbindung günstigen Konformation zu halten^{219–221}. Couette et al. identifizierten, anhand von Deletionsmutanten des MR, die Aminosäurereste 711-733 des C-terminalen Teils der Scharnierregion des humanen MR, die zum einen als essentielle Aminosäuren für die HSP90-Bindung wichtig sind und zum anderen den MR in einer für die Ligandenbindung günstigen Konformation halten²²².

In zukünftigen Experimenten könnte mittels (i) Co-Immunopräzipitationsanalysen unter Verwendung von Protein G-Agarose Beads und eines spezifischen PP2BA- β Antikörpers PP2BA- β aus mit MR-transfizierten und mit Aldosteron stimulierten Zelllysaten isoliert werden. PP2BA- β sowie die mit ihm präzipitierten Proteine (MR, HSP90, CAIN) würden über Protein G, welches spezifisch an die Fc-Region des PP2BA- β Antikörpers bindet, aus einem Zelllysate isoliert und anschließend (ii) durch Westernblot nachgewiesen werden. Someren et al. zeigten eine Interaktion von PP2B mit HSP90, differenzierten aber nicht spezifisch zwischen den beiden Isoformen, PP2BA- α und PP2BA- β ¹⁸¹. Außerdem könne mittels (iii) eines spezifischen CAIN-Antikörpers überprüft werden, ob CAIN im unstimulierten Zustand an den MR-PP2BA- β -Komplex gebunden ist und diese Bindung möglicherweise nach Stimulation des MR mit Aldosteron nicht mehr nachzuweisen ist, womit eine möglicher Mechanismus für die PP2B-Aktivierung nach MR-Stimulation beschrieben werden kann. Mittels (iv) Peptid-Mikroarrays könnte möglicherweise die Aminosäuresequenz identifiziert werden, über die eine Proteinbindung zwischen MR und HSP90, MR und PP2BA- β oder HSP90 und PP2BA- β erfolgt. Dafür würden anhand der MR/HSP90-Primärsequenz überlappende Peptid-Derivate generiert und auf einer Matrix (Chip) immobilisiert. Dieser Chip kann direkt mit biologischem Material z. B. mit MR-transfizierten und Aldosteron stimulierten HEK293-Zelllysaten inkubiert werden (sowie mit Kontrolllysate ohne Aldosteron). Unter Verwendung spezifischer fluoreszenzmarkierter Antikörper (gegen HSP90 oder PP2BA- β) könnten positive Spots über Fluoreszenzmessung detektiert und analysiert werden^{223,224}. Nach erfolgreicher Identifizierung potentieller HSP90- oder PP2BA- β -Peptidstellen könnten durch Mutationsanalysen dieser Aminosäuresequenzbereiche mittels Co-Immunopräzipitation analysiert werden, ob die Interaktion zwischen MR, HSP90 und PP2BA- β im Eluat nicht mehr nachzuweisen ist.

Galigniana et al. analysierten die Rate von transformierten zu untransformierten MR im Zellkern nach Steroidhormonbehandlung durch einen kontinuierlichen

Sucrose-Dichtegradienten^{33,225}. Die sogenannte Transformation beschreibt dabei die konformationelle Änderung des MR nach Aldosteron-Bindung (transformierter MR) durch Verschiebung des Sedimentationskoeffizienten (S). Eine Stabilisierung des untransformierten (ohne Steroidhormon) MR mit Molybdat zeigt einen Sedimentationskoeffizient von 9,4 S. Eine 30-minütige Aldosteron-Stimulation führt zu einem transformierten MR mit einem Sedimentationskoeffizienten von 5,1 S. Nukleoplasmatische Extrakte (10-minütige Behandlung mit Steroidhormon, MR im Zellkern) zeigten einen untransformierten MR von 75% mit einem Sedimentationskoeffizient von 9,4 S, der auf die Anwesenheit von HSP90 im Komplex hinweist. Eine Inkubation der Kernproben mit einem HSP90-Antikörper, der HSP90 im Komplex mit MR/Aldosteron erkennt, zeigte eine Verschiebung des Sedimentationskoeffizienten zu 11,4 S, was auf einen nuklearen MR-HSP90-Komplex hindeutet³³. Möglicherweise könnte in zukünftigen Experimenten durch (v) einen kontinuierlichen Sucrose-Dichtegradienten durch Inkubation von Zytosol- und Zellkernextrakten mit einem PP2BA- β -Antikörper, der PP2BA- β im Komplex mit MR und HSP90 erkennt, ebenfalls eine Verschiebung im Sedimentationskoeffizient zu höheren Werten detektiert werden, was ein Vorhandensein von PP2BA- β im Komplex bestätigen würde sowie die in dieser Arbeit gewonnenen Daten (Co-Immunopräzipitation, Analyse von Zellkernextrakten und Immunfluoreszenz), die auf ein Zusammenspiel von MR, HSP90 und PP2BA- β hinweisen.

4.4 Subzelluläre Lokalisation von Calcineurin in der Zelle

Ohne Ligand lokalisiert der MR im Zytosol, stabilisiert durch einen Heterokomplex aus HSP90/70/p23 und verschiedener IMM^{32,42,192,196,197}. Die klassische Auffassung der MR-Aktivierung umfasste eine Dissoziation von HSP90 im Zytosol nach Stimulation und anschließende Translokation des MR in den Zellkern, wo er an Hormon-responsive Elemente (z. B.: GRE) der DNA bindet und die Expression verschiedener Gene beeinflusst^{33,46,65,67,68,226}. Die Arbeitsgruppe um Pwien-Pilipuk widerlegte 2010 erstmals diese Hypothese und zeigte, dass der MR Hormon- und HSP90-abhängig in den Zellkern transloziert³³. Die Hormon- und HSP90-abhängige MR Zellkerntranslokation wurde 2012 von Grossmann et al. bestätigt⁴³.

Um zu klären, ob durch MR-Stimulation ein aktiviertes PP2BA sowohl im Zytosol wirken (NFAT-Dephosphorylierung und Aktivierung), als auch durch Umverteilung in den Zellkern die Aktivität weiterer Transkriptionsfaktoren wie MEF2 und CREB

beeinflussen kann, wurden (i) Analysen von Zellkern- und Zytosol-Fractionen sowie (ii) Immunfluoreszenz-Analysen durchgeführt.

(i) Analysen von Zellkern- und Zytosol-Fractionen

Abb. 3.22 A zeigt die Proteinexpression von MR, PP2BA- α , PP2BA- β sowie HSP90 in Zellkern- und Zytosol-Fractionen nach MR-Stimulation mit Aldosteron im Vergleich zu mit Geldanamycin behandelten HEK293-Zellen. Es konnte eine um ~48% erhöhte MR-Proteinmenge nach Aldosteron-Stimulation im Zellkern nachgewiesen werden (Abb 3.22). Dies korreliert mit einer veränderten subzellulären Lokalisation des PP2BA- β , da nach MR-Aktivierung eine Umverteilung von PP2BA- β um ~45% vom Zytosol in den Zellkern nachgewiesen werden konnte (Abb. 3.22 B).

Die Verteilung von PP2BA- α blieb im Vergleich von Zellkern- mit Zytosol-Fraktion unverändert (Abb. 3.22, Spur 1-4). In Anwesenheit des HSP90-Inhibitors Geldanamycin wurde keine veränderte subzelluläre Lokalisation von MR oder PP2BA- β nach Stimulation mit Aldosteron beobachtet (Abb. 3.22, Spur 5-8). Des Weiteren wurde eine HSP90 Lokalisation in beiden Fractionen, Zellkern sowie Zytosol, unabhängig von der Stimulation mit Geldanamycin detektiert. Im Zellkern hingegen ist HSP90 in geringerer Konzentration vorhanden (Abb. 3.22, Spur 1-2, Spur 5-6).

In Abb. 3.22 A wurden für PP2BA- β zwei Banden unterschiedlicher Größe im Westernblot detektiert. Die untere Bande entspricht der PP2BA- β Proteingröße. Möglicherweise weist die obere Bande auf posttranslationale Modifizierungen von PP2BA- β hin. Anhand von PhosphoSitePlus (www.phosphosite.org) wurden für PP2BA- β drei potentielle Phosphorylierungsstellen vorhergesagt (Ser420, Ser471, Ser478). Ob eine Phosphorylierung oder eine andere posttranslationale Modifikation von PP2B (z. B. Acetylierung) eine zusätzliche Bande im Westernblot hervorruft, könnte z. B. durch Peptid-Mikroarrays analysiert werden²²⁷.

In dieser Arbeit konnte kein erhöhtes HSP90 Proteinexpressionslevel im Zellkern nach 2-stündiger Aldosteron Stimulation detektiert werden. Dies könnte zum einen daran liegen, dass relativ wenig HSP90 zusammen mit dem MR in den Zellkern transloziert im Vergleich zu bereits im Zellkern vorhandenem HSP90-Protein. Zum anderen könnte es an der relativ lang gewählten Stimulationszeit liegen. Die Anreicherung von HSP90 und MR im Zellkern ist ein schneller Effekt, der anhand von *Time-lapse*-Analysen eine Aldosteron-abhängige MR Zellkerntranslokation innerhalb weniger Minuten nach

Stimulation der Zellen (Halbwertszeit = 6,9 min) zeigte ⁴³. Durch Co-Immunoprecipitation konnte ein HSP90-MR-Komplex in Eluaten von Zellkernextrakten detektiert werden, der um das 1,8 fache in Anwesenheit von Aldosteron (6 min) erhöht war im Vergleich zu mit Vehikel behandelten Kontrollzellen ⁴³. Eine deutliche Aktivierung der PP2B-Aktivität konnte 6 h nach MR Stimulation verifiziert werden, also deutlich später ⁷³. Der hier gewählte Zeitpunkt von zwei Stunden sollte nicht die schnellen MR-Effekte, sondern die späteren Auswirkungen des aktivierten MR auf PP2BA detektieren.

Diese teilweise Umverteilung von MR und PP2BA- β vom Zytosol in den Zellkern in Abhängigkeit von HSP90, bekräftigen ein Zusammenspiel von MR/HSP90/PP2BA- β (Abb. 5.1), wodurch über PP2BA- β eine MR-induzierte NFAT-Aktivierung im Zytosol sowie eine MR-induzierte CREB-Inhibierung im Zellkern möglich sind (Abb. 5.1). Verschiedene Studien zeigen, dass neben dem Transkriptionsfaktor NFAT auch Calcineurin in den Zellkern transloziert ^{79,191,228}.

(ii) Immunfluoreszenz-Analysen

Durch Immunfluoreszenz wurde die subzelluläre MR- und PP2BA-Lokalisation in Abhängigkeit von der MR-Aktivierung bestimmt. Hierbei zeigte sich, dass MR (Abb. 3.23 A 1) sowie PP2BA (3.23 A 2) unter Kontrollbedingungen im Zytosol lokalisiert sind. Eine 2-stündige MR-Stimulation führte zu einem um ~37% erhöhten Proteinanteil von PP2BA im Zellkern (Abb. 3.23/Abb. 3.24).

In mit RFP (Rot-fluoreszierendem Protein) transfizierten Zellen (Negativkontrolle) wurde durch Aldosteron keine Änderung der PP2BA-Lokalisation beobachtet (Abb. 3.23 B; Abb. 3.24). In MR-RFP transfizierten Zellen, die mit Vehikel stimuliert wurden, konnte eine Verteilung von PP2BA im Zellkern von 7-8% detektiert werden und entspricht der Verteilung von mit RFP transfizierten Kontrollzellen (RFP, Vehikel) (Abb. 3.24).

Diese Daten wurden mittels eines Antikörpers (Pan- α) generiert, der zwar hauptsächlich PP2BA- α erkennt, aber auch in der Lage ist PP2BA- β zu detektieren. Durch Verwendung eines spezifischen PP2BA- β -Antikörpers (Tab. 2.10) konnte die PP2BA- β Umverteilung nach MR-Aktivierung, mit einem ebenfalls um ~37% erhöhten Proteinanteil von PP2BA- β im Zellkern, bestätigt werden (Abb. 3.25). Dies entspricht

dem Ergebnis, dass mit dem Pan- α Antikörper erzielt wurde (Abb. 3.23; Abb. 24) und zeigt, dass es sich bei der umverteilten Calcineurin-Isoform um PP2BA- β handelt.

Die durch Analyse von Zellkern- und Zytosol-Fraktionen (Abb. 3.22) gewonnenen Daten bezüglich der subzellulären Umverteilung von PP2BA- β und MR um ~45% vom Zytosol in den Zellkern nach MR-Stimulation konnten durch Immunfluoreszenz-Analysen (subzellulären Umverteilung von PP2BA- β um ~37%) bestätigt werden. Damit kann bekräftigt werden, dass durch eine PP2BA- β Aktivierung nach MR-Stimulation Transkriptionsfaktoren wie NFAT im Zytosol aktiviert werden können (Zunahme NFAT-SEAP-Reporter-Gen-Aktivierung Abb. 3.13). Außerdem ist PP2BA- β durch Umverteilung aus dem Zytosol in den Zellkern nach MR-Aktivierung in der Lage andere Transkriptionsfaktoren wie CREB zu beeinflussen (Dephosphorylierung von CREB; Abnahme der CRE-SEAP-Reporter-Gen-Aktivierung⁷³, Abb. 5.1). Hallhuber et. al. untersuchten den Import-Export-Mechanismus von PP2B in und aus dem Zellkern und zeigten, dass die Anwesenheit von PP2B im Zellkern eine wichtige Rolle für die komplette NFAT-Transkriptionsaktivität spielt, da es neben der NFAT-Dephosphorylierung auch für den NFAT-Kernimport über das Beförderungspotein Importin- β von großer Bedeutung ist.

Die klassische transkriptionelle MR-Aktivierung (GRE-Reporter-Gen-Assay) findet PP2BA-unabhängig statt. Eine erhöhte PP2BA-Aktivität, hervorgerufen durch MR-Stimulation, führt zu einer erhöhten CREB-Dephosphorylierung und somit zur Reduktion der CREB-vermittelten Genexpression⁷³. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass PP2BA- β in Anwesenheit des stimulierten MR in den Zellkern transloziert, nicht aber PP2BA- α , was auf unterschiedliche Funktionen der beiden katalytischen PP2BA-Isoformen schließen lässt. Eine unterschiedliche subzelluläre Verteilung der beiden ubiquitär exprimierten PP2BA-Isoformen, PP2BA α und PP2BA- β , ist nicht nur MR-abhängig, sondern auch in Anwesenheit anderer Stimuli, PDGF (*platelet-derived growth factor*) gezeigt worden¹¹⁰. In aortalen Rattenmuskelzellen konnte eine NFATc3-abhängige PP2BA- β Zellkerntranslokation nach PDGF-Stimulation nachgewiesen werden, die mit einer Induktion der Zellproliferation einhergeht. Dies konnte nicht für PP2BA- α bzw. nach Cyclosporin A-Behandlung oder in Anwesenheit des NFAT-Inhibitors A-28522 beobachtet werden. Dies lässt auf eine spezifische Aktivierung von PP2BA- β durch PDGF und somit auf unterschiedliche Funktionen der beiden PP2BA-Isoformen in der

Zelle schließen¹¹⁰. Hallhuber et al. zeigten eine Translokation von eGFP-CnA in den Zellkern nach AngII-Stimulus in neonatalen Rattenkardiomyocyten⁷⁹. Der PP2B-Kernimport wurde durch Inhibierung der PP2B/Importin- β Interaktion verhindert. Möglicherweise fungiert PP2B als transkriptioneller Koaktivator, der wiederum mit anderen Transkriptionsfaktoren wie AP1, MEF2, GATA4 in Wechselwirkung tritt und somit die DNA-Bindung, z. B. am IL-2-Promotor, stabilisiert^{79,135,136}.

Die systemische Relevanz des in dieser Arbeit beschriebenen HSP90-abhängigen MR-PP2BA- β -Zusammenspiels wird durch verschiedene *in vivo* Studien bekräftigt, die zeigen, dass das Ausbilden von Fibrose und kardialer Hypertrophie durch PP2B und Aldosteron hervorgerufen werden und diese Krankheitssymptome durch Anwendung von Calcineurin-Inhibitoren wie Cyclosporin A (CyP-CsA) oder Takrolimus (FKBP12-FK506), vermindert werden konnten⁸⁷⁻⁸⁹.

In den letzten Jahre wurde die zunehmend bedeutende Rolle von PP2B/NFAT und MR im Rahmen der kardiovaskulären Pathophysiologie erkannt^{73,77,79,80}. Charakteristische Merkmale der MR-induzierten Vaskulopathie werden auch bei einer Aktivierung von PP2B/NFAT (Gefäß-Remodeling, Gefäß-Proliferation, Gefäß-Alterung, Hochregulation von inflammatorischen Regulatoren) beobachtet⁸¹⁻⁸⁵. Aus diesem Grund ist die Aufklärung des Mechanismus über den MR und PP2B gemeinsam an der Entstehung kardiovaskulärer Veränderungen beteiligt sind, besonders interessant. In der Literatur sind zwei Steroidhormonrezeptoren, MR und Östrogen-Rezeptor (ER), beschrieben, die auf unterschiedliche Weise über die Beeinflussung der PP2B-Aktivität teilweise die kardiovaskuläre Homöostase regulieren. Eine schützende Wirkung auf die Gefäßhomöostase konnte für den Östrogen-Rezeptor verifiziert werden. Das Entstehen einer kardialen Hypertrophie (durch AngII) konnte durch Stimulation des Östrogen-Rezeptor mit Östradiol und daraus resultierende Reduktion der PP2B-Aktivität vermindert werden²²⁹. Der stimulierte MR hingegen erhöht die PP2B-Aktivität⁷³, wodurch Gefäßentzündungen induziert werden^{74,192-194}.

Die myokardiale Rolle von PP2BA(- β) scheint widersprüchlich zu sein. PP2BA- β -defiziente Mäuse zeigten eine verringerte Herzgröße sowie eine eingeschränkte Hypertrophie-Antwort nach AngII- oder Isoprenalin-Stimulus im Vergleich zu Wildtyp-Tieren¹⁶². Tiere mit einem spezifischen myokardialen PP2BA- β Verlust waren anfälliger für akute Ischämie und Dysfunktion. Bueno et al. zeigten, dass PP2B/NFAT Herzmyocyten vor Apoptose schützen²³⁰.

PP2BA- β scheint unterschiedliche Rollen im Organismus in Abhängigkeit vom pathophysiologischen Stimulus oder des primär beeinflussten Zelltyps zu haben. Deshalb muss die Rolle von PP2BA- β auf kardiovaskuläre Effekte hervorgerufen durch MR-Aktivierung genauer analysiert werden. (i) Mechanistische Studien mit differenzierten Zelllinien (Gefäßzellen, Kardiomyocyten) sind erforderlich und könnten bezüglich der PP2BA- β vermittelten Genexpression nach MR-Aktivierung untersucht werden. Aortale Gefäßmuskelzellen der Ratte (A7r5) z. B. exprimieren endogen den MR und könnten für (ii) siRNA-Experimente eingesetzt werden. Für die Herunterregulation von PP2BA- α bzw. PP2BA- β in diesen differenzierten Zellen müsste ein Protokoll für eine verlässliche Herunterregulation etabliert werden, um anschließende (iii) Analysen bezüglich der PP2BA- β vermittelten Genexpression nach MR-Stimulation von potentiellen Entzündungsmarkern wie z. B. RANTES, Osteopontin, COX2 und IL2 sowie von Hypertrophie-Markergenen (ANF, β -MHC, Skelett- α -Actin) durchzuführen. Des Weiteren könnten (iv) *in vivo* Studien an PP2BA- β -defizienten Mäusen, die eine um 12% verringerte Herzgröße sowie eine verminderte Hypertrophie-Antwort nach hypertrophem Stimulus (Ang II oder Isoprenalin) aufweisen¹⁶², durchgeführt werden. Der Einfluss von Aldosteron, als hypertropher Stimulus auf Herz, Gefäße und Nieren sollte dabei im Vergleich zu Wildtyp-Tieren untersucht werden und gibt möglicherweise Aufschluss über die PP2BA- β vermittelte Rolle auf das kardiovaskuläre System nach MR-Aktivierung.

5. Zusammenfassung

Der Mineralokortikoid-Rezeptor (MR) gehört zur Familie der Steroidhormon-Rezeptoren¹¹⁻¹⁵. Klassisch wird er als Liganden-gesteuerter Transkriptionsfaktor durch Aldosteron aktiviert und bindet an Hormon-responsive Elemente in Promotor- und Enhancer-Regionen verschiedener Gene^{14,15}. Durch seine Wirkung in epithelialen Geweben spielt er eine wichtige Rolle im Volumen- und Elektrolythaushalt⁷. Unabhängig von seiner klassischen Wirkung in epithelialen Geweben induziert der MR in nicht-epitheliale Gewebe pathophysiologische Veränderungen, die sich durch endotheliale Dysfunktion und strukturelle Veränderungen an Gefäßen (Vaskulopathie) und Herz (Herzinsuffizienz) äußern^{6,7}. Neben der Kontrolle der Expression von Zielgenen (genomische MR-Effekte)^{16,43-46}, ist der MR in der Lage mit zytosolischen Signalkaskaden in Wechselwirkung zu treten (nicht-genotrope Effekte)^{65,66}. Im Fokus dieser Arbeit stand die mechanistische Analyse der Interaktion des aktivierten MR über die Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Serin/Threonin-Phosphatase Calcineurin (PP2B), da verschiedene Studien bei Überaktivierung von Calcineurin ähnliche pathophysiologische Veränderungen am kardialen System zeigten wie der MR. Außerdem konnten diese Krankheitssymptome durch Calcineurin-Inhibitoren wie Cyclosporin A oder Takrolimus vermindert oder verhindert werden^{77,79-88}. Takeda et al. sowie Mano et al. zeigten einen direkten Zusammenhang zwischen Aldosteron und Calcineurin bei der Ausbildung von Herzhypertrophie und Fibrose^{87,88}. In HEK293-Zellen wurde eine MR-induzierte Calcineurin-abhängige Inhibierung der cAMP/CREB-Signalkaskade beobachtet, die mit einer erhöhten Calcineurin-Aktivität einhergeht. Es wurde eine vermehrte CREB (*cAMP response element binding protein*)-Dephosphorylierung sowie eine reduzierte Expression des CREB-abhängigen Gens Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6PD) beobachtet^{73,74}. Der Einsatz des PP2B-Inhibitors Cyclosporin A verhinderte eine Abnahme der G6PD-Expression⁷³. Es gibt keine Hinweise auf eine MR-abhängige Stimulation des Calcineurins durch veränderte PP2BA-Proteinexpression, veränderte intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration, Aktivierung von p38 oder der extrazellulär regulierten Kinase (ERK) oder Beteiligung der Protein Kinase C (PKC)⁷³. Allerdings gibt es Hinweise einer Beteiligung von HSP90 an der nicht-genotropen MR/PP2B-Wechselwirkung⁷³. Aufgrund der Vorbefunde sollte aufgeklärt werden, ob Calcineurin ein mögliches Bindeglied ist, welches bei pathophysiologischer MR-Stimulation vermehrt aktiviert wird und ob der

aktivierte MR möglicherweise z. T. über Calcineurin seine pathophysiologischen Effekte vermittelt. Neben der cAMP/CREB-Signalkaskade sollte im Rahmen dieser Arbeit auch die nicht-genotrope MR/PP2B-Wirkung auf die NFAT- sowie MEF2-Signalkaskaden untersucht werden. Die katalytischen Untereinheiten von Calcineurin, PP2BA- α und PP2BA- β , wurden in HEK (*human embryonic kidney*) 293-Zellen unter Verwendung von siRNA herunterreguliert. SiRNA-Experimente zeigten, dass der aktivierte MR, aber nicht der GR, eine reduzierte CREB- sowie eine erhöhte NFAT-vermittelte Genexpression über die katalytische PP2BA- β Isoform, jedoch nicht über PP2BA- α , bewirkt. Co-Immunoprecipitationsstudien weisen auf einen Proteinkomplex bestehend aus MR und PP2BA- β hin, der unabhängig von der MR-Stimulation in der Zelle vorliegt und HSP90-abhängig reguliert wird. Der aktivierte MR induziert eine signifikante Veränderung der zytosolischen PP2BA- β -Lokalisation. PP2BA- β ist nach MR-Stimulation vermehrt im Zellkern lokalisiert. Zusätzlich bewirkte eine MR-Aktivierung eine verminderte Expression des Calcineurin-Inhibitors CAIN (*calcineurin inhibitor*), die RCAN1 (*regulator of calcineurin*)-Expression blieb hingegen unverändert.

Zusammenfassend weisen diese Ergebnisse darauf hin, dass der MR über die katalytische PP2BA- β Isoform seine nicht-genomischen Effekte und die daraus resultierende pathophysiologische Aldosteron-Wirkung vermittelt. Der MR-PP2BA- β -Crosstalk wird mechanistisch durch einen HSP90-abhängigen Proteinkomplex, eine veränderte subzelluläre PP2BA- β Verteilung sowie eine veränderte Expression des endogenen PP2B-Inhibitors CAIN beeinflusst (Abb. 5.1).

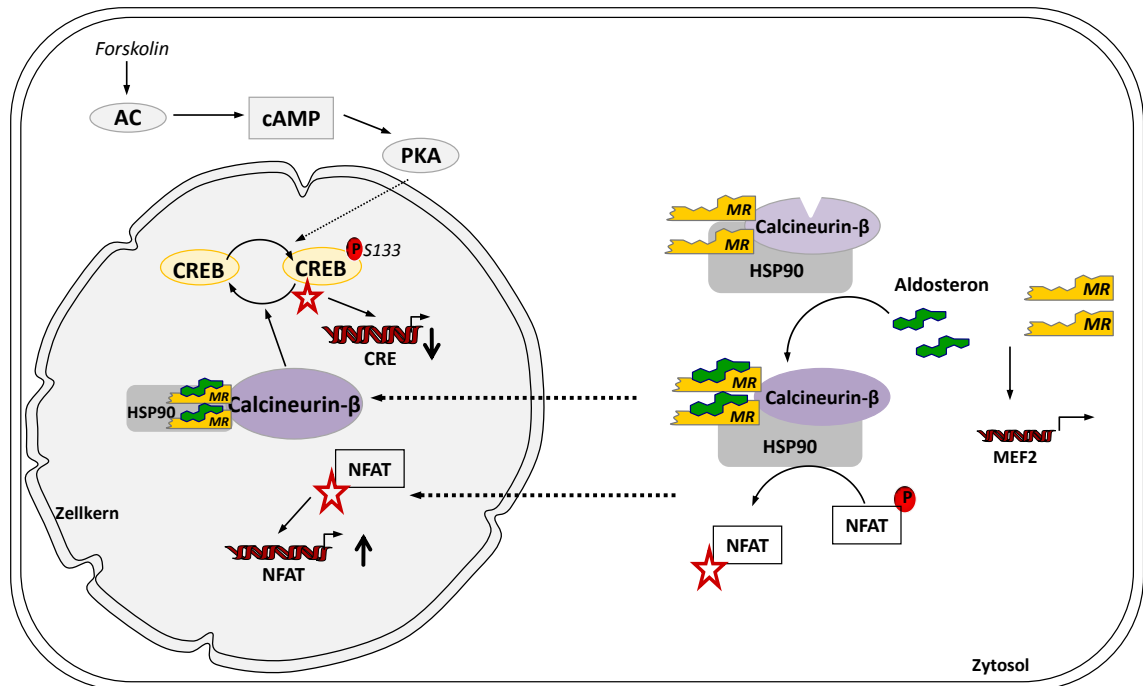


Abb. 5.1: Modell der Wechselwirkung von MR und PP2B im Rahmen der pathophysiologischen Aldosteron-Wirkung

In Abwesenheit von Aldosteron bilden MR und PP2BA- β einen inaktiven Komplex vermittelt durch HSP90 im Zytosol. Aldosteron induziert eine konformationelle Änderung des Komplexes, wodurch die zytosolische Calcineurin-Aktivität steigt und eine vermehrte Translokation des aktivierten Komplexes in den Zellkern stattfindet. Zytosolisches Calcineurin dephosphoryliert und aktiviert den Transkriptionsfaktor NFAT, der dadurch in den Zellkern transloziert. Die Transkription MEF2-abhängiger Gene wird durch MR-Aktivierung induziert, wird aber nicht durch Calcineurin beeinflusst. Nukleares Calcineurin dephosphoryliert und inaktiviert den Transkriptionsfaktor CREB. Zusammenfassend führt eine MR-Aktivierung zu einer veränderten Genexpression durch direkte Translokation des MR mit Calcineurin in den Zellkern und indirekt über NFAT und CREB, wodurch das pathophysiologische Potential für das Ausbilden von renokardiovaskulären Schäden begünstigt wird.

AC: Adenylat-Zyklase; CREB: *cAMP response element binding protein*; PKA: Proteinkinase A; MEF2: *myocyte enhancer factor 2*; NFAT: *nuclear factor of activated T cells*; P: Phosphat-Rest; CRE: *cAMP response element*; MR: Mineralokortikoid-Rezeptor.

Literaturverzeichnis

1. Komuro, I. & Yazaki, Y. Control of cardiac gene expression by mechanical stress. *Annu Rev Physiol* **55**, 55–75 (1993).
2. Rocha, R. & Stier, C. Pathophysiological effects of aldosterone in cardiovascular tissues. *Trends in Endocrinology & Metabolism* **12**, 308–314 (2001).
3. Wang, W. Chronic Administration of Aldosterone Depresses Baroreceptor Reflex Function in the Dog. *Hypertension* **24**, 571–575 (1994).
4. Hatakeyama, H., Miyamori, I., Takeda, Y., Yamamoto, H. & Mabuchi, H. The expression of steroidogenic enzyme genes in human vascular cells. *Biochem Mol Biol Int.* **40**, 639–45 (1996).
5. Takeda, Y. Vascular synthesis of aldosterone: role in hypertension. *Molecular and Cellular Endocrinology* **217**, 75–79 (2004).
6. Blasi, E. R. *et al.* Aldosterone/salt induces renal inflammation and fibrosis in hypertensive rats. *Kidney International* **63**, 1791–800 (2003).
7. Pitt, B. *et al.* The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. *The New England Journal of Medicine* **341**, 709–717 (1999).
8. Pitt, B. *et al.* Eplerenone, a Selective Aldosterone Blocker, in Patients with Left Ventricular Dysfunction after Myocardial Infarction. *The New England Journal of Medicine* **348**, 1309–1321 (2003).
9. Young, M. & Funder, J. W. Eplerenone, but not steroid withdrawal, reverses cardiac fibrosis in deoxycorticosterone/salt-treated rats. *Endocrinology* **145**, 3153–7 (2004).
10. Funder, J. W. Minireview: Aldosterone and mineralocorticoid receptors: past, present, and future. *Endocrinology* **151**, 5098–102 (2010).
11. Chambon, P. The nuclear receptor superfamily: a personal retrospect on the first two decades. *Molecular Endocrinology* **19**, 1418–28 (2005).
12. Evans, R. M. The nuclear receptor superfamily: a rosetta stone for physiology. *Molecular Endocrinology* **19**, 1429–38 (2005).
13. Gronemeyer, H., Gustafsson, J.-A. & Laudet, V. Principles for modulation of the nuclear receptor superfamily. *Nature Reviews Drug Discovery* **3**, 950–64 (2004).
14. Evans, R. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* **240**, 889–95 (1988).

15. Beato, M. Gene Regulation by Steroid Hormones. *Cell* **56**, 335–344 (1989).
16. Farman, N. & Rafestin-Oblin, M. E. Multiple aspects of mineralocorticoid selectivity. *Am J Physiol Renal Physiol* **280**, F181–92 (2001).
17. Hafezi-Moghadam, A. *et al.* Acute cardiovascular protective effects of corticosteroids are mediated by non-transcriptional activation of endothelial nitric oxide synthase. *Nat Med* **8**, 473–479 (2002).
18. Cronstein, B. N., Kimmeli, S. C., Levin, R. I. & Martiniuk, F. A mechanism for the antiinflammatory effects of corticosteroids: The glucocorticoid receptor regulates leukocyte adhesion to. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**, 9991–9995 (1992).
19. Giguère, V., Hollenberg, S. M., Rosenfeld, M. G. & Evans, R. M. Functional domains of the human glucocorticoid receptor. *Cell* **46**, 645–52 (1986).
20. Krust, A., Green, S., Argos, P., Walter, P. & Bornert, J. The chicken oestrogen receptor sequence: homology with v-erbA and the human oestrogen and glucocorticoid receptors. *EMBO Journal* **5**, 891–897 (1986).
21. Baker, M. E. Adrenal and sex steroid receptor evolution: environmental implications. *Journal of Molecular Endocrinology* **26**, 119–25 (2001).
22. Rogerson, F. M. & Fuller, P. J. Mineralocorticoid action. *Steroids* **65**, 61–73 (2000).
23. Pascual-Le Tallec, L. & Lombès, M. The mineralocorticoid receptor: a journey exploring its diversity and specificity of action. *Molecular Endocrinology* **19**, 2211–21 (2005).
24. Walther, R. *et al.* A serine/threonine-rich motif is one of three nuclear localization signals that determine unidirectional transport of the mineralocorticoid receptor to the nucleus. *The Journal of Biological Chemistry* **378**, 641–644 (2005).
25. Umesono, K. & Evans, R. M. Determinants of target gene specificity for steroid/thyroid hormone receptors. *Cell* **57**, 1139–46 (1989).
26. Luisi, B. *et al.* Crystallographic analysis of the interaction of the glucocorticoid receptor with DNA. *Nature* 497–505 (1991).
27. Schwabe, J. W., Chapman, L., Finch, J. T. & Rhodes, D. The crystal structure of the estrogen receptor DNA-binding domain bound to DNA: how receptors discriminate between their response elements. *Cell* **75**, 567–78 (1993).
28. Tsai, M. & O'Malley, B. Steroid/thyroid receptor superfamily members. *Annu Rev Biochem* **63**, 451–86 (1994).
29. Germain, P., Staels, B., Dacquet, C., Spedding, M. & Laudet, V. Overview of Nomenclature of Nuclear Receptors. *Pharmacological Reviews* **58**, 685–704 (2006).

30. Liu, W., Wang, J., Sauter, N. K. & Pearce, D. Steroid receptor heterodimerization demonstrated in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**, 12480–4 (1995).
31. Tallec, L. P. *et al.* Protein Inhibitor of Activated Signal Transducer and Activator of Transcription 1 Interacts with the N- Terminal Domain of Mineralocorticoid Receptor and Represses Its Transcriptional Activity: Implication of Small Ubiquitin-Related Modifier 1 Modificati. *Molecular Endocrinology* **17**, 2529–2542 (2003).
32. Pratt, W. B. & Toft, D. O. Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. *Endocrine Reviews* **18**, 306–60 (1997).
33. Galigniana, M. D., Erlejman, A. G., Monte, M., Gomez-Sanchez, C. & Piwien-Pilipuk, G. The hsp90-FKBP52 complex links the mineralocorticoid receptor to motor proteins and persists bound to the receptor in early nuclear events. *Molecular and Cellular Biology* **30**, 1285–98 (2010).
34. Bourguet, W., M, R., Chambon, P., Gronemeyer, H. & Moras, D. Crystal structure of the ligand-binding domain of the human nuclear receptor RXR-alpha. *Nature* **375**, (1995).
35. Beaumont, K. & Fanestil, D. D. Characterization of rat brain aldosterone receptors reveals high affinity for corticosterone. *Endocrinology* **113**, 2043–51 (1983).
36. Funder, J. W., Pearce, P. T., Smith, R. & Smith, a I. Mineralocorticoid action: target tissue specificity is enzyme, not receptor, mediated. *Science* **242**, 583–5 (1988).
37. Rogerson, F., Brennan, F. & Fuller, P. Mineralocorticoid receptor binding, structure and function. *Molecular and Cellular Endocrinology* **217**, 203–12 (2004).
38. White, P. C., Mune, T. & Agarwal, A. K. Apparent Mineralocorticoid Excess. *Endocrine Reviews* **18**, (1997).
39. Farman, N. *et al.* Immunolocalization of gluco- and mineralocorticoid receptors in rabbit kidney. *Am J Physiol Cell Physiol* **240**, C20–C27 (1991).
40. Sanchez, E., Toft, D., Schlesinger, M. & Pratt, W. Evidence That the 90-kDa Phosphoprotein Associated with the Untransformed L-cell Glucocorticoid Receptor Is a Murine Heat Shock Protein. *The Journal of Biological Chemistry* **260**, 12398–12401 (1985).
41. Robertson, N. M., Schulman, G., Karnik, S., Alnemri, E. & Litwack, G. Demonstration of nuclear translocation of the mineralocorticoid receptor (MR) using an anti-MR antibody and confocal laser scanning microscopy. *Molecular Endocrinology* **7**, 1226–39 (1993).
42. Pratt, W., Galigniana, M., Morishima, Y. & Murphy, P. Role of molecular chaperones in steroid receptor action. *Essays Biochem.* **40**, 41–58 (2004).

43. Grossmann *et al.* Nuclear shuttling precedes dimerization in mineralocorticoid receptor signaling. *Chem Biol* **19**, 742–51 (2012).
44. Arriza, J. *et al.* Cloning of human mineralocorticoid receptor complementary DNA: structural and functional kinship with the glucocorticoid receptor. *Science* **237**, 268–275 (1987).
45. Krug, A. W. *et al.* Aldosterone stimulates epidermal growth factor receptor expression. *The Journal of Biological Chemistry* **278**, 43060–6 (2003).
46. Gekle, M., Golenhofen, N., Oberleithner, H. & Silbernagl, S. Rapid activation of Na⁺/H⁺ exchange by aldosterone in renal epithelial cells requires Ca²⁺ and stimulation of a plasma membrane proton conductance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 10500–4 (1996).
47. Karns, A. D., Bral, J. M., Hartman, D., Peppard, T. & Schumacher, C. Study of aldosterone synthase inhibition as an add-on therapy in resistant hypertension. *J Clin Hypertens* **15**, 186–92 (2013).
48. Multrow, P. & Ganong, W. F. Stimulation of aldosterone secretion by Angiotensin II. *J of Biology and Medicine* **33**, 386–395 (1961).
49. Conn, J. W., Knopf, R. . & Nesbit, R. M. Clinical characteristics of primary aldosteronism from analysis of 145 cases. *Am J Surg* **107**, 159–175 (1964).
50. Fiebeler, A. *et al.* Aldosterone synthase inhibitor ameliorates Angiotensin II-induced organ damage. *Circulation* **111**, 3087–3094 (2005).
51. Rocha, R. & Funder, W. The Pathophysiology of Aldosterone in the Cardiovascular System. *Ann. N.Y. Acad. Sci* **970**, 89–100 (2002).
52. Qin, W. *et al.* Transgenic model of aldosterone-driven cardiac hypertrophy and heart failure. *Circulation Research* **93**, 69–76 (2003).
53. Robert, V. *et al.* Increased cardiac types I and III collagen mRNAs in aldosterone-salt Hypertension. *Am Heart Association* **20**, 30–36 (1994).
54. Brilla, C., Zhou, G., Masubara, L. & Weber, K. Collagen Metabolism in Cultured Adult Rat Cardiac Fibroblasts: Response to Angiotensin II and Aldosterone. *J Mol Cardiol* **26**, 809–820 (1994).
55. Young, M., Fullerton, M., Dilley, R. & Funder, J. Mineralocorticoids, Hypertension, and Cardiac Fibrosis. *J Clin Invest* **93**, 2578–2583 (1994).
56. Epstein, M. Aldosterone as a Mediator of Progressive Renal Dysfunction: Evolving Perspectives. *Internal Medicine* **40**, 573–583 (2001).
57. Young, M., Moussa, L., Dilley, R. & Funder, J. Early Inflammatory Responses in Experimental Cardiac Hypertrophy and Fibrosis: Effects of 11- β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Inactivation. *Endocrinology* **144**, 1121–1125 (2003).

58. Brilla, C. & Weber, K. Mineralocorticoid excess, dietary sodium, and myocardial fibrosis. *J. Lab. Clin. Med.* **120**, 893–901 (1992).
59. Funder, J. Steroids, hypertension and cardiac fibrosis. *Blood Press Suppl* **2**, 39–42 (1995).
60. Skøtt, O. *et al.* Rapid actions of aldosterone in vascular health and disease - friend or foe? *Pharmacology & Therapeutics* **111**, 495–507 (2006).
61. Gekle, M., Mildenerger, S., Freudinger, R. & Grossmann, C. Altered collagen homeostasis in human aortic smooth muscle cells (HAoSMCs) induced by aldosterone. *European J Physiol* **454**, 403–413 (2007).
62. Sorooshian, M., Olson, J. L. & Meyer, T. W. Effect of Angiotensin II Blockade on Renal Injury in Mineralocorticoid-Salt Hypertension. *Hypertension* **36**, 569–574 (2000).
63. Wang, W. Chronic Administration of Aldosterone Depress Baroreceptor Reflex Function in the Dog. *Am Heart Association* **24**, 571–575 (1994).
64. Rocha, R. *et al.* Aldosterone induces a vascular inflammatory phenotype in the rat heart Aldosterone induces a vascular inflammatory phenotype in the rat heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **283**, (2002).
65. Lösel, R. & Wehling, M. Nongenomic action of steroid hormones. *Nature Review* **4**, 46–56 (2003).
66. Booth, R., Johnson, J. & Stockand, J. Aldosterone. *Advan in Physiol Edu* **26**, 8–20 (2002).
67. Thomas, W., McEneaney, V. & Harvey, B. Aldosterone-stimulated PKC signalling cascades: from receptor to effector. *Biochem Soc Trans* **35**, 1049–51 (2007).
68. Grossmann, C. & Gekle, M. New aspects of rapid aldosterone signaling. *Molecular and Cellular Endocrinology* **308**, 53–62 (2009).
69. Haseroth, K. *et al.* Rapid Nongenomic Effects of Aldosterone in Mineralocorticoid-Receptor-Knockout Mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **261**, 257–261 (1999).
70. Christ, M. *et al.* Aldosterone, Not Estradiol, Is the Physiological Agonist for Rapid Increases in cAMP in Vascular Smooth Muscle Cells. *Circulation* **99**, 1485–1491 (1999).
71. Alzamora, R., Michea, L. & Marusic, E. T. Aldosterone Effects in Human Arteries. *Am Heart Association* **35**, 1099–1104 (2000).
72. Michea, L. *et al.* Eplerenone Blocks Nongenomic Effects of Aldosterone on the Na⁺/H⁺ Exchanger, Intracellular Ca²⁺ Levels, and Vasoconstriction in Mesenteric Resistance Vessels. *Endocrinology* **146**, 973–980 (2005).

73. Grossmann, C. *et al.* Mineralocorticoid receptor inhibits CREB signaling by calcineurin activation. *The FASEB Journal* **24**, 2010–9 (2010).
74. Leopold, J. A. *et al.* Aldosterone impairs vascular reactivity by decreasing glucose-6-phosphate dehydrogenase activity. *Nature Medicine* **13**, 189–198 (2007).
75. Siu, Y.-T. & Jin, D.-Y. CREB- a real culprit in oncogenesis. *The FEBS journal* **274**, 3224–32 (2007).
76. Klee, C. B., Ren, H. & Wang, X. Regulation of the Calmodulin- stimulated Protein Phosphatase , Calcineurin. *J of Biol Chem* **273**, 13367–13370 (1998).
77. Wilkins, B. J. & Molkenin, J. D. Calcium-calcineurin signaling in the regulation of cardiac hypertrophy. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **322**, 1178–91 (2004).
78. Johannessen, M., Delghandi, M. P. & Moens, U. What turns CREB on? *Cellular Signalling* **16**, 1211–27 (2004).
79. Hallhuber, M. *et al.* Inhibition of nuclear import of calcineurin prevents myocardial hypertrophy. *Circulation Research* **99**, 626–35 (2006).
80. Dickhout, J. G., Carlisle, R. E. & Austin, R. C. Interrelationship between cardiac hypertrophy, heart failure, and chronic kidney disease: endoplasmic reticulum stress as a mediator of pathogenesis. *Circulation Research* **108**, 629–42 (2011).
81. Guo, X., Zhou, C. & Sun, N. The neuropeptide catestatin promotes vascular smooth muscle cell proliferation through the Ca²⁺–calcineurin–NFAT signaling pathway. *Biochem and Biophys Res Comm* **407**, 807–812 (2011).
82. Chan, M. C. *et al.* The Amiloride Derivative Phenamil Attenuates Pulmonary Vascular Remodeling by Activating NFAT and the Bone Morphogenetic Protein Signaling Pathway. *Molecular and Cellular Biology* **31**, 517–530 (2011).
83. Peng, Y. *et al.* The role of RANTES as a crucial downstream cytokine in calcineurin-dependent VSMC apoptosis stimulated by INF γ and CD40L. *Cell Biol Int* **34**, 477–53 (2010).
84. Nilsson-Berglund, L. M. *et al.* Nuclear Factor of Activated T-cells regulates osteopontin expression in arterial smooth muscle in response to diabetesinduced hyperglycemia. *Arteriosclerosis & Thrombosis* **30**, 218–224 (2011).
85. Min, L. J. *et al.* Angiotensin II type 1 receptor-associated protein prevents vascular smooth muscle cell senescence via inactivation of calcineurin/ nuclear factor of activated T cells pathway. *J. Mol. Cell Cardiol.* **47**, 798–809 (2009).
86. Molkenin, J. D. *et al.* A Calcineurin-Dependent Transcriptional Pathway for Cardiac Hypertrophy. *Cell* **93**, 215–228 (1998).

87. Takeda, Y., Yoneda, T. & Demura, M. Calcineurin Inhibition Attenuates Mineralocorticoid-Induced Cardiac Hypertrophy. *Circulation* 677–679 (2002).
88. Mano, A. *et al.* Aldosterone Directly Induces Myocyte Apoptosis Through Calcineurin-Dependent Pathways. *Circulation* **110**, 371–323 (2004).
89. Tumlin, J. A. *et al.* Aldosterone and Dexamethasone Stimulate Calcineurin Activity through a Transcription-independent Mechanism Involving Steroid Receptor – associated Heat Shock Proteins. *J Clin. Invest* 1217–1223 (1997).
90. Ingebritsen, T. S. & Cohen, P. Protein Phosphatases: Properties and Role in Cellular Regulation. *Science* **221**, 331–338 (1983).
91. Cai, L., Chu, Y., Wilson, S. & Schlender, K. K. A Metal dependent form of Protein Phosphatase 2A. *Biochem and Biophys Res Comm* **208**, 274–279 (1995).
92. Shi, Y. Serine/Threonine Phosphatases: Mechanism through Structure. *Cell* **139**, 468–480 (2009).
93. Dodge, K. L. & Scott, J. D. Calcineurin anchoring and cell signaling. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **311**, 1111–1115 (2003).
94. Potthoff, M. J. & Olson, E. N. MEF2: a central regulator of diverse developmental programs. *Development* **134**, 4131–40 (2007).
95. Liu, J. *et al.* Calcineurin Is a Common Target of Cyclophilin-Cyclosporin A and FKBP-FK506 Complexes. *Cell* **66**, (1991).
96. Liu, J. *et al.* Inhibition of T cell signaling by immunophilin-ligand complexes correlates with loss of calcineurin phosphatase activity. *Biochemistry* **31**, 3896–901 (1992).
97. Berridge, M. J., Bootman, M. D. & Lipp, P. Calcium - a life and death signal. *Nature* **395**, 645–8 (1998).
98. Torgan, C. & Daniels, M. Calcineurin localization in skeletal muscle offers insights into potential new targets. *J Histochem Cytochem* **54**, 119–128 (2006).
99. Lawson, M. A. & Maxfield, R. Ca²⁺- and calcineurin-dependent recycling of an integrin to the front of migration neutrophils. *Nature* **377**, 75–79 (1995).
100. Yakel, J. Calcineurin regulation of synaptic function: from ion channels to transmitter release and gene transcription. *Science* **18**, (1997).
101. Yazdanbakhsh, K., Choi, J., Lit, Y., Laut, L. F. & Choi, Y. Cyclosporin A blocks apoptosis by inhibiting the DNA binding activity of the transcription factor Nur77. *Cell* **92**, 437–441 (1995).
102. Crabtree, G. R. & Clipstone, N. A. Signal transmission between the plasma membrane and nucleus of t lymphocytes. *Annu Rev Biochem* (1994).

103. Buttini, M., Limonta, S., Luyten, M. & Boddeke, H. Distribution of calcineurin A isoenzyme mRNAs in rat thymus and kidney. *Histochem Journal* **27**, 291–299 (1995).
104. Jiang, H. *et al.* Distinct tissue and cellular distribution of two major isoforms of calcineurin. *Mol Immunol* **34**, 663–9 (1997).
105. Rusnak, F. & Mertz, P. Calcineurin: form and function. *Physiological Reviews* **80**, 1483–521 (2000).
106. Molkenkin, J. Calcineurin and Beyond: Cardiac Hypertrophic Signaling. *Circulation Research* **87**, 731–738 (2000).
107. Takaishi, T., Saito, N., Kuno, T. & Tanaka, C. Differential distribution of the mRNA encoding two isoforms of the catalytic subunit of calcineurin in the rat brain. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **174**, 393–398 (1991).
108. Muramatsu, T., Higuchi, S. & Kincaid, R. L. Molecular cloning of a calmodulin-dependent phosphatase from murine testis: Identification of a developmentally expressed nonneural isoenzyme. *Biochemistry* **89**, 529–533 (1992).
109. Maillet, M. *et al.* Heart-specific deletion of CnB1 reveals multiple mechanisms whereby calcineurin regulates cardiac growth and function. *The Journal of Biological Chemistry* **285**, 6716–24 (2010).
110. Jabr, R. I. *et al.* Nuclear translocation of calcineurin A β but not calcineurin A α by platelet-derived growth factor in rat aortic smooth muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* **292**, C2213–25 (2007).
111. Li, H., Rao, A. & Hogan, P. G. Interaction of calcineurin with substrates and targeting proteins. *Trends in Cell Biology* **21**, 91–103 (2011).
112. Griffith, J. P. *et al.* X-Ray Structure of Calcineurin Inhibited by the Immunophilin-Immunosuppressant FKBP12-FK506 Complex. *Cell* **82**, 507–522 (1995).
113. Crivici, A. & Ikura, M. Molecular and structural basis of target recognition by calmodulin. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **24**, 85–116 (1995).
114. King, M. & Huang, C. 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. *J Biol Chem* **259**, 8847–56 (1984).
115. Klee, C., Crouch, T. & Krinks, M. Calcineurin: A calcium- and calmodulin-binding protein of the nervous system. *Biochemistry* **76**, 6270–6273 (1979).
116. Nakayama, S. & Kretsinger, R. Evolution of the EF-hand family of proteins. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **23**, 473–507 (1994).

117. Stemmer, P. & Klee, C. Dual calcium ion regulation of calcineurin by calmodulin and calcineurin B. *Biochemistry* **34**, 15880 (1995).
118. He, Z.-H. *et al.* Are calcineurin genes associated with endurance phenotype traits? *Eur J Appl Physiol* **109**, 359–69 (2010).
119. Aitken, A. *et al.* Identification of the NH₂-terminal blocking group of calcineurin B as myristic acid. *FEBS Letters* **150**, 314–318 (1982).
120. Zhu, D., Cardenas, M. E. & Heitman, J. Myristoylation of Calcineurin B Is Not Required for Function or Interaction with Immunophilin-Immunosuppressant Complexes in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae* *. *October* **270**, 24831–24838 (1995).
121. Manalan, a S. & Klee, C. B. Activation of calcineurin by limited proteolysis. *Proc Natl Acad sci USA* **80**, 4291–5 (1983).
122. Hubbard, M. & Klee, C. Functional domain structure of calcineurin A: mapping by limited proteolysis. *Biochemistry* **28**, 1868–74 (1989).
123. Yang, S. a & Klee, C. B. Low affinity Ca²⁺-binding sites of calcineurin B mediate conformational changes in calcineurin A. *Biochemistry* **39**, 16147–54 (2000).
124. Hemenway, C. S. & Heitman, J. Calcineurin - Structur, Function and Inhibition. *Cell Biochemistry and Biophysics* **30**, (1999).
125. Steele, F. F. L., Washburn, T., Dame, N. & Rieger, R. Drosophila retinal degeneration C (rdgC) Encodes a Novel Serine/Threonine Protein Phosphatase. *Cell* **69**, 669–676 (1992).
126. Kakalis, L. T., Kennedy, M., Sikkink, R., Rusnak, F. & Armitage, I. M. Characterization of the calcium-binding sites of calcineurin B. *FEBS Letters* **362**, 55–58 (1995).
127. Gallagher, S. C. *et al.* There Is Communication between All Four Ca²⁺-Bindings Sites of Calcineurin B. *Biochemistry* 12094–12102 (2001).
128. Antoni, F. *et al.* Calcineurin feedback inhibition of agonist-evoked cAMP formation. *The Journal of Biological Chemistry* **270**, 28055–61 (1995).
129. Clipstone, N. & Crabtree, G. Identification of calcineurin as a key signalling enzyme in T-lymphocyte activation. *Nature* **357**, 695–697 (1992).
130. Graef, I., Gastier, J., Francke, U. & Crabtree, G. Evolutionary relationships among Rel domains indicate functional diversification by recombination. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**, 5740–5 (2001).
131. Crabtree, G. R. & Olson, E. N. NFAT signaling: choreographing the social lives of cells. *Cell* **109**, S67–79 (2002).

132. Chen, L., Glover, J. N., Hogan, P. G., Rao, A. & Harrison, S. C. Structure of the DNA-binding domains from NFAT, Fos and Jun bound specifically to DNA. *Nature* **392**, 42–8 (1998).
133. Aramburu, J. *et al.* Selective inhibition of NFAT activation by a peptide spanning the calcineurin targeting site of NFAT. *Molecular Cell* **1**, 627–37 (1998).
134. Klemm, J. D., Beals, C. R. & Crabtree, G. R. Rapid targeting of nuclear proteins to the cytoplasm. *Current Biology* **7**, 638–44 (1997).
135. Crabtree, G. R. Generic signals and specific outcomes: signaling through Ca²⁺, calcineurin, and NF-AT. *Cell* **96**, 611–4 (1999).
136. Hogan, P. G., Chen, L., Nardone, J. & Rao, A. Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT. *Genes & Development* **17**, 2205–32 (2003).
137. De Windt, L. J. *et al.* Targeted inhibition of calcineurin attenuates cardiac hypertrophy in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**, 3322–7 (2001).
138. Shore, P. & Sharrocks, A. D. The MADS-box family of transcription factors. *FEBS* **229**, 1–13 (1995).
139. Black, B. L., Lu, J. & Olson, E. N. The MEF2A 3' untranslated region functions as a cis-acting translational repressor. *Molecular and Cellular Biology* **17**, 2756–63 (1997).
140. McKinsey, T., Zhang, C. L. & Olson, E. N. MEF2: a calcium-dependent regulator of cell division, differentiation and death. *TRENDS in Biochemical Sciences* **27**, 40–7 (2002).
141. Martin, J. F. *et al.* A Mef2 gene that generates a muscle-specific isoform via alternative mRNA splicing. *Molecular and Cellular Biology* **14**, 1647–56 (1994).
142. Grégoire, S. *et al.* Control of MEF2 transcriptional activity by coordinated phosphorylation and sumoylation. *The Journal of Biological Chemistry* **281**, 4423–33 (2006).
143. Blaeser, F., Ho, N., Prywes, R. & Chatila, T. A Ca²⁺-dependent gene expression mediated by MEF2 transcription factors. *The Journal of Biological Chemistry* **275**, 197–209 (2000).
144. Liu, J. Calmodulin-dependent phosphatase, kinases, and transcriptional corepressors involved in T-cell activation. *Immunol Rev* **228**, 184–198 (2009).
145. Youn, H. D., Chatila, T. A. & Liu, J. O. Integration of calcineurin and MEF2 signals by the coactivator p300 during T-cell apoptosis. *The EMBO journal* **19**, 4323–31 (2000).
146. Wu, H. *et al.* MEF2 responds to multiple calcium-regulated signals in the control of skeletal muscle fiber type. *The EMBO journal* **19**, 1963–73 (2000).

147. Youn, H. D., Grozinger, C. M. & Liu, J. O. Calcium regulates transcriptional repression of myocyte enhancer factor 2 by histone deacetylase 4. *The Journal of Biological Chemistry* **275**, 22563–7 (2000).
148. Edmondson, D. G., Lyons, G. E., Martin, J. F. & Olson, E. N. Mef2 gene expression marks the cardiac and skeletal muscle lineages during mouse embryogenesis. *Development* **120**, 1251–63 (1994).
149. Arnold, M. *et al.* MEF2C Transcription Factor Controls Chondrocyte Hypertrophy and Bone Development. *Cell* **12**, 377–390 (2007).
150. Zhang, C. *et al.* Class II Histone Deacetylases Act as Signal- Responsive Repressors of Cardiac Hypertrophy. *Cell* **110**, 479–488 (2002).
151. Potthoff, M. J. *et al.* Histone deacetylase degradation and MEF2 activation promote the formation of slow-twitch myofibers. *The Journal of Clinical Investigation* **117**, (2007).
152. Liu, J. O. Endogenous protein inhibitors of calcineurin. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **311**, 1103–1109 (2003).
153. Lai, M. M., Burnett, P. E., Wolosker, H., Blackshaw, S. & Snyder, S. H. Cain, a novel physiologic protein inhibitor of calcineurin. *The Journal of Biological Chemistry* **273**, 18325–31 (1998).
154. Sun, L. *et al.* Cabin 1, a negative regulator for calcineurin signaling in T lymphocytes. *Immunity* **8**, 703–11 (1998).
155. Youn, H., Sun, L., Prywes, R. & Liu, J. Apoptosis of T cells mediated by Ca²⁺-induced release of the transcription factor MEF2. *Science* **286**, 790–793 (1999).
156. Ermak, G., Morgan, T. E. & Davies, K. J. Chronic overexpression of the calcineurin inhibitory gene DSCR1 (Adapt78) is associated with Alzheimer's disease. *The Journal of Biological Chemistry* **276**, 38787–94 (2001).
157. Fuentes, J. J. *et al.* DSCR1, overexpressed in Down syndrome, is an inhibitor of calcineurin-mediated signaling pathways. *Human Molecular Genetics* **9**, 1681–90 (2000).
158. Kingsbury, T. J. & Cunningham, K. W. A conserved family of calcineurin regulators. *Genes & Development* **14**, 1595–604 (2000).
159. Vega, R. B., Yang, J., Rothermel, B. a, Bassel-Duby, R. & Williams, R. S. Multiple domains of MCIP1 contribute to inhibition of calcineurin activity. *The Journal of Biological Chemistry* **277**, 30401–7 (2002).
160. Hilioti, Z. & Cunningham, K. The RCN family of calcineurin regulators. *Biochem and Biophys Res Comm* **311**, 1089–1093 (2003).

161. Taigen, T., De Windt, L. J., Lim, H. W. & Molkenin, J. D. Targeted inhibition of calcineurin prevents agonist-induced cardiomyocyte hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**, 1196–201 (2000).
162. Bueno, O. F. *et al.* Impaired cardiac hypertrophic response in Calcineurin A β - deficient mice. *PNAS* **93**, 215–228, (2002).
163. Lim, H. W. *et al.* Calcineurin Expression, Activation and Function in Cardiac Pressure-Overload Hypertrophy. *Circulation* **101**, 2431–2437 (2000).
164. Ritter, O. Calcineurin in Human Heart Hypertrophy. *Circulation* **105**, 2265–2269 (2002).
165. Wilkins, B. J. *et al.* Targeted Disruption of NFATc3 , but Not NFATc4 , Reveals an Intrinsic Defect in Calcineurin-Mediated Cardiac Hypertrophic Growth. *Molecular and Cellular Biology* **22**, 7603–7613 (2002).
166. Oka, T., Dai, Y. & Molkenin, J. D. Regulation of Calcineurin through Transcriptional Induction of the calcineurin A β Promoter In Vitro and In Vivo. *Molecular and Cellular Biology* **25**, 6649–6659 (2005).
167. Grossmann, C., Ruhs, S., Seiferth, A. & Gekle, M. Interaction between mineralocorticoid receptor and cAMP/CREB signaling. *Steroids* **75**, 539–43 (2010).
168. Shein, H. & Enders, J. Transformation induced by simian virus 40 in human renal cell cultures, 1. Morphology and Growth Characteristics. *Microbiology* **48**, 1164–1172 (1962).
169. Ouvrard-Pascaud, A. *et al.* Conditional gene expression in renal collecting duct epithelial cells: use of the inducible Cre-lox system. *American Journal of Physiology. Renal Physiology* **286**, F180–7 (2004).
170. Pfau, A. *et al.* Ca²⁺ but not H₂O₂ modulates GRE-element activation by the human mineralocorticoid receptor in HEK cells. *Mol. Cell. Endocrinology* **264**, 35–43 (2007).
171. Wohlfarth, V., Drumm, K., Mildenerger, S., Freudiger, R. & Gekle, M. Protein uptake disturbs collagen homeostasis in proximal tubule-derived cells. *Kidney Int. Suppl* **84**, 103–109 (2003).
172. Schwarz, D. S., Du, T., Xu, Z., Aronin, N. & Zamore, P. D. Asymmetry in the Assembly of the RNAi Enzyme Complex. *Cell* **115**, 199–208 (2003).
173. Birmingham, A. *et al.* 3'-UTR seed matches , but not overall identity , are associated with RNAi off-targets. *Nature Methods* **3**, 199–204 (2006).
174. Jackson, A. L. *et al.* Position-specific chemical modification of siRNAs reduces “off-target” transcript silencing. *RNA* 1197–1205 (2006).doi:10.1261/rna.30706.In

175. Bustin, S. A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology* 169–193 (2000).
176. Pfaffl, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT – PCR. *Nucleic Acids Research* **29**, 16–21 (2001).
177. Smith, P. *et al.* Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid. *Analytical Biochemistry* **85**, 76–85 (1985).
178. Bradford, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248–54 (1976).
179. Compton, S. & Jones, C. Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. *Anal Biochem* **151**, 369–74 (1985).
180. Gomez-Sanchez, C. E. *et al.* Development of a Panel of Monoclonal Antibodies against the Mineralocorticoid Receptor. *Endocrinology* **147**, 1343–1348 (2006).
181. Someren, J. S., Faber, L. E., Klein, J. D. & Tumlin, J. A. Heat Shock Proteins 70 and 90 Increase Calcineurin Activity in Vitro through Calmodulin-Dependent and Independent Mechanisms. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **625**, 619–625 (1999).
182. Kupatt, C. *et al.* Heat Shock Protein 90 Transfection Reduces Ischemia-Reperfusion-Induced Myocardial Dysfunction via Reciprocal Endothelial NO Synthase Serine 1177 Phosphorylation and Threonine 495 Dephosphorylation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **24**, 1435–1441 (2004).
183. Ritter, O. *et al.* AT2 receptor activation regulates myocardial eNOS expression via the calcineurin-NF-AT pathway. *The FASEB Journal* **17**, 283–5 (2003).
184. MacFadyen, R., Barr, C. & Struthers, A. Aldosterone blockade reduces vascular collagen turnover, improves heart rate variability and reduces early morning rise in heart rate in heart failure patients. *Cardiovascular Research* **35**, 30–4 (1997).
185. Duprez, D. *et al.* Inverse relationship between aldosterone and large artery compliance in chronically treated heart failure patients. *European Heart Journal* **19**, 1371–6 (1998).
186. Struthers, A. D. Aldosterone-induced vasculopathy. *Molecular and Cellular Endocrinology* **217**, 239–241 (2004).
187. Rochette-Egly, C. Dynamic combinatorial networks in nuclear receptor-mediated transcription. *The Journal of Biological Chemistry* **280**, 32565–8 (2005).
188. Levin, E. R. Bidirectional signaling between the estrogen receptor and the epidermal growth factor receptor. *Molecular Endocrinology* **17**, 309–17 (2003).

189. Edwards, D. P. Regulation of signal transduction pathways by estrogen and progesterone. *Annu Rev Physiol* **67**, 335–76 (2005).
190. Cohen, P. The Structure and Regulation of Protein Phosphatases. *Annu Rev Biochem* 453–508 (1989).
191. Burkard, N. *et al.* Targeted proteolysis sustains calcineurin activation. *Circulation* **111**, 1045–53 (2005).
192. Leopold, J., Cap, A., Scribner, A., Stanton, R. & Loscalzo, J. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency promotes endothelial oxidant stress and decreases endothelial nitric oxide bioavailability. *The FASEB Journal* **15**, 1771–3 (2001).
193. Salvemini, F. *et al.* Enhanced glutathione levels and oxidoresistance mediated by increased glucose-6-phosphate dehydrogenase expression. *The Journal of Biological Chemistry* **274**, 2750–7 (1999).
194. Tian, W. N. *et al.* Importance of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity for cell growth. *The Journal of Biological Chemistry* **273**, 10609–17 (1998).
195. Tian, W. *et al.* Importance of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in cell death Importance of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in cell death. *Am J Physiol Cell Physiol* **276**, C1121–C1131 (1999).
196. Fahlke, C., Linke, W., Raßler, B. & Wiesner, R. *Taschenatlas Physiologie*. 166 (2008).
197. Cayatte, a J., Palacino, J. J., Horten, K. & Cohen, R. a Chronic inhibition of nitric oxide production accelerates neointima formation and impairs endothelial function in hypercholesterolemic rabbits. *Arteriosclerosis and Thrombosis* **14**, 753–9 (1994).
198. Creager, M. *et al.* L-arginine improves endothelium-dependent vasodilation in hypercholesterolemic humans. *The Journal of Clinical Investigation* **90**, 1248–53 (1992).
199. Vásquez-Vivar, J. *et al.* Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence of cofactors. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 9220–5 (1998).
200. Palmer, R., Ashton, D. & Moncada, S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* **333**, 664–666 (1988).
201. Szabó, C., Ischiropoulos, H. & Radi, R. Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics. *Nature* **6**, 662–80 (2007).
202. Uittenbogaard, a, Shaul, P. W., Yuhanna, I. S., Blair, A. & Smart, E. J. High density lipoprotein prevents oxidized low density lipoprotein-induced inhibition of endothelial nitric-oxide synthase localization and activation in caveolae. *The Journal of Biological Chemistry* **275**, 11278–83 (2000).

203. Moriuchi, H. & Masako Moriuchi, and A. S. F. Nuclear Factor-IcB Potently Up-Regulates the Promoter Activity of RANTES, a Chemokine That Blocks HIV Infection'. *The Journal of Immunology* **158**, 3483–3491 (1997).
204. Iñiguez, M., Martinez-Martinez, S., Punzón, C., Redondo, J. M. & Fresno, M. An essential role of the nuclear factor of activated T cells in the regulation of the expression of the cyclooxygenase-2 gene in human T lymphocytes. *The Journal of Biological Chemistry* **275**, 23627–35 (2000).
205. Passier, R. *et al.* CaM kinase signaling induces cardiac hypertrophy and activates the MEF2 transcription factor in vivo. *The Journal of Clinical Investigation* **105**, 1395–1406 (2000).
206. Rupprecht, R. *et al.* Transactivation and synergistic properties of the mineralocorticoid receptor: relationship to the glucocorticoid receptor. *Molecular Endocrinology* **7**, 597–603 (1993).
207. Arriza, J. L., Simerly, R. B., Swanson, L. W. & Evans, R. M. The neuronal mineralocorticoid receptor as a mediator of glucocorticoid response. *Neuron* **1**, 887–900 (1988).
208. Pratt, W. B. & Toft, D. O. Regulation of Signaling Protein Function and Trafficking by the hsp90/hsp70-Based Chaperone Machinery. *Experimental Biology and Medicine* **228**, 111–133 (2008).
209. Höhfeld, J., Cyr, D. M. & Patterson, C. From the cradle to the grave: molecular chaperones that may choose between folding and degradation. *EMBO Reports* **2**, 885–90 (2001).
210. Richter, K. & Buchner, J. Hsp90: chaperoning signal transduction. *J Cell Physiol* **188**, 281–90 (2001).
211. Smith, D. F. Chaperones in progesterone receptor complexes. *Cell & Developmental Biology* **11**, 45–52 (2000).
212. Cheung, J. & Smith, D. F. Molecular Chaperone Interactions with Steroid Receptors: an Update. *Molecular Endocrinology* **40**, 939–946 (2000).
213. Galigniana, M. D., Harrell, J. M., O'Hagen, H. M., Ljungman, M. & Pratt, W. B. Hsp90-binding immunophilins link p53 to dynein during p53 transport to the nucleus. *The Journal of Biological Chemistry* **279**, 22483–9 (2004).
214. Galigniana, M. D., Radanyi, C., Renoir, J. M., Housley, P. R. & Pratt, W. B. Evidence that the peptidylprolyl isomerase domain of the hsp90-binding immunophilin FKBP52 is involved in both dynein interaction and glucocorticoid receptor movement to the nucleus. *The Journal of Biological Chemistry* **276**, 14884–9 (2001).
215. Fukuyo, Y., Hunt, C. R. & Horikoshi, N. Geldanamycin and its anti-cancer activities. *Cancer letters* **290**, 24–35 (2010).

216. Neckers, L., Schulte, T. W. & Mimnaugh, E. Geldanamycin as a potential anti-cancer agent: its molecular target and biochemical activity. *Investigational New Drugs* **17**, 361–73 (1999).
217. Radanyi, C., Chambraud, B. & Baulieu, E. E. The ability of the immunophilin FKBP59-HBI to interact with the 90-kDa heat shock protein is encoded by its tetratricopeptide repeat domain. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**, 11197–201 (1994).
218. Owens-Grillo, J. K. *et al.* A model of protein targeting mediated by immunophilins and other proteins that bind to hsp90 via tetratricopeptide repeat domains. *The Journal of Biological Chemistry* **271**, 13468–75 (1996).
219. Nemoto, T., Ohara-Nemoto, Y., Sato, N. & Ota, M. Dual roles of 90-kDa heat shock protein in the function of the mineralocorticoid receptor. *Journal of Biochemistry* **113**, 769–75 (1993).
220. Caamaño CA, Morano MI, Patel PD, Watson SJ, A. H. A bacterially expressed mineralocorticoid receptor is associated in vitro with the 90-kilodalton heat shock protein and shows typical hormone- and DNA-binding characteristics. *Biochemistry* **32**, 8589–95 (1993).
221. Jaglaquier S, Mesnier D, Lager JL, A. G. Putative steroid binding domain of the human mineralocorticoid receptor, expressed in E. coli in the presence of heat shock proteins shows typical native receptor characteristics. *J Steroid Biochem Mol Biol* **57**, 43–50 (1996).
222. Couette, B. *et al.* Folding requirements of the ligand-binding domain of the human mineralocorticoid receptor. *Molecular Endocrinology* **12**, 855–63 (1998).
223. Panse S, Dong L, Burian A, Carus R, Schutkowski M, Reimer U, S.-M. J. Profiling of generic anti-phosphopeptide antibodies and kinases with peptide microarrays using radioactive and fluorescence-based assays. *Mol Divers* **8**, 291–9 (2004).
224. Thiele, A. *et al.* Parvulin 17 promotes microtubule assembly by its peptidyl-prolyl cis/trans isomerase activity. *Journal of Molecular Biology* **411**, 896–909 (2011).
225. Piwien-Pilipuk, G. & Galigniana, M. D. Tautomycin inhibits phosphatase-dependent transformation of the rat kidney mineralocorticoid receptor. *Molecular and Cellular Endocrinology* **144**, 119–30 (1998).
226. Hellal-Levy, C., Fagart, J., Souque, A. & Rafestin-Oblin, M. E. Mechanistic aspects of mineralocorticoid receptor activation. *Kidney International* **57**, 1250–5 (2000).
227. Thiele, A. *et al.* Profiling of Enzymatic Activities Using Peptide Arrays. *Organic Chemistry* **8**, 1–8 (2011).

228. Shibasaki, F., Price, E. R., Milan, D. & F, M. Role of kinases and the phosphatase calcineurin in the nuclear shuttling of transkription factor NF-AT4. *Letters to Nature* **382**, 370–373 (1996).
229. Pedram, A. *et al.* Estrogen inhibits cardiac hypertrophy: role of estrogen receptor-beta to inhibit calcineurin. *Endocrinology* **149**, 3361–9 (2008).
230. Bueno, O. F. *et al.* Calcineurin Abeta gene targeting predisposes the myocardium to acute ischemia-induced apoptosis and dysfunction. *Circulation Research* **94**, 91–9 (2004).

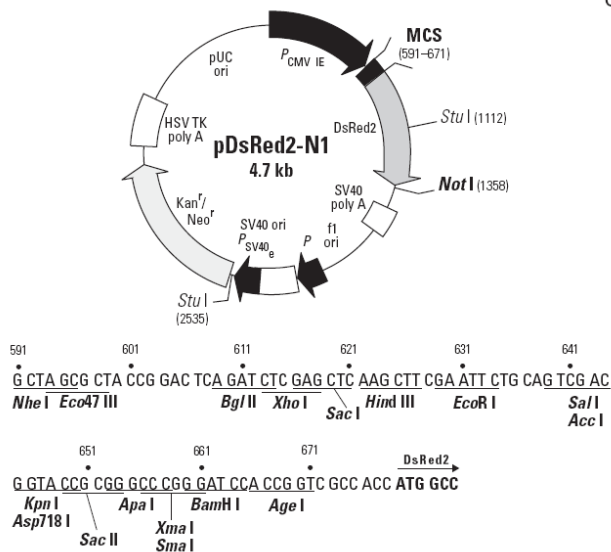
Anhang

Vektorkarten

pDsRed2-N1 (BD Clontech)

pDsRed2-N1 Vector Information

PT3604-5
Cat. No. 632406

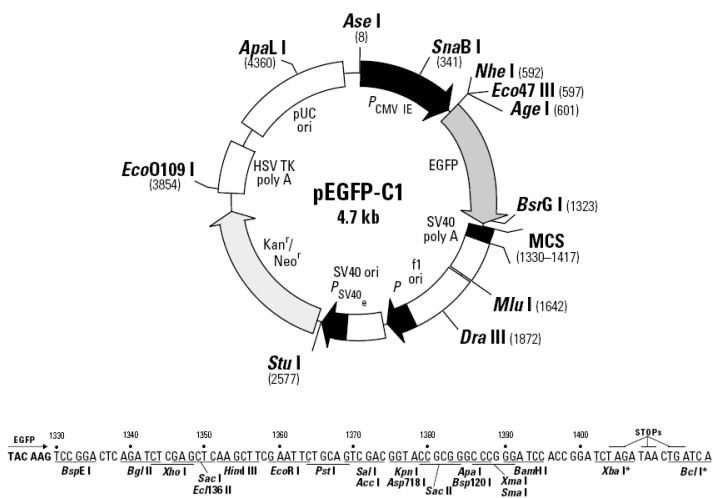


Restriction Map and Multiple Cloning Site (MCS) of pDsRed2-N1 Vector. Unique restriction sites are in bold. The *Not* I site follows the DsRed2 stop codon.

pEGFP-C1 (BD Clontech)

pEGFP-C1 Vector Information
GenBank Accession #: U55763

PT3028-5
Catalog #6084-1

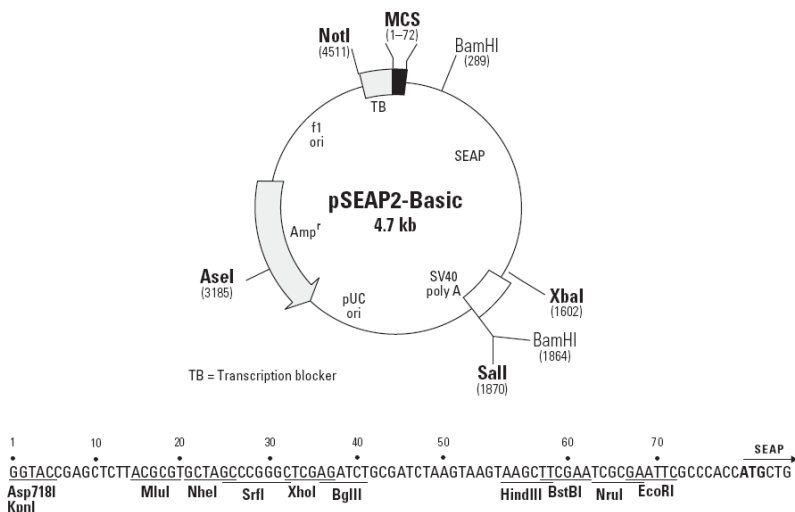


Restriction Map and Multiple Cloning Site (MCS) of pEGFP-C1. All restriction sites shown are unique. The *Xba* I and *Bcl* I sites (*) are methylated in the DNA provided by BD Biosciences Clontech. If you wish to digest the vector with these enzymes, you will need to transform the vector into a *dam*⁻ host and make fresh DNA.

pSEAP-basic (BD Clontech)

pSEAP2-Basic Vector Information
 GenBank Accession #: U89937

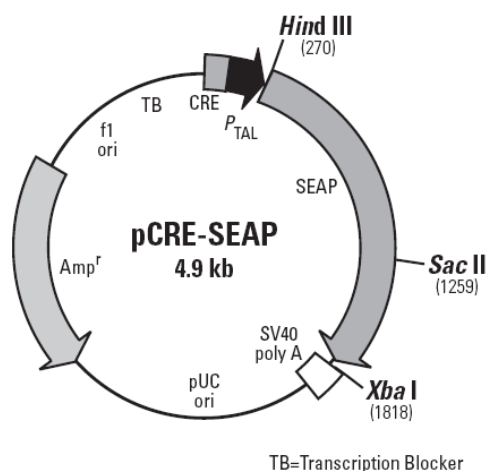
PT3075-5
 Cat. Nos. 631715 & 631735



pCRE-SEAP (BD Clontech)

pCRE-SEAP Vector Information
 GenBank Accession No.: Submission in progress.

PT3288-5
 Sold as part of Cat. No. 631910

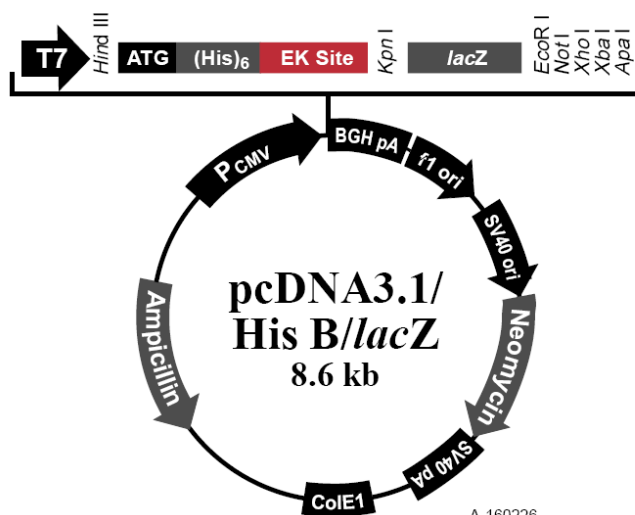


Restriction Map of pCRE-SEAP. All restriction sites are unique.

pcDNA3.1/His B/lacZ (Invitrogen, Karlsruhe)

Comments for pcDNA3.1/His B/lacZ
 8578 nucleotides


CMV promoter: bases 209-863
 T7 promoter/priming site: bases 863-882
 ATG initiation codon: bases 920-922
 Polyhistidine region: bases 932-949
 Anti-Xpress™ Antibody epitope: bases 989-1012
 Enterokinase recognition site: bases 998-1012
 LacZ ORF: bases 1034-4090
 pcDNA3.1/BGH reverse priming site: bases 4168-4185
 BGH polyadenylation signal: bases 4167-4381
 f1 origin: bases 4444-4857
 SV40 promoter and origin: bases 4922-5247
 Neomycin resistance gene: bases 5283-6077
 SV40 polyadenylation signal: bases 6093-6332
 Col E1 origin: bases 6764-7437
 Ampicillin resistance gene: bases 7582-8443



Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit, die vorliegende Dissertationsschrift selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmitteln angefertigt zu haben. Die wörtlich oder inhaltlich aus öffentlichen Schriften übernommenen Stellen sind als solche kenntlich gemacht. Mit der vorliegenden Arbeit bewerbe ich mich erstmals um die Erlangung eines Doktorgrades.

Halle (Saale), April 2013

Anja Seiferth

Danksagung

Ich möchte all jenen danken, die mich bei der Anfertigung dieser Promotionsarbeit unterstützt haben.

Ich bedanke mich bei Prof. Schutkowski, der sofort bereit war mich als Doktorvater zu betreuen sowie für dessen Unterstützung bei der Eröffnung und Durchführung des Promotionsverfahrens.

Ein besonderer Dank gilt Prof. Gekle und Juniorprofessorin Claudia Grossmann, die mir dieses interessante Thema im Rahmen des Wilhelm-Roux-Forschungsprogrammes der medizinischen Fakultät zur selbstständigen Bearbeitung zur Verfügung gestellt haben. Ich danke Ihnen sowie Postdoc Stefanie Ruhs für die liebe Betreuung, die ausführlichen Diskussionen und die ständige Motivation während der gesamten Promotionszeit.

Ich bedanke mich bei der gesamten Arbeitsgruppe des Julius-Bernstein-Instituts für Physiologie. Alle haben zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Ein besonderer Dank gilt Sigrid Mildenerger, Nicole Strätz, Sindy Raabe, Bettina Schneider und Katja Schumann für die Hilfe in labortechnischen Angelegenheiten.

Für hilfreiche Ratschläge und Diskussionen danke ich allen Teilnehmern des Wilhelm-Roux-Programmes, deren Ziel die Analyse der Ausbildung von Signalnetzen auf dem Weg von der Zellmembran zum Zellkern - Konvergenz auf Komponenten des klassischen cAMP/CREB-Signalwegs, war.

Außerdem danke ich meiner Familie, besonders meinem Mann René sowie meiner Anne und meiner Claudia für die seelische Unterstützung während der ganzen letzten Jahre!!!

Vielen Dank!

Lebenslauf

Name: Anja Seiferth
Geburtsdatum/-ort: 12. Juli 1983 in Berlin-Lichtenberg
Frühere Familiennamen: Seyfarth und Schmiedel
Nationalität: deutsch
Familienstand: verheiratet
Kinder: Fiona Maria (Nov. 2007), Rosalie Sofia (Apr. 2012)

Werdegang

1990 - 1994 Grundschole in Altenberg
1994 - 1996 Mittelschole in Reibitz
1996 - 2002 Ehrenberg-Gymnasium in Delitzsch
Allgemeine Hochschulreife; Abschlussnote: „gut“ (1,6)
Okt. 2002 - Okt. 2007 **Biochemie-Studium an der Martin-Luther-Universität in Halle**
Abschluss: Diplom-Biochemikerin
Vertiefungsrichtungen: Technische Biochemie und Genetik
Abschlussnote: „sehr gut“ (1,5)
Diplomarbeit am Institutsbereich Genetik, Institut für Biologie der MLU Halle
Prof. Dr. U. Bonas
Thema: Molekulare Analyse ausgewählter Effektorproteine von *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*
Abschlussnote: „gut“ (1,7)
Forschungsgruppenpraktikum (6-wöchig)
Institut für Biochemie und Biotechnologie der MLU Halle
Thema:
1. Herstellung von Expressionskonstrukten für PTH (1-84)-Fusionsproteine mit eCFP und DsRed in pET-Vektoren
2. Expressionstests
3. Expression und Reinigung der SUMO-Protease mittels IMAC
Nov. 2007 - Nov. 2008 Elternzeit
Dez. 2008- Mai 2009 wissenschaftliche Hilfskraft am Institutsbereich Genetik, Institut für Biologie der MLU Halle
Juni 2009 - April 2012 **Promotion am Julius-Bernstein-Institut für Physiologie, Medizinische Fakultät der MLU in Halle**
Prof. Dr. M. Gekle
Promotionsthema: Analyse des Mineralokortikoid-Rezeptors-Calcineurin-Signalnetzwerkes
April 2012 - April 2013 Elternzeit

Publikationen

- 1) **Seiferth A**, Ruhs S, Mildenerger S, Gekle M, Grossmann C. The phosphatase calcineurin PP2BA β mediates part of mineralocorticoid receptor transcriptional activity. FASEB J. 2012 Jun; 26(6):2327-37.
- 2) Grossmann C, Wuttke M, Ruhs S, **Seiferth A**, Mildenerger S., Rabe S, Schwerdt G, Gekle M. Mineralocorticoid receptor inhibits CREB signaling by calcineurin activation. FASEB J. 2010 Jun; 24(6):2010-9).
- 3) Grossmann C, Ruhs S., **Seiferth A.**, Gekle M. Interaction between mineralocorticoid receptor and cAMP/CREB signaling. Steroids 2010: 75 (8-9) 539-43.
- 4) Robert Szczesny, Daniela Büttner, Lucia Escolar, Sebastian Schulze, **Anja Seiferth** and Ulla Bonas. Suppression of the AvrBs1-specific hypersensitive response by the YopJ effector homolog AvrBsT from Xanthomonas depends on a SNF1-related kinase. New Phytologist (2010): 187 (4): 1058-74.