

Aus dem Bereich Medizinische Biochemie und Molekularbiologie
Theoretische Medizin und Biowissenschaften
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

**Die calciumabhängige Phosphatase Calcineurin
reguliert die Genexpression nach Stimulation eines
 $G\alpha_q$ -gekoppelten Designerrezeptors in
HEK293-Zellen**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes

2019

vorgelegt von

Tobias Schmidt
geboren am 13.09.1990 in St.Wendel

Tag des Kolloquiums:

Dekan: Prof. Dr. M.D. Menger

Gutachter: Prof. Dr. G. Thiel

Inhaltsverzeichnis

I.	Abkürzungsverzeichnis	IV
II.	Zusammenfassung	1
III.	Summary	2
1.	Einleitung	3
1.1.	G-Protein gekoppelte Rezeptoren	3
1.1.1.	$G\alpha_s$ / $G\alpha_i$ - gekoppelte Rezeptoren	4
1.1.2.	$G\alpha_q$ - gekoppelte Rezeptoren	5
1.2.	$G\alpha_q$ -gekoppelter Designerrezeptor	6
1.3.	Wirkung der Stimulation des Designerrezeptors $G\alpha_q$ auf Transkriptionsebene	6
1.3.1.	Transkriptionsfaktor Egr-1	7
1.3.2.	Transkriptionsfaktor AP-1	8
1.4.	Regulation auf Transkriptionsebene	9
1.5.	Calcineurin	10
1.6.	Fragestellung der Arbeit	10
2.	Material und Methoden	11
2.1.	Verwendete Geräte und Gebrauchsgegenstände	11
2.2.	Chemikalien	12
2.3.	Lösungen	13
2.4.	Plasmide zur Herstellung von Viren zum lentiviralen Gentransfer	14
2.4.1.	Verpackungsplasmid $\Delta 8.91$	14
2.4.2.	Expressionsplasmid pCMVG	15
2.4.3.	Transferplasmide	15
2.4.3.1	Verwendete lentivirale Transferplasmide	16
2.4.3.2.	Lentivirale Reporterplasmide	17
2.4.3.3.	Designerrezeptor pHA- $R\alpha_q$	18
2.5.	Zelllinien (HEK293/T17-Zelle)	19
2.6.	Zellkultur	19
2.7.	Passagierung der Zellen	19
2.8.	Lentiviraler Gentransfer und Reporteranalyse	19
2.8.1.	Herstellung von Lentiviren mit Calciumphosphat-Transfektion	19

2.8.2.	Abnahme der Infektiösen Viren	20
2.8.3.	Lentivirale Infektion	20
2.8.4.	Serumreduktion	21
2.8.5.	Stimulation	21
2.8.6.	Reportergenanalyse	21
2.9.	Messung der Luziferaseaktivität	24
2.9.1.	Zellernte	24
2.9.2.	Aufschluss der Zellen	24
2.9.3.	Luziferaseassay	24
2.9.4.	Bicinchoninsäure (BCA) Assay	24
2.10.	Bestimmung der relativen Luziferase-Aktivität	25
2.11.	Statistik	25
3.	Ergebnisse	26
3.1.	In HEK293-Zellen wird die Egr-1-abhängige Transkription durch die Phosphatase Calcineurin nach Rq-Stimulation gehemmt	26
3.1.1.	Calcineurin hemmt die Egr-1-Promotoraktivität nach Rq-Stimulation	28
3.1.2.	Die nach Rq-Stimulation bewirkte Hemmung des Egr-1-Promotors durch Calcineurin ist SRE-abhängig	28
3.1.3.	Die durch Calcineurin bedingte Hemmung der SRE-regulierten Transkription ist unabhängig vom SRF	31
3.1.4.	Das transkriptionelle Aktivierungspotential des TCF Elk-1 wird durch Calcineurin vermindert	33
3.1.5.	Die Expression von Calcineurin hemmt auch die CRE-vermittelte Transkription nach Rq-Stimulation	35
3.1.6.	Calcineurin hemmt die transkriptionelle CREB-Aktivität nach Stimulation von Rq und nach Expression der katalytischen Untereinheit der Proteinkinase A	36
3.2.	Die Expression von Δ CnA sowie von CalcineurinB hemmt die AP-1-abhängige Transkription nach Rq-Stimulation	40
3.2.1.	Δ CnA vermindert die c-Jun-Promotoraktivität und das transkriptionelle Aktivierungspotential von c-Jun nach Rq-Stimulation	43
3.2.2.	Δ CnA vermindert die c-Fos-Promotoraktivität sowie das transkriptionelle Aktivierungspotential von c-Fos nach Stimulation von Rq	46

4.	Diskussion	49
4.1.	Calcineurin - Struktur	49
4.2.	Methode	49
4.3.	Designerrezeptor	50
4.4.	Modellgen: c-Fos	50
	4.4.1. Auswirkung von Δ CnA auf SRE	51
	4.4.2. Auswirkungen von Δ CnA auf CRE	52
4.5.	Auswirkungen von Δ CnA auf AP-1	53
4.6.	Direkte Auswirkung von Calcineurin auf die MAP-Kinasen	54
5.	Literaturverzeichnis	55
6.	Publikationen	64
7.	Danksagung	65
8.	Lebenslauf	66

I. Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
A239G	Mutation an Position 239: Austausch Alain (A) gegen Glycin (G)
Ach	Acetylcholin
AP-1	Aktivator-Protein-1
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchoninsäure
bZIP	basischer Leucin-Zipper
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
cDNA	<i>copy</i> -DNA
CM	Calmodulin
cm ²	Quadratcentimeter
CMV	Zytomegalievirus
CnA	CalcineurinA
CnB	CalcineurinB
CNO	Clozapin N-oxid
CRE	<i>cAMP response element</i>
CREB	<i>cAMP response element-binding protein</i>
DAG	Diacylglycerin
DNA	Desoxyribonukleinsäure

EBS	<i>Ets binding site</i>
eEf-1	eukaryotischer Elongationsfaktor-1
Egr-1	<i>early growth response protein-1</i>
eIF-2	eukaryotischer Initiationsfaktor-2
ER	endoplasmatisches Retikulum
Erk	<i>extracellular-signal regulated kinase</i>
et al.	<i>et alii</i> - und andere
FCS	<i>fetal calf serum</i> - fetales Kälberserum
GDP	Guanosindiphosphat
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GPCR	G-protein gekoppelter Rezeptor
GTP	Guanosintriphosphat
G _{ai}	GPCR mit inhibitorischer α -Untereinheit
G _{aq}	GPCR mit α -Untereinheit vom Typ-q
G _{as}	GPCR mit stimulierender α -Untereinheit
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
HBSS	<i>„Hank's Balanced Salt Solution“</i>
HEK293	<i>human embryonic kidney</i> - Zelllinie
IEG	<i>immediate early gene</i>
IL-2	Interleukin-2

IP ₃	Inositoltriphosphat
kDa	Kilodalton
LTR	<i>long terminal repeats</i>
M	Molar
M3R	muscarinerger Acetylcholinrezeptor, Typ M3
MAP	<i>mitogen-activated protein</i>
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MSK	<i>mitogen and stress activated protein kinase</i>
NFAT	<i>nuclear factor of activated T-cells</i>
NLS	<i>nuclear localization signal</i> - Kernlokalisierungssignal
NLSC α	katalytische Untereinheit der PKA mit Kernlokalisationssequenz
nm	Nanometer
ORF	offener Leserahmen
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> - Phosphatgepufferte Salzlösung
Pi	anorganisches Phosphat
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5 Bisphosphat
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PLC β	Phospholipase C β

PPi	Pyrophosphat
RNA	Ribonukleinsäure
SRE	<i>serum response element</i>
SRF	<i>serum response faktor</i>
TCF	<i>ternary-complex-factor</i>
TRE	<i>12-O- Tetradecanoylphorbol-13-acetate DNA response element</i>
VSV	Vesicular-Stomatitis-Virus
WPRE	Woodchuck Hepatitis Virus Posttranscriptional Regulatory Element
Y149C	Mutation an Position 149: Austausch von Tyrosin (Y) gegen Cystein (C)
Δ CnA	konstitutiv aktive Calcineurin-Mutante
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
μ m	Mikrometer
μ M	Mikromolar
Ψ	Verpackungssignal

II. Zusammenfassung

G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCR) gehören zur größten Gruppe von Membranrezeptoren, welche eine wichtige Rolle für die interzelluläre Kommunikation spielen. GPCR-Aktivierung beeinflusst durch intrazelluläre Signalweiterleitung Enzymaktivitäten und verändert die Genexpression. Dies geschieht unter anderem durch die Aktivierung der MAP-Kinasen. Es existieren viele unterschiedliche GPCRs mit jeweils mehreren Liganden, wodurch es schwierig ist, eine Signalkaskade isoliert zu betrachten.

Um eine GPCR-Signalkaskade isoliert zu untersuchen, wurde in der vorliegenden Arbeit ein Gαq-gekoppelter Designerrezeptor (Rαq) verwendet, der ausschließlich durch die synthetische Substanz CNO aktiviert werden kann. Transgene wurden mittels lentiviralem Gentransfer in das Chromatin von HEK293-Zellen integriert. Vorangegangene Arbeiten zeigten, dass die Rαq-Stimulation eine gesteigerte Expression von Genen mit einem *serum response element* (SRE) oder *cAMP response element* (CRE) in der Promotorregion zur Folge hat. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass diese Signalweiterleitung über die Kaskade der MAP-Kinasen vermittelt wird. Eine Vielzahl von Mechanismen vermag diese Signalkaskade zu regulieren. Unter anderem kann die Aktivität von Phosphatasen gezielt die Kaskade der MAP-Kinasen manipulieren. Ein bis dahin noch nicht untersuchter Kandidat dafür ist die Ca^{2+} /Calmodulin abhängige Phosphatase Calcineurin.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, den Einfluss einer konstitutiv aktiven Form der Ca^{2+} /Calmodulin-abhängigen Phosphatase Calcineurin (ΔCnA) auf die Genexpression nach Rαq-Stimulation zu untersuchen. Um diese zu quantifizieren, wurden verschiedene Luziferase-Reportergene exprimiert. Dabei stand die Expression der Luziferase unter Kontrolle von Promotoren mit CRE oder SRE, Teilelementen davon oder auch von Transkriptionsfaktoren, deren Expression durch SRE oder CRE vermittelt wird (c-Fos, c-Jun, AP-1, Egr-1).

Nach Rαq-Stimulation resultierte die Expression von ΔCnA in einer verminderten CRE- und SRE-vermittelten Transkription. Es kam außerdem zur Hemmung der biologischen Aktivität von CREB, Elk-1, c-Fos und c-Jun, womit auch die AP-1- und Egr-1-Promotoraktivität sank.

Zum Wirkmechanismus von ΔCnA auf die verschiedenen Elemente existieren mehrere Hypothesen. Möglich ist die direkte Phosphataseaktivität an Transkriptionsfaktoren, was für Elk-1 bereits beschrieben ist. Eine generelle Wirkung an der Kaskade der MAP-Kinasen ist ein ebenso denkbarer Erklärungsansatz.

III. Summary

G-protein coupled receptors (GPCR) belong to the largest group of membrane receptors which are crucial for intercellular communication. Activation results in changes of enzyme-activity or gene-expression, occurring for example via the activation of MAP-kinases. One type of GPCR can be activated by a variety of different ligands what makes it difficult to observe an isolated signalling pathway with natural ligands.

In order to handle this problem, a Gαq-coupled designer receptor (Rαq) that was exclusively activated by synthetic CNO was used. Transgenes were integrated in the chromatin of HEK293 cells via lentiviral gene transfer. Previous studies showed that Rαq-stimulation increases the expression of genes with serum response element- (SRE) or cAMP response element- (CRE) containing promoters. Furthermore it was shown that this signaling is mediated by the activation of MAP-kinases. Several mechanisms may regulate this pathway like the activity of phosphatases. One possible candidate therefore is the Ca²⁺/calmodulin dependent phosphatase calcineurin.

The objective of this study was to investigate the influence of a constitutive active version of Ca²⁺/calmodulin-dependent phosphatase calcineurin (ΔCnA) upon the activity of gene expression, following Rαq-stimulation. In order to quantify them, specific promoter/luciferase reporter genes were expressed. Luciferase-expression was controlled by promoters containing regulatory elements like CRE or SRE fragments of them or transcription factors that are expressed under control of SRE or CRE.

ΔCnA-expression has been shown to attenuate the signalling between Rαq-stimulation and CRE- or SRE-dependent transcription. Furthermore biological activity of CREB, Elk-1, c-Fos and c-Jun were reduced following a degraded AP-1 and Egr-1-dependent gene expression.

Several mechanisms may explain this effect like direct phosphatase-action on transcription factors what already has been described for the TCF Elk-1. Another possibility is the general manipulation of the MAP-kinase pathway.

1. Einleitung

Bei der Evolution komplexer Organismen bildete der Übergang von einzelligen zu mehrzelligen Lebewesen einen wichtigen Schritt. Die Bildung von Lebensgemeinschaften einzelner, gleichartiger Zellen ergab einen Überlebensvorteil, woraus sich im Laufe der Evolution komplexe, mehrzellige Organismen entwickelten, bei denen unterschiedliche Arten von Zellen spezifische Aufgaben erfüllten. Die Voraussetzung für eine solche arbeitsteilige Entwicklung war die Etablierung einer interzellulären Kommunikation. Chemische Mediatoren fungieren dabei als Botenstoff zwischen den Zellen, wobei Mediatoren, welche die Plasmamembran nicht überwinden können, als Ligand an oberflächliche Membranrezeptoren binden. Nachdem der Ligand an den extrazellulären Teil eines Rezeptors gebunden hat, wird eine intrazelluläre Signalkaskade eingeleitet, an deren Ende die Aktivität von Proteinen, Enzymen oder die Expression von Genen beeinflusst werden kann. Um eine hohe Spezifität der interzellulären Kommunikation zu ermöglichen, ist eine Vielzahl unterschiedlicher Kommunikationswege sowie ein hohes Maß an Regulation notwendig (Krauss et al., 2008; Hancock et al., 2010; Gompertz et al., 2009).

1.1. G-Protein-gekoppelte Rezeptoren

Die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) bilden mit etwa 800 identifizierten Genen die größte Gruppe der Membranrezeptoren. GPCRs bestehen aus sieben Transmembrandomänen, die durch ein großes Spektrum verschiedener Liganden von Katecholaminen wie Adrenalin bis hin zu Chemokinen wie Interleukin-8 aktiviert werden (Lagerström & Schiöth, 2008). Extrazelluläre Schleifen des GPCR dienen der Ligandenbindung, wobei intrazelluläre Schleifen der Rekrutierung heterotrimerer G-Proteine dienen. Neben kleinen G-Proteinen wie Rho oder Ran und den Translationsfaktoren wie eIF-2 und eEF-1 bilden die heterotrimeren G-Proteine eine Untergruppe aus der Familie der G-Proteine und bestehen immer aus einer α -, β -, und γ -Untereinheit. Für ein hohes Maß an Heterogenität sorgen insgesamt 35 verschiedene Gene, welche für α -, β - und γ -Untereinheiten codieren. Im inaktiven Zustand liegt das heterotrimere G-Protein als trimerer Komplex vor, wobei die α -Untereinheit Guanosindiphosphat (GDP) gebunden hat. Bindet ein Ligand an die extrazelluläre Seite des GPCR, kommt es zu einer Konformationsänderung, wobei das an die α -Untereinheit gebundene GDP durch Guanosintriphosphat (GTP) ersetzt wird. Dies führt zur Dissoziation des trimeren Komplexes in die GTP-gebundene α -Untereinheit sowie in die β/γ -Untereinheit (Kobilka, 2013). Sowohl die GTP- α -Untereinheit als auch die β/γ -Untereinheit sind in der Lage, Effektorproteine zu aktivieren, wodurch weitere Signalkaskaden eingeleitet werden. Eine intrinsische GTPase-Aktivität der α -Untereinheit sorgt für die Spaltung des GTP in GDP und anorganisches Phosphat (P_i), wodurch es zur Beendigung des Signals und zur Zusammenlagerung des trimeren Komplexes kommt (Kobilka et al., 2013; Lefkowitz et al., 2013). Die Signalkaskade, die der Aktivierung des GPCRs folgt, ist durch die α -Untereinheit im

heterotrimeren G-Protein determiniert, woran man diese in die drei Hauptgruppen $G\alpha_s$, $G\alpha_i$ und $G\alpha_q$ einteilt (Hermans, 2003).

1.1.1. $G\alpha_s$ / $G\alpha_i$ - gekoppelte Rezeptoren

GPCRs, die mit stimulierenden α -Untereinheiten gekoppelt sind ($G\alpha_s$), finden sich u.a. bei Geruchssinneszellen, Serotonin-, Glukagon- und Adrenalinrezeptoren. Der Ligand, welcher als *first messenger* bezeichnet wird, aktiviert den GPCR, woraufhin das Effektorprotein Adenylatzyklase durch die GTP- α -Untereinheit aktiviert wird. Die Adenylatzyklase katalysiert die Umwandlung von Adenosintriphosphat (ATP) zu zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) und Pyrophosphat (PP_i). cAMP initiiert als *second messenger* eine Vielzahl intrazellulärer Prozesse, wie der Aktivierung der cAMP-abhängigen Proteinkinase A (PKA), die die Transkription bestimmter Gene zur Folge haben kann (Cooper DM et al., 2003; Gilman AG, 1995). cAMP-responsive Gene enthalten in ihrer Promotorregion die *cAMP response element* (CRE)-Sequenz. Diese wird durch den Transkriptionsfaktor CREB (*cAMP response element-binding protein*) aktiviert, welcher cAMP-abhängig durch die PKA phosphoryliert und aktiviert wird. Dem gegenüber stehen GPCR, die mit inhibitorischen α -Untereinheiten gekoppelt sind ($G\alpha_i$). Aktivierte α_i -Untereinheiten hemmen die Adenylatzyklase, wodurch der cAMP-Spiegel sinkt (Lefkowitz et al., 2013).

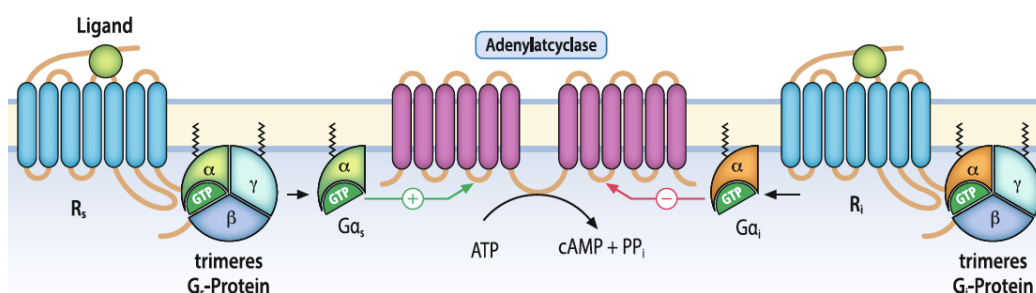


Abbildung 1: G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) mit stimulierendem (R_s) und inhibitorischem (R_i) Einfluss auf das Effektorprotein Adenylatzyklase

Dargestellt sind GPCRs mit stimulierenden ($G\alpha_s$) und inhibitorischen ($G\alpha_i$) G-Proteinen. Nach Aktivierung des $G\alpha_s$ -gekoppelten Rezeptors mit Austausch von Guanosindiphosphat (GDP) durch Guanosintriphosphat (GTP) an der α -Untereinheit des trimeren G-Proteins kommt es zur Aktivierung des Effektorproteins Adenylatzyklase. Diese katalysiert die Umwandlung von Adenosintriphosphat (ATP) zu zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) und Pyrophosphat (PP_i). Die Aktivierung des $G\alpha_i$ -gekoppelten Rezeptors sorgt nach Austausch von GDP durch GTP an der α -Untereinheit für die Inhibition des Effektorproteins Adenylatzyklase.

Abbildung entnommen aus: Löffler & Petrides: Biochemie und Pathobiochemie; 9. Auflage (2014).

1.1.2. G_{α_q} -gekoppelte Rezeptoren

GPCRs für Mediatoren wie Acetylcholin, Histamin oder Serotonin sind mit G_{α_q} -Proteinen gekoppelt. Der Ligand aktiviert als *first messenger* den GPCR, wodurch es zur Rekrutierung des Effektorproteins Phospholipase C β (PLC β) kommt. PLC β katalysiert die Hydrolyse des membranständigen Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphates (PIP $_2$) zum löslichen Inositol-(1,4,5)-trisphosphat (IP $_3$) und dem in der Membran verweilenden Diacylglycerin (DAG). Die *second messenger* IP $_3$ und DAG aktivieren eine Vielzahl von Signalwegen (Fukami et al., 2002). IP $_3$ bindet und aktiviert ionotrope IP $_3$ -Rezeptoren am endoplasmatischen Retikulum (ER). Dabei handelt es sich um ligandengesteuerte Ca $^{2+}$ -Kanäle. Durch den Ca $^{2+}$ -Konzentrationsgradienten zwischen ER und Zytosol kommt es zum Ca $^{2+}$ -Ausstrom aus dem ER in das Zytosol, wodurch die intrazelluläre Ca $^{2+}$ -Konzentration von etwa 10^{-7} mol/l auf 10^{-5} mol/l steigt. Es existieren viele Ca $^{2+}$ -responsive Proteine, wie Calmodulin, welche eine Interaktion mit Enzymen und Proteinen möglich machen (Hoeftlich et al., 2002). Des Weiteren kommt es zur Aktivierung Ca $^{2+}$ -abhängiger Kinasen. Zusammen mit DAG ermöglicht die erhöhte intrazelluläre Ca $^{2+}$ -Konzentration die Aktivierung der Proteinkinase C (PKC), welche in der Lage ist, Kaskaden wie den *mitogen-activated protein* (MAP)-Kinase-Signalweg zu aktivieren (Mellor H et al., 1998). Dabei handelt es sich um drei in Serie geschaltete Serin/Threonin-Kinasen, die eine Phosphorylierungskaskade durchlaufen, an deren Ende die Aktivierung der *extracellular-signal regulated kinase* (Erk) steht. Aktives Erk ist in der Lage, Transkriptionsfaktoren im Zellkern zu phosphorylieren und so die Genexpression zu beeinflussen (Wortzel & Seger, 2011).

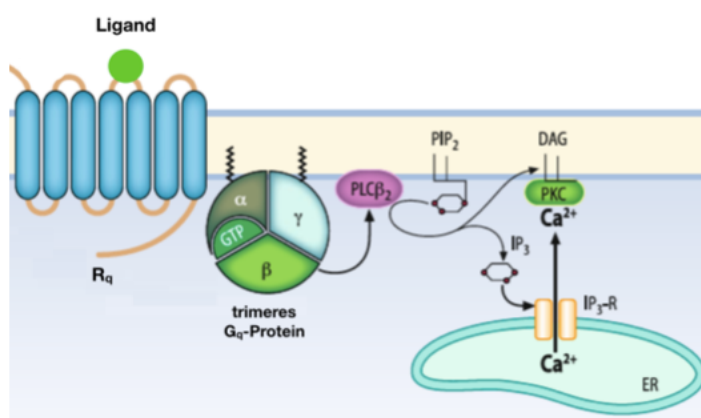


Abbildung 2: Aktivierung des IP $_3$ -Signalweges durch einen GPCR, welcher mit einem G_{α_q} -Protein gekoppelt ist

Nach Ligandenbindung an den GPCR, welcher mit einem G_{α_q} -Protein gekoppelt ist (R_q) wird dieses durch den Austausch von GDP zu GTP an der α -Untereinheit aktiviert. Daraufhin kommt es zur Aktivierung des Effektorproteins Phospholipase C β (PLC β). PLC β hydrolysiert das membranständige Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP $_2$) zu den *second messengern* Inositol-(1,4,5)-trisphosphat (IP $_3$) und dem membranständigen Diacylglycerin (DAG). IP $_3$ -Rezeptoren (IP $_3$ -R) liegen als ligandengesteuerte Ionenkanäle in der Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER) vor. Nach Aktivierung der IP $_3$ -R kommt es zum Ca $^{2+}$ -Ausstrom aus dem ER in das Zytosol, wodurch die intrazelluläre Ca $^{2+}$ -Konzentration ansteigt. Zusammen mit DAG führt die erhöhte intrazelluläre Ca $^{2+}$ -Konzentration zur Aktivierung der Ca $^{2+}$ -abhängigen Proteinkinase C (PKC).

Abbildung und entnommen und modifiziert aus: Löffler & Petrides: Biochemie und Pathobiochemie; 9. Auflage (2014).

1.2. $G\alpha_q$ -gekoppelter Designerrezeptor

Jede Zelle weist eine heterogene Expression von GPCRs auf, wobei verschiedene GPCRs sensibel für den gleichen Liganden sein können. Dadurch ist es schwierig, Signalkaskaden eines GPCR nach Aktivierung durch natürliche Liganden isoliert zu untersuchen (Hermans, 2003). Um dieses Problem zu umgehen, wurden G-Protein-gekoppelte Designerrezeptoren entwickelt. Diese sind inert gegenüber endogener Liganden und werden spezifisch durch synthetische Substanzen aktiviert. Guettier und Kollegen beschrieben 2009 die Synthese eines $G\alpha_q$ -gekoppelten Designerrezeptors (Guettier et al., 2009). Als Grundlage dafür diente der muscarinerge Acetylcholinrezeptor M3 der Ratte. Hierbei induzierten Guettier und Kollegen zwei Punktmutationen (Y148C und A238G), welche im Bereich der natürlichen Acetylcholin (Ach)-Bindestelle zwischen der dritten und fünften Transmembrandomäne liegen (Abbildung 3). Die Ach-Affinität des Rezeptors ging dadurch verloren, der Rezeptor jedoch kann spezifisch durch das synthetische Pharmakon Clozapin N-Oxid (CNO) aktiviert werden. $G\alpha_q$ -gekoppelte Designerrezeptoren erwiesen sich in einer Vielzahl von Studien als äußerst nützlich, um die Signaltransduktion nach Stimulation von GPCRs zu untersuchen (Thiel et al., 2013; Wess et al., 2013).

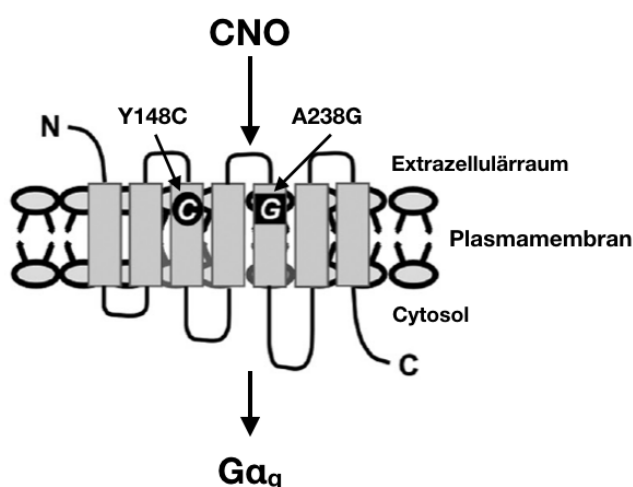


Abbildung 3: Schematische Darstellung des $G\alpha_q$ -gekoppelten Designerrezeptors

Dargestellt sind sieben Transmembrandomänen sowie die extra- und intrazellulären Domänen. In den Transmembrandomänen drei und fünf sind zwei Punktmutationen (Y148C und A238G) eingefügt. Dadurch ist der Designerrezeptor inert gegenüber endogener Substanzen, kann jedoch durch die synthetische Substanz Clozapin N-Oxid (CNO) spezifisch aktiviert werden.

Abbildung entnommen und modifiziert aus: Thiel et al., 2013.

1.3. Wirkung der Stimulation des Designerrezeptors $G\alpha_q$ auf Transkriptionsebene

Die nach Aktivierung von GPCRs eingeleiteten Signalwege nehmen Einfluss auf Expression und Aktivität verschiedener Transkriptionsfaktoren. Somit sind GPCRs in der Lage, die Genexpression zu beeinflussen. Im Folgenden wird die Wirkung der Stimulation eines $G\alpha_q$ -gekoppelten Designerrezeptors auf die Transkriptionsfaktoren Egr-1 und AP-1 vorgestellt.

1.3.1. Transkriptionsfaktor Egr-1

Beim *early growth response protein-1* (Egr-1) handelt es sich um einen Transkriptionsfaktor der Cys₂His₂-Zinkfinger-Klasse. Beschrieben wurde Egr-1 erstmals an Fibroblasten, wo es nach Nährstoffkarenz zu einer gesteigerten Expression kam. Somit steht Egr-1 in Zusammenhang mit Zellwachstum und -proliferation (Sukhatme et al., 1988). Drei DNA-Bindedomänen (Zinkfinger) werden durch die koordinative Bindung je eines Zinkions zwischen zwei-Cystein- und -Histidin-Resten aufrechterhalten. Dadurch ist Egr-1 in der Lage, DNA mit der Basensequenz 5'-GCG(G/T)GGGCG-3' (EBS= Egr-1-Bindestelle) regulatorisch zu beeinflussen (Christy & Nathans, 1989). Kaufmann und Kollegen konnten einen Anstieg der Egr-1-Expression und Aktivität nach Stimulation eines Gα_q-gekoppelten Designerrezeptors zeigen (Kaufmann et al., 2013). Nach Rezeptorstimulation kommt es zur Aktivierung der PKC, welche die Aktivität der MAP-Kinase Raf reguliert. Am Ende der folgenden MAP-Kinasen-Kaskade wird die Kinase Erk1/2 aktiviert, gelangt in den Zellkern und ist dort in der Lage Transkriptionsfaktoren durch Phosphorylierung zu aktivieren. So wird der ternäre Komplexfaktor (TCF) Elk-1 phosphoryliert, welcher zusammen mit dem *serum response factor* (SRF) den ternären Nukleoproteinkomplex bildet. Dieser Komplex interagiert mit dem *serum response element* (SRE) des Egr-1-Promotors und kann so die Egr-1-Expression beeinflussen (Kaufmann et al., 2013).

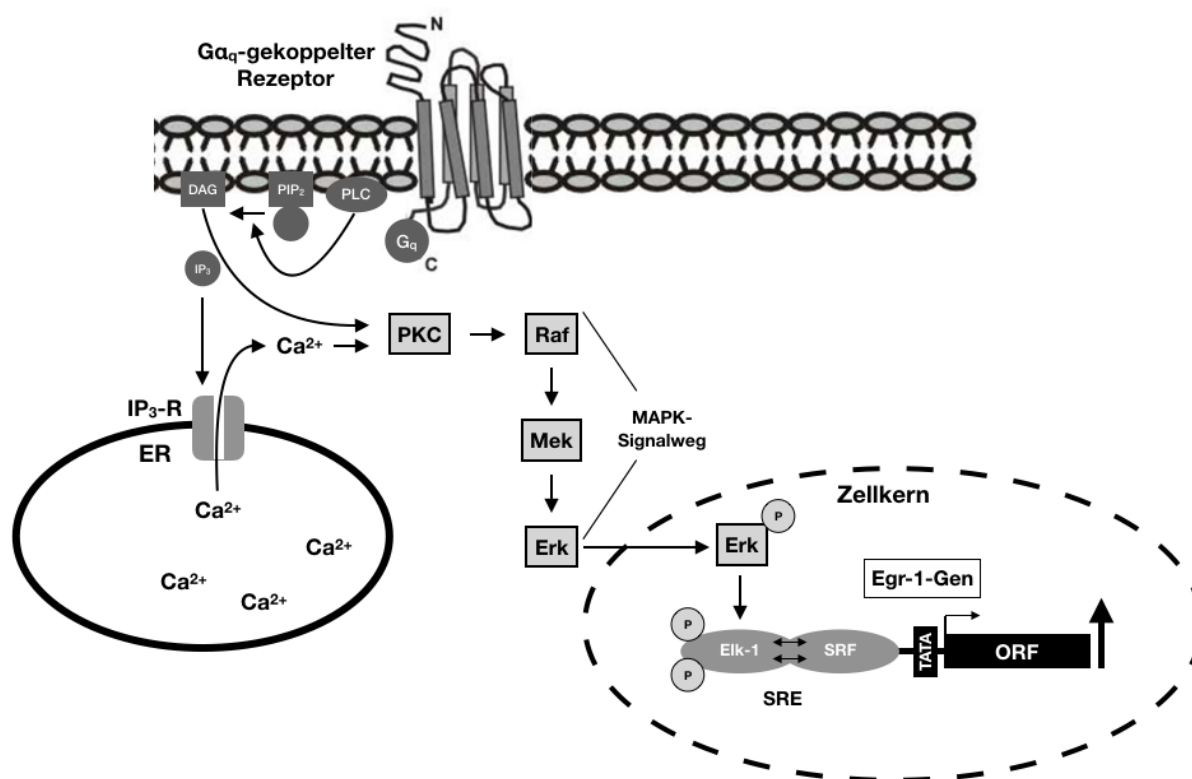


Abbildung 4: Stimulation eines Gα_q-gekoppelten Rezeptors führt zur Steigerung der Egr-1-Expression

Nach Stimulation eines Gα_q-gekoppelten GPCR kommt es zur Aktivierung des Effektorproteins Phospholipase Cβ (PLCβ). PLCβ hydrolysiert das membranständige Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat

(PIP₂) zu den *second messengern* Inositol-(1,4,5)-trisphosphat (IP₃) und dem membranständigen Diacylglycerin (DAG). Ionotrope IP₃-Rezeptoren (IP₃-R) liegen in der Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER) vor. Nach Aktivierung der IP₃-R kommt es zum Ca²⁺-Ausstrom aus dem ER in das Zytosol. In der Folge wird die Proteinkinase C (PKC) Ca²⁺ und DAG-abhängig aktiviert. PKC reguliert die Aktivität der MAP-Kinase Raf, wodurch der MAP-Kinase (MAPK)-Signalweg aktiviert wird, an dessen Ende die Kinase Erk steht. Phosphoryliertes Erk gelangt in den Zellkern, wo es zur Aktivierung des ternären Komplexfaktors (TCF) Elk-1 kommt. Phosphoryliertes Elk-1 bildet zusammen mit dem *serum response factor* (SRF) den ternären Nukleoproteinkomplex. Dieser ist in der Lage, das im Egr-1-Promotor lokalisierte *serum response element* (SRE) zu binden, wodurch es zur gesteigerten Egr-1-Expression kommt. Dargestellt sind außerdem die TATA-Box sowie der offene Leserahmen des Egr-1-Gens (ORF).

1.3.2. Transkriptionsfaktor AP-1

Aktivator-Protein-1 (AP-1) ist ein Transkriptionsfaktor, welcher sich als Homo- oder Heterodimer aus den basischen Leucin-Zipper (bZIP)-Proteinen c-Jun, c-Fos und ATF zusammensetzt. AP-1 reguliert die DNA-Expression bzgl. Prozessen wie Zellwachstum, -proliferation, -differenzierung und Apoptose. DNA-Bindung und Dimerisierung wird durch die bZIP-Domäne vermittelt, welche eine α -Helix bildet, bei der jede erste und vierte aus sieben Aminosäuren einen basischen Rest hat (Heptadenmuster). Die Dimerisierung an bZIP-Domänen wird über hydrophobe Wechselwirkungen vermittelt, wobei sich zwei α -Helices durch *coiled-coiled*-Strukturen zu einer Gabelstruktur formieren. Die Gabel interagiert mit der DNA durch Wechselwirkungen der positiv geladenen basischen Aminosäuren und dem negativ geladenen Phosphat im DNA-Rückgrat. AP-1 fördert die Genexpression am 2-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat DNA *response element* (TRE) in der Promotorregion. Dabei handelt es sich um die charakteristische Basenabfolge 5'-TGA(G/C)TCA-3'. Kaufmann und Kollegen zeigten, dass die AP-1-Aktivität nach Stimulation eines G α_q -gekoppelten Designerrezeptors zunimmt, was durch die gesteigerte Expression und biologische Aktivität, der bZIP-Proteine c-Jun und c-Fos erklärt wurde (Kaufmann et al., 2013). Der c-Fos-Promotor beinhaltet mehrere regulatorische Elemente wie CRE, SRE und TRE. Mutationsanalysen zeigten, dass die CRE-vermittelte Transkription nach Stimulation des G α_q -gekoppelten Designerrezeptors gefördert wurde. Aktives CREB ist in der Lage CRE zu binden und die CRE-vermittelte Transkription regulatorisch zu beeinflussen. Bei CREB handelt es sich um einen bZIP-Transkriptionsfaktor, welcher als Homodimer aktiv ist. Voraussetzung zur Dimerisierung ist die Monomer-Phosphorylierung, wobei die cAMP-abhängige PKA eine wichtige Rolle spielt. Inzwischen ist klar, dass CREB auch PKA-unabhängig über den Erk-Signalweg indirekt phosphoryliert werden kann. Erk aktiviert die *mitogen and stress activated protein kinase* (MSK), welche in der Lage ist, CREB zu phosphorylieren (Wiggin et al., 2002).

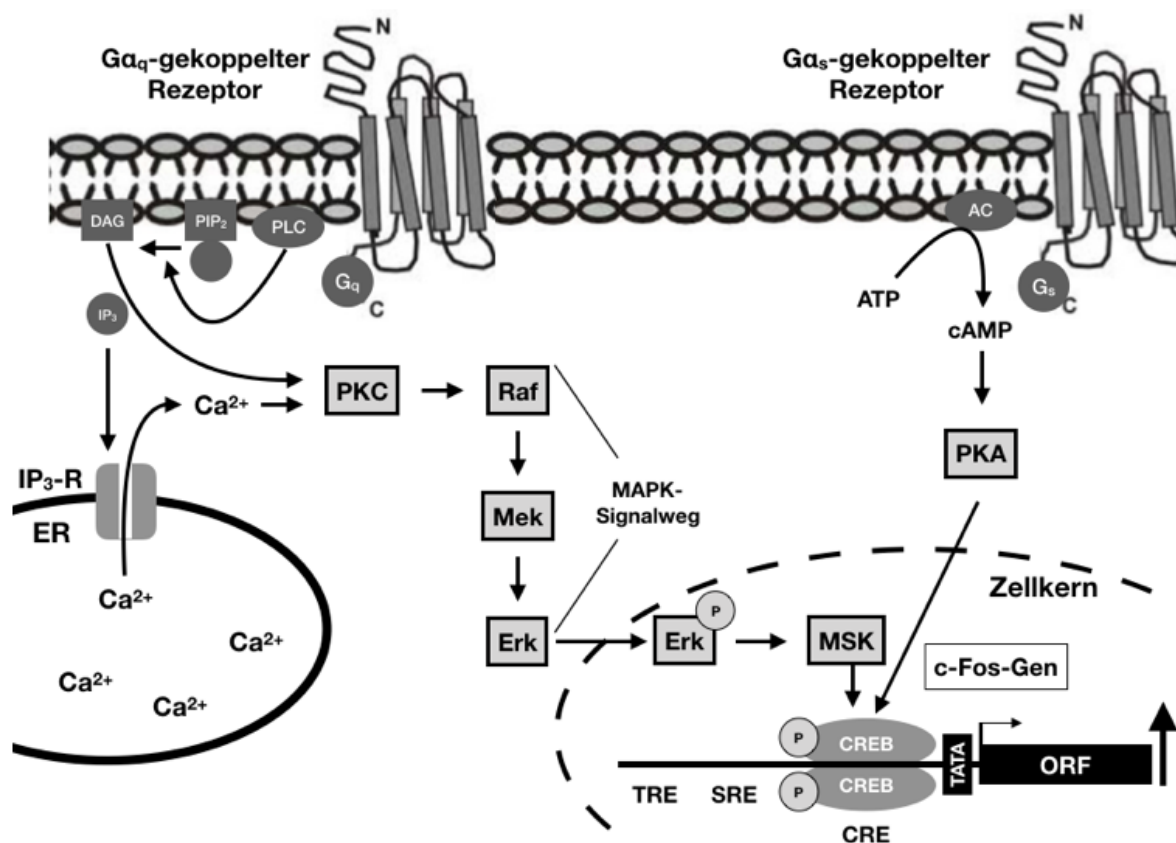


Abbildung 5: Verschiedene Wege führen zur CREB-Aktivierung, gezeigt am Beispiel der CRE-vermittelten Aktivierung des c-Fos-Promotors

Nach Stimulation eines Gα_q-gekoppelten Rezeptors kommt es zur Aktivierung der Proteinkinase C (PKC). PKC reguliert den MAP-Kinasen (MAPK)-Signalweg, an dessen Ende die Aktivierung der Kinase Erk steht. Phosphoryliertes Erk gelangt in den Zellkern, aktiviert die *mitogen and stress activated protein kinase* (MSK), welche CREB phosphoryliert. Nach Stimulation eines Gα_s-gekoppelten Rezeptors kommt es zur Aktivierung der cAMP-abhängigen Proteinkinase A (PKA), welche CREB direkt phosphoryliert. Nach der Phosphorylierung bildet CREB über bZIP-Domänen ein Homodimer aus, welches die CRE-vermittelte Transkription initiiert. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden TRE und SRE im c-Fos-Promotor nur angedeutet. Dargestellt sind außerdem die TATA-Box sowie der offene Leserahmen des c-Fos-Gens (ORF).

1.4. Regulation auf Transkriptionsebene

Die vorgestellten Transkriptionsfaktoren weisen eine transiente Aktivität nach extrazellulärer Stimulation auf. Negativ-Regulatoren sorgen nach einer bestimmten Zeit für die Beendigung der Signalkaskade. Negativ-Regulation kann durch die Aktivität von Phosphatasen erfolgen, die einzelne Elemente der Signalkaskaden durch Dephosphorylierung inaktivieren (Lesch et al., 2017).

1.5. Calcineurin

Calcineurin ist eine Ca^{2+} /Calmodulin abhängige Serin/Threonin-Phosphatase. Das Holoenzym setzt sich als Heterodimer aus CalcineurinA (CnA) und CalcineurinB (CnB) zusammen. Das 61 kDa schwere CnA ist die katalytische Untereinheit und dephosphoryliert Serin- und Threonin-Reste. CnB, mit einem Molekulargewicht von 19 kDa, stellt die Ca^{2+} -bindende regulatorische Untereinheit dar. CnA hat Bindestellen für die Ca^{2+} -bindenden Proteine CnB- und Calmodulin sowie eine autoinhibitorische Domäne am C-Terminus. Eine wichtige Funktion von Calcineurin ist die Aktivierung von *nuclear factor of activated T cell* (NFAT) durch Dephosphorylierung. Aktives NFAT initiiert als Transkriptionsfaktor die Interleukin-2 (IL-2)-Expression und spielt eine wichtige Rolle bei der T-Zell-vermittelten Immunantwort. Neben der Immunantwort wurde gezeigt, dass Calcineurin bei Prozessen wie fetaler Lungenentwicklung und der Reifung pankreatischer β -Zellen von Bedeutung ist (Heit et al., 2006; Davé et al., 2006). Calcineurininhibitoren, wie das Ciclosporin, werden bei einer Vielzahl medizinischer Indikationen verwendet. Ciclosporin findet Anwendung bei der Immunsuppression, z.B. nach Organtransplantation, bei Erkrankungen in der Dermatologie sowie bei der rheumatoiden Arthritis (Mattila et al., 1990; Emmel et al., 1989).

1.6. Fragestellung der Arbeit

Die Auswirkung von Calcineurin auf die Egr-1- und AP-1-vermittelte Transkription in HEK293-Zellen nach Rq α -Stimulation wurde bisher nicht untersucht. In der vorliegenden Arbeit wurde die Auswirkung der Expression einer konstitutiv aktiven Form der Phosphatase CalcineurinA (Δ CnA) auf die Egr-1 und AP-1-abhängige Transkription nach Stimulation eines G α_q -gekoppelten Designerrezeptors untersucht. Der Einsatz von Reportergenem mit unterschiedlichen Designerpromotoren sollte zeigen, ob Calcineurin die entsprechenden Signalkaskaden positiv oder negativ beeinflusst.

2. Material und Methoden

2.1. Verwendete Geräte und Gebrauchsgegenstände

1,5 ml Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
96-Loch-Platte, transparent (Greiner)	bio-one, Frickenhausen
96-Loch-Platte, weiß (Nunc)	Roskilde, Dänemark
Analysewaage	Sartorius, Göttingen
Auflichtmikroskop	Helmut Hund GmbH, Wetzlar
Autoklav	Schütt, Göttingen
Brutschrank	Thermo Fisher, Berlin
Druckfiltrationseinheit, steril (Sartolab P)	Sartorius, Göttingen
Einmal-Spitzen (200 µl bzw. 1000 µl)	Sarstedt, Nürnberg
Einmal-Spritzen Injekt (10ml bzw. 20 ml)	Braun AG, Melsungen
Eismaschine	diverse Hersteller
Feinwaage	Sartorius, Göttingen
Küvetten (1,5 ml Halbmikro)	Brand, Wertheim
Labor-Zentrifugen-Röhrchen 15 ml Greiner	Bio-one, Frickenhausen
Labor-Zentrifugen-Röhrchen 50 ml	Sarstedt, Nürnberg
Luminometer	Berthold Detection Systems, Alabama USA
Magnetrührer KA	Labortechnik, Staufen
Microplate Reader Infinite M Nano	Tecan, Männedorf CH
Millipore Wasseranlage	Milli Q Millipore, Milford USA
Neubauer Zählkammer (improved)	Roth, Karlsruhe
pH-Meter (inoLab pH 720)	WTW, Weilheim
Photometer	Eppendorf, Hamburg
Pipetten (10 µl, 20 µl, 200 µl bzw. 1000 µl)	Eppendorf, Hamburg
Pipetus®Akku	Hirschmann Laborgeräte, Heilbronn
Sterilbank	Heraeus, Hanau
Sterilfilter (0,22µm bzw. 0,45 µm)	Sarstedt, Nürnberg
Tischzentrifuge (Biofuge®pico)	Heraeus, Hanau
Vortex-Mixer	IKA Labortechnik, Staufen
Wasserbäder, temperierbar	diverse Hersteller
Zellkulturflaschen (175 cm ²) Greiner	Bio-one, Frickenhausen
Zellkulturschale Ø60 mm	Bio-one, Frickenhausen
Zellkulturschale Ø35 mm	Bio-one, Frickenhausen

2.2. Chemikalien

Adenosintriphosphat (ATP)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
BCA Protein	Kit Pierce, Rockford, USA
Calciumchlorid (CaCl_2)	Roth, Karlsruhe
Chloroquin	Sigma-Aldrich, München
Clozapin-N-Oxid (CNO)	Enzo Life Science, Lörrach
Coenzym A	Sigma-Aldrich, München
<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> (DMEM)	PAA, Marburg
Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	Merck, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth, Karlsruhe
Dithiothreitol (DTT)	Roth, Karlsruhe
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Roth, Karlsruhe
Ethanol (EtOH)	Chemikalienlager UdS
Fetales Kälberserum (FCS)	Biochrom AG, Berlin
Glukose	Merck, Darmstadt
Glutamin	PAA, Marburg
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-Ethansulfonsäure (HEPES)	Roth, Karlsruhe
Chlorwasserstoff (HCl)	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid (KCl)	Roth, Karlsruhe
Kaliumhydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Merck, Darmstadt
Luminol	Roth, Karlsruhe
Luziferin	Sigma-Aldrich, München
Magnesiumchlorid (MgCl_2)	Merck, Darmstadt
Magnesiumhydrogencarbonat ($(\text{MgCO}_3)_4\text{Mg}(\text{OH})_2 \times 5 \text{ H}_2\text{O}$)	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat ($\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$)	Sigma-Aldrich, München
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin	PAA, Marburg
Hexadimethrin-Bromid (Polybren)	Sigma-Aldrich, München
Reporterlyspuffer (5x)	Promega, Mannheim
12- O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetat (TPA)	Calbiochem, Darmstadt
Tricin	Merck, Darmstadt
Tris	Roth, Karlsruhe
Trypsin/EDTA (10x)	PAA, Marburg

2.3. Lösungen

Im Folgenden sind die verwendeten Lösungen und Puffer aufgelistet. Als Lösemittel wurde, wenn nicht anders angegeben, destilliertes Wasser ($\text{H}_2\text{O}_{\text{MILLIPORE}}$) verwendet. Der pH-Wert wurde mit HCl und NaOH eingestellt.

Luciferase Assay Reagent

Tricin	22	mM
$(\text{MgCO}_3)_4\text{Mg}(\text{OH})_2 \times 5 \text{ H}_2\text{O}$	1,177	mM
$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$	2,94	mM
EDTA	0,11	mM
DTT	36,3	mM
Coenzym A	297	μM
ATP	583	μM
pH 7,8		

<u>Luziferin</u>	4,7	mM
------------------	-----	----

Die fertige Lösung zur Luziferasemessung setzte sich aus 9 ml (*Luciferase Assay Reagent*) und 1 ml Luziferin zusammen.

DMEM

FCS	10	%
Glukose	25	mM
L-Glutamin	2	mM
Penicillin	100	U/ml
Streptomycin	100	$\mu\text{g/ml}$

DMEM-Serumreduziert

FCS	0,05	%
Glukose	25	mM
L-Glutamin	2	mM
Penicillin	100	U/ml
Streptomycin	100	$\mu\text{g/ml}$

Sterilfiltration mit Druckfiltrationseinheit (Sartolab P). Wenn nicht anders angegeben, wurde DMEM-Medium mit 10 % FCS verwendet.

1x PBS

NaCl	170	mM
KCl	3,35	mM
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	4	mM
KH ₂ PO ₄	1,84	mM
pH 7,24		

1x Trypsin/EDTA

Trypsin	0,25% (w/v)
EDTA	0,1% (w/v)

2 x HBSS

NaCl	274	mM
KCl	25	mM
Na ₂ HPO ₄	3,75	mM
Glukose	27,75	mM
HEPES	105	mM
pH 7,05-7,12		

Sterilfiltration mit Sterilfilter (ø0,45 µm).

2.4. Plasmide zur Herstellung von Viren zum lentiviralen Gentransfer

Zur Herstellung infektiöser Viren zum lentiviralen Gentransfer war eine Co-Transfektion von HEK293/T17-Zellen mit drei verschiedenen Plasmiden notwendig. Das **Verpackungsplasmid (Δ8.91)** enthält die Gene *gag*, *env*, und *pol*, welche Strukturproteine und virale Enzyme codieren (siehe 2.4.1.). Das **Expressionsplasmid (pCMVG)** codiert das Hüllprotein des *Vesicular Stomatitis Virus* (VSV) (siehe 2.4.2.) und das jeweilige **Transferplasmid** codiert das Transgen (siehe 2.4.3.). Nach der Co-Transfektion von HEK293/T17-Zellen mit allen drei Plasmiden, wurden die entsprechenden Gene transkribiert, woraufhin die Proteinbiosynthese folgte. Dabei wurden einzelne Virusbestandteile synthetisiert, welche sich in den Zellen zu infektiösen Viren zusammensetzten. Im Folgenden sind die genannten Plasmide genau beschrieben.

2.4.1. Verpackungsplasmid Δ8.91

Das Verpackungsplasmid Δ8.91 enthält die Gene *gag*, *pol* und *rev*. *gag* codiert virusgruppenspezifische Antigene (Matrix-, Kapsid- und Nukleokapsidproteine), *pol* für die viralen Enzyme Protease, reverse Transkriptase sowie Integrase und *rev* für den „*regulator of expression*“.

of virion proteins“. Hierbei handelt es sich um einen Proteinkomplex, welcher den Kernexport viraler mRNA unterstützt und somit die Expressionseffizienz viraler Gene erhöht. Um eine starke Expression zu gewährleisten, stehen die Gene unter Kontrolle des „immediate early“ (IE)-Promotor/Enhancer Komplex des Cytomegalo-Virus (CMV). Stromabwärts wurde das Polyadenylierungssignal des Simian-Virus 40 (SV40pA) eingefügt.

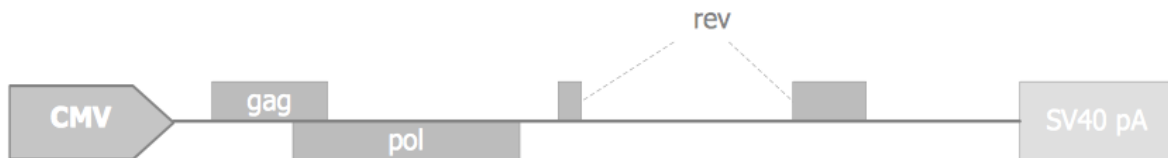


Abbildung 6: Verpackungsplasmid Δ8.91

Das Plasmid codiert die viralen Gene *gag*, *pol* und *rev*. Alle Gene stehen unter Kontrolle des (IE)-Promotor/Enhancer Komplex von CMV. Abgeschlossen wird das Konstrukt mit dem Polyadenylierungssignal SV40pA (Rössler et al., 2008).

Abbildung entnommen aus: Dissertation, Isabelle Müller (2011).

2.4.2. Expressionsplasmid pCMVG

Das Expressionsplasmid pCMVG codiert das Hüllprotein von VSV. Das VSV-Hüllprotein wurde verwendet, um dem niedrigen Tropismus, welcher durch lentivirale Hüllproteine bedingt ist, entgegenzuwirken und das Spektrum zu infizierender Zellen zu erhöhen. Das Gen steht unter Kontrolle des IE-Promotor/Enhancer Komplex von CMV, stromabwärts wurde das SV40pA eingefügt.



Abbildung 7: Expressionsplasmid pCMVG

Das Plasmid codiert das VSV-Hüllprotein. Der offene Leserahmen (VSV-G cDNA) steht unter Kontrolle des IE-Promotor/Enhancer Komplex von CMV. Abgeschlossen wird das Konstrukt mit dem Polyadenylierungssignal SV40pA (Rössler et al. 2008).

Abbildung entnommen aus: Dissertation Isabelle Müller (2011).

2.4.3. Transferplasmide

Alle verwendeten Transferplasmide sind Abwandlungen des pFUGW-Plasmids (Abbildung 8) (Lois et al., 2002). Im offenen Leserahmen wurde die EGFP-cDNA durch die cDNA des Transgens ausgetauscht. Für eine kontinuierliche Expression des Transgens sorgt ein im Plasmid integrierter, Ubiquitin-Promotor. Des Weiteren enthält das Plasmid ein Verpackungssignal (ψ), das die

Translokation viraler RNA in das VSV-Hüllprotein (pCMVG) gewährleistet. Für eine erhöhte Stabilität des Transkripts sorgt das „*woodchuck postranscriptional regulatory element*“ (WPRE). Das HIV1-*flap*-Element erhöht den Kerntransport viraler DNA nach der reversen Transkription. Flankiert ist das Konstrukt von zwei *long terminal repeats* (LTR), wobei das 3' LTR eine $\Delta 3$ -Mutation aufweist. Hierdurch resultierten nach der reversen Transkription replikationsunfähige Proviren. Somit waren die Viren nach einmaliger Infektion nicht reproduktionsfähig.

Durch den CMV-IE-Promotor/Enhancer-Komplex wurde eine starke Transkription gewährleistet. Die daraus resultierende RNA wurde durch das Verpackungssignal ψ zum Hüllprotein geleitet und fungierte somit als genetische Information der späteren Viren.

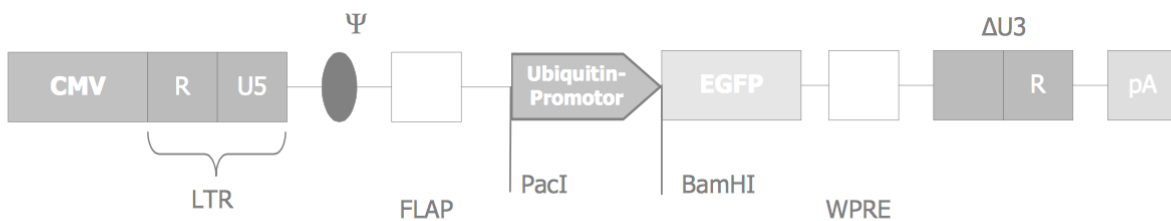


Abbildung 8: pFUGW-Plasmid als Grundlage für Transferplasmide

Gezeigt ist die Transkriptionseinheit mit 2 LTRs, der $\Delta 3$ -Mutation und anschließend dem Polyadenylierungssignal (pA). Des Weiteren sind das Verpackungssignal ψ , ein FLAP-Element, ein WPRE sowie der Ubiquitin-Promotor dargestellt. Im offenen Leserahmen ist die EGFP-cDNA. Zu sehen sind außerdem 2 Restriktionsschnittstellen für PacI und BamHI. Die gesamte Transkriptionseinheit steht unter Kontrolle des CMV-IE-Promotor/Enhancer Komplex.

Abbildung entnommen aus: Dissertation Isabelle Müller (2011).

2.4.3.1 Verwendete lentivirale Transferplasmide

Wie bereits in 2.4.3. beschrieben, wurde die EGFP-cDNA durch die cDNA des jeweiligen Transgens ersetzt. Diese stand unter Kontrolle des Ubiquitin-Promotors, wodurch eine kontinuierliche Expression gewährleistet war.

Tabelle 1: Auflistung der verwendeten lentiviralen Transferplasmide mit jeweiliger Funktion.

Plasmid	Funktion
pFUW	Enthält keine codierende Region. Dient als Kontrollvektor (Lois et al., 2002).
pFUW-ΔCalcineurinA (ΔCnA)	Codiert die katalytische Untereinheit A der Ca^{2+} /Calmodulin abh. Phosphatase Calcineurin. Durch Deletionen der CalcineurinB und Calmodulin-Bindestellen sowie der autoinhibitorischen Domäne ist diese konstitutiv aktiv (Rössler et al., 2008).
pFUW-CalcineurinB (CnB)	Codiert die Ca^{2+} -bindende Untereinheit B der Ca^{2+} /Calmodulin abh. Phosphatase Calcineurin (Lesch et al., 2017).

pFUW-GAL4-c-fos	Codiert ein Fusionsprotein aus GAL4 und der Aktivierungsdomäne von c-Fos (Thiel & Rössler, 2011).
pFUW-GAL4-c-jun	Codiert ein Fusionsprotein aus GAL4 und der Aktivierungsdomäne von c-Jun (Rössler et al., 2008).
pFUW-GAL4-CREB	Codiert ein Fusionsprotein aus GAL4 und der Aktivierungsdomäne von CREB (Rössler et al., 2008).
pFUW-GAL4-Elk1	Codiert ein Fusionsprotein aus GAL4 und der Aktivierungsdomäne von Elk-1 (Rössler et al., 2008).
pFUW-NLSCα	Codiert die katalytische Untereinheit der Proteinkinase A (C α). Diese ist mit einer Kernlokalisationssequenz (NLS) kombiniert und konstitutiv aktiv. Das Plasmid wurde freundlicherweise von Gerald Thiel (Homburg) zur Verfügung gestellt.

2.4.3.2. Lentivirale Reporterplasmide

Alle lentiviralen Reporterplasmide basieren auf dem pFUGW-Plasmid (siehe 2.4.3). Die EGFP-cDNA wurde durch die cDNA des Luziferase-Gens ersetzt. Der Ubiquitin-Promotor wurde durch den jeweils angegebenen Promotor ausgetauscht, welcher somit die Transkription des Luziferase-Gens kontrollierte. Daher werden alle Reporterplasmide als pFW-XX.luc bezeichnet.

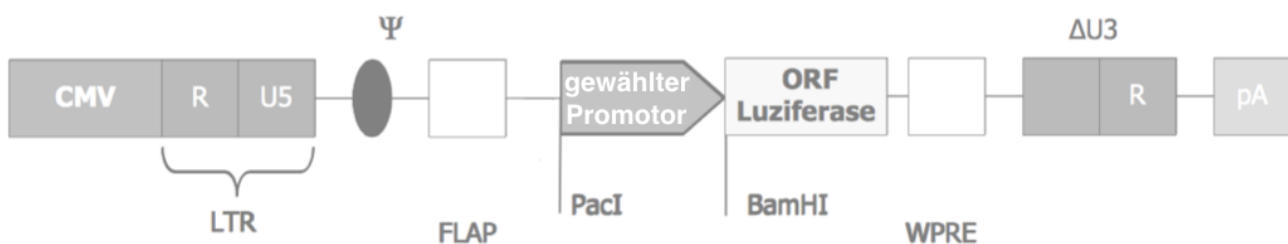


Abbildung 9: Lentivirale Reporterplasmide

Gezeigt ist die Transkriptionseinheit des Plasmids mit 2 LTRs und $\Delta 3$ -Mutation mit anschließendem Polyadenylierungssignal (pA). Des Weiteren ist das Verpackungssignal ψ , ein FLAP, ein WPRE sowie die Lokalisation des gewählten Promotors dargestellt. Im offenen Leserahmen (ORF) ist die Luziferase-cDNA. Zu sehen sind außerdem 2 Restriktionsschnittstellen für PacI und BamHI. Die gesamte Transkriptionseinheit steht unter Kontrolle des CMV-IE-Promotor/Enhancer Komplex.

Abbildung entnommen und verändert aus: Dissertation Isabelle Müller (2011).

Im Folgenden sind die verwendeten lentiviralen Reporterplasmide mit jeweiliger Funktion aufgelistet.

Tabelle 2: Auflistung aller verwendeten lentiviralen Reporterplasmide mit jeweiliger Funktion.

Plasmid	Funktion
pFW-c-fosCRE ⁴ .luc	Luziferase-Gen unter Kontrolle eines Promotors mit 4 „ <i>cAMP response elements</i> “ (CRE) des menschlichen c-fos-Promotors (Thiel et al., 2005).
pFW-c-jun.luc	Luziferase-Gen unter Kontrolle des c-jun-Promotors. Dieser enthält 2 „ <i>TPA response elements</i> “ (TRE) (Thiel & Rössler, 2011).
pFW-coll.luc	Luziferase-Gen unter Kontrolle des Promotors vom Kollagenase-Gen mit einem TRE. Dient als Sensor für die AP-1-Aktivität (Rössler et al., 2008).
pFW-EBS2 ⁴ .luc	Luziferase-Gen unter Kontrolle eines Promotors mit 4 Egr-1-Bindestellen (EBS) aus dem humanen Synapsin 1-Promotor. Spiegelt Egr-1-abhängige Transkription wider (Al-Sarraj et al., 2005).
pFW-Egr1.2.luc	Luziferase-Gen unter Kontrolle des Egr-1-Promotors (Rössler et al., 2008).
pFW-Egr1.SRE.luc	Luziferase-Gen unter Kontrolle eines minimal-Promotors mit den beiden proximalen SREs des Egr1.2-Promotors (Rössler & Thiel, 2009).
pFW-hcfos.luc	Luziferase-Gen unter Kontrolle des humanen c-Fos-Promotors (Thiel & Rössler, 2011).
pFW-UAS ⁵ SP ¹ .luc	Luziferase-Gen unter Kontrolle eines Promotors mit 5 „ <i>upstream acting sequences</i> “ (UAS). GAL4-Fusionsproteine binden spezifisch an die UAS-Sequenz (Stefano et al., 2007).
pFW-9E3/cCAF.luc (9EC.luc)	Luziferase-Gen unter Kontrolle des 9E3/cCAF Promotors (Rössler & Thiel, 2009).

2.4.3.3. Designerrezeptor pHA-R α_q

Guettier et al. (2009) beschrieben die Generation einer mutierten Form des humanen muscarinergen Acetylcholinrezeptor 3 (M3R). In dem für M3R codierenden Gen wurden zwei Punktmutationen eingefügt, welche den Austausch zweier Aminosäuren in der dritten (Y149C) und fünften (A239G) Transmembrandomäne zur Folge hatte. Die mutierte Form des M3R (R α_q) ist nicht sensibel für Acetylcholin, den endogenen Aktivator, jedoch für Clozapin-N-Oxid (CNO). CNO ist ein synthetisches Molekül, welches endogen nicht vorkommt und bei den verwendeten Zellen keinerlei Stimulation auslöst. Somit ist es möglich, den generierten Designerrezeptor R α_q gezielt und isoliert zu aktivieren (Guettier et al., 2009).

2.5. Zelllinien (HEK293/T17-Zelle)

Hierbei handelt es sich um eine menschliche, embryonale Nierenzelllinie. Diese wurde freundlicherweise von D. Baltimore, Rockefeller Universität, New York, USA, zur Verfügung gestellt (Pear et al., 1993).

2.6. Zellkultur

Das Arbeiten an der Zellkultur erfolgte unter der Sterilbank. Die Zelllinien wurden in 175 cm² Kulturflaschen im Inkubator unter feuchter Atmosphäre bei 37 °C und 5 % CO₂ (Standardbedingungen) kultiviert.

2.7. Passagieren der Zellen

Die Passagierung der Zellen erfolgte alle drei Tage. Hierbei wurde das Medium ausgetauscht und die Zahl der Zellen pro Kulturflasche reduziert. Zunächst wurde das Medium abgenommen und die Zellen wurden mit 1x PBS gewaschen. Zum Ablösen der Zellen vom Boden der Kulturflasche wurden diese für 90 s in 1x Trypsin/EDTA inkubiert. Anschließend wurde mit Medium aufgefüllt und die Zellzahl um den Faktor 1:10 verdünnt.

2.8. Lentiviraler Gentransfer und Reportergenanalyse

2.8.1. Herstellung von Lentiviren mit Calciumphosphat-Transfektion

24 h vor der Calciumphosphat-Transfektion wurden HEK293/T17-Zellen bei der Passagierung entnommen und in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Es wurden $2 \cdot 10^6$ Zellen in einer 60 mm Zellkulturschale mit 4 ml Medium ausgesät und kultiviert. Zur Herstellung infektiöser Viren zum lentiviralen Gentransfer wurden drei verschiedene Plasmide zur Co-Transfektion verwendet (siehe 2.4). Die jeweilige Plasmidkonzentration wurde photometrisch bei 260 nm bestimmt. Demnach wurde pro Zellkulturschale ein Ansatz aus 5 µg Verpackungsplasmid ($\Delta 8.91$); 2,3 µg Expressionsplasmid (pCMVG) und 6,6 µg Transfervektor (pFUW.XX; pFWXX.luc bzw. pHA-R α_q) in 250 µl H₂O_{MILLIPORE} angesetzt. Zu diesem Ansatz wurden 27,5 µl CaCl₂ (2,5 M) gegeben. Der Ansatz wurde in eine Pasteurpipette aufgenommen und vorsichtig in 275 µl 2x HBSS gegeben. Zeitgleich wurden über eine weitere Pasteurpipette Luftblasen in die 2x HBSS-Lösung geleitet. Dies diente der Durchmischung der Reaktionsansätze und der suffizienten Bildung von

Calciumpräzipitaten, welche für die Transfektion notwendig waren. Die Entstehung dieser Präzipitate zeigte sich durch einen weißen Niederschlag der nun fertigen Transfektionslösung.

Vor der Gabe der Transfektionslösung zu den Zellen wurde deren Zustand sowie Zelldichte unter dem Lichtmikroskop beurteilt. Zunächst wurde das Medium gegen 4 ml frisches, 25 μ M Chloroquin-haltiges, Medium ausgetauscht. Chloroquin, ein zugelassenes Medikament gegen Malaria, neutralisiert den pH-Wert in Lysosomen, wodurch lysosomale DNAsen gehemmt werden. Dies verhindert den Abbau der aufgenommenen DNA, was die Effizienz der Transfektion erhöht (Luthman & Magnusson, 1983). Es wurden jeweils 500 μ l der fertigen Transfektionslösung zu dem Medium einer Zellkulturschale gegeben und für 24 h unter Standardbedingungen inkubiert. Während dieser Zeit fand die Aufnahme der Plasmide in die Zellen statt.

Nach 24 h wurde das Chloroquin-haltige Medium abgenommen, die transfizierten Zellen wurden 2x mit je 2 ml 1x PBS gewaschen und in frischem Medium für weitere 72 h unter Standardbedingungen inkubiert.

Durch den stark aktiven CMV-IE-Promotor/Enhancer-Komplex bei Δ 8.91 und pCMVG wurden virale Enzyme und Proteine exprimiert. Diese setzten sich mit der RNA, die aus der DNA des Transfervektors transkribiert wurde, zu fertigen Viren zusammen. Die Viren schnürten sich von den Zellen ab und befanden sich nun im Medium (Keim et al., 2012).

2.8.2. Abnahme der infektiösen Viren

In 2.8.1. wurde die Herstellung infektiöser Lentiviren zum Gentransfer beschrieben. Diese befanden sich nun im Medium der Zellkulturschalen. Das Medium wurde entnommen und durch einen Spritzenfilter ($\varnothing$ 0,45 μ m) steril filtriert.

2.8.3. Lentivirale Infektion

Um die erforderlichen Experimente durchführen zu können, mussten mehrere Viren mit verschiedenen Transgenen kombiniert werden. Aus virushaltigen Überständen verschiedener Ansätze wurden entsprechende Viruslösungen erstellt. Dabei wurden die jeweiligen Viren, wie in Tabelle 3 angegeben, verdünnt. Fehlendes Volumen wurde mit Medium bzw. mit Viren, deren Transgen zur Überexpression diente, aufgefüllt. Den fertigen Viruslösungen wurde 8 μ g/ml Polybren zugesetzt, was die Effizienz der folgenden Infektion erhöhte.

Tabelle 3: Zur Infektion verwendete Viren mit eingesetzter Verdünnung.

Virus kodierend für	Verdünnung
Reportergen (pFWXX.luc)	1:6
Designerrezeptor (pHA-Rαq)	1:3
Katalytische Untereinheit der Proteinkinase A (PKA) (pFUW-NLSCα)	1:5
Überexpression (pFUW-ΔCnA, -CnB)	Überschuss

Infiziert wurden HEK293/T17-Zellen, wobei jeweils 200.000 Zellen in einer 35 mm Zellkulturschale ausgesät wurden. Anstelle des Mediums wurden pro Schale 2 ml der Viruslösung verwendet. Jede Infektion wurde als Vierfach-Bestimmung durchgeführt. Die Ansätze wurden so für 24 h unter Standardbedingungen inkubiert. In dieser Zeit fand die Fusion zwischen Virus und Zelle statt, sodass die Transfervektor-RNA in DNA umgeschrieben und als Provirus in die wirtseigene DNA integriert werden konnte. Nach 24 h wurde die Viruslösung abgenommen, unter S2-Bedingungen entsorgt und durch je 2 ml frisches Medium ersetzt. Von nun an exprimierten die Zellen die entsprechenden Transgene.

2.8.4. Serumreduktion

Nach weiteren 24 h Inkubation unter Standardbedingungen wurde das Medium durch serumreduziertes DMEM-Medium (0,05 % FCS) ersetzt. Somit wurden unspezifische Stimulationen durch im FCS enthaltende Wachstumsfaktoren minimiert.

2.8.5. Stimulation

Zellen, die durch lentiviralen Gentransfer den Designerrezeptor Rα_q exprimierten, wurden 24 h nach der Serumreduktion stimuliert. Dazu wurde serumreduziertes Medium mit 1 μM CNO verwendet. Die Zellen wurden damit 24 h unter Standardbedingungen inkubiert.

2.8.6. Reportergenanalyse

Durch die Analyse von Reportergenen konnte die Aktivierung regulatorischer DNA-Abschnitte dargestellt werden. Hierzu wurden spezifische Promotoren (siehe 2.4.3.2.) zur Kontrolle eines Reportergens (hier: Luziferase) eingesetzt. Transkriptionsfaktoren, welche durch die Stimulation

aktiviert wurden, initiierten durch Binden an eine für sie spezifische Promotorregion die Synthese der Luziferase.

Die Bestimmung der Luziferaseaktivität (siehe 2.9.) erlaubte die Quantifizierung der Aktivierung eines Promotors. Durch das Einbringen weiterer Transgene in die Zellen konnte die Aktivierung bestimmter Transkriptionsfaktoren in An- und Abwesenheit regulatorischer Proteine (Bsp.: ΔCnA , CnB) untersucht werden.

Gene für Reporter, Rezeptoren sowie aktivierende Kinasen wurden durch lentiviralen Gentransfer in das zelleigene Chromatin integriert (siehe 2.8.). Durch die Integration der entsprechenden Gene in das Chromatin der Zelle war eine Analyse unter physiologischen Bedingungen möglich.

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei unterschiedliche Stimulationswege verwendet. Zum einen über $\text{R}\alpha_{\text{q}}$, einen Transmembranrezeptor, welcher durch CNO aktiviert wurde und über die katalytische Untereinheit der PKA ($\text{NLSC}\alpha$).

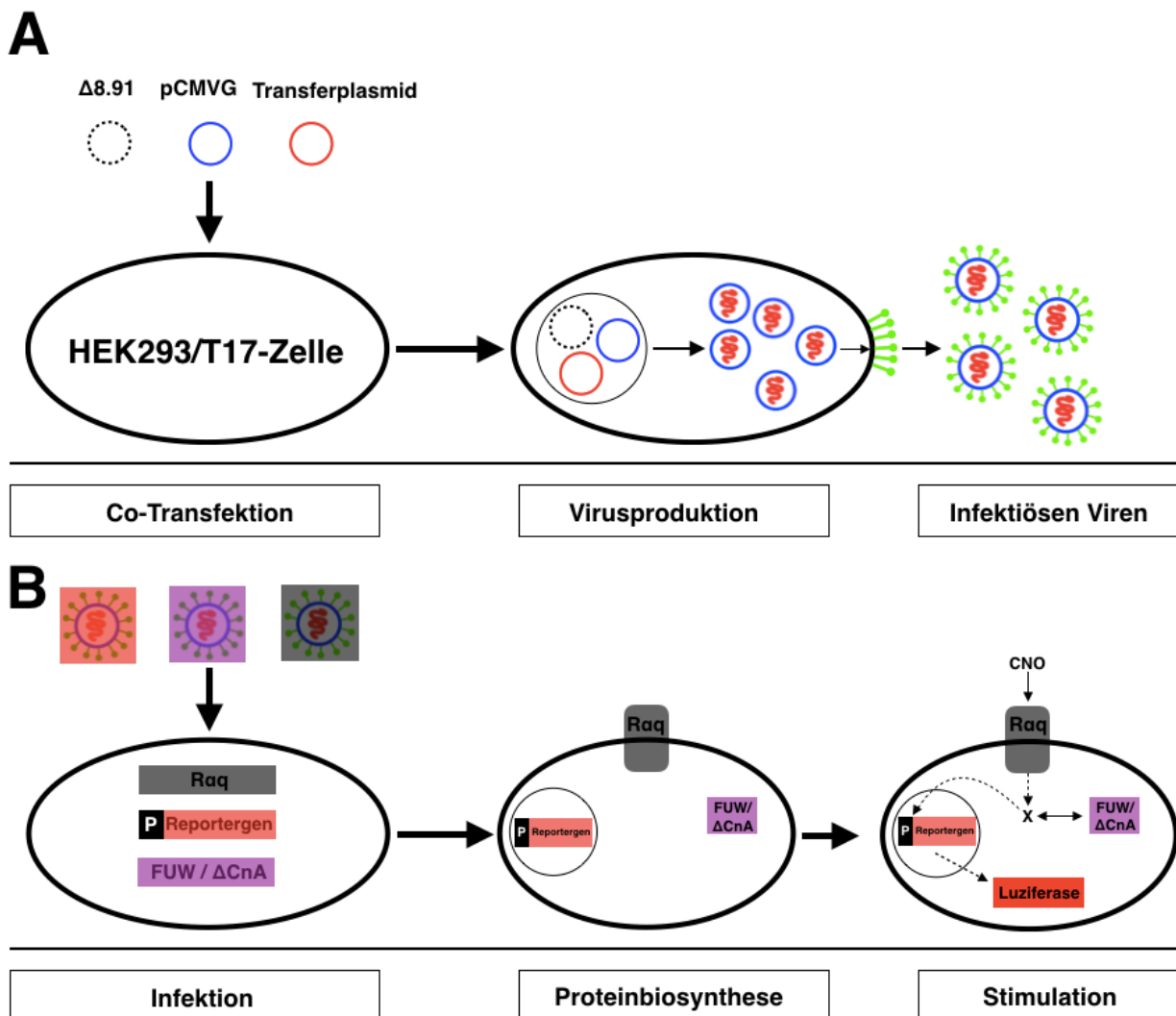


Abbildung 10: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus mit $\text{R}\alpha_{\text{q}}$ als Stimulus

A: Nach Co-Transfektion von HEK293/T17-Zellen mit drei verschiedenen Plasmiden produzierten diese infektiöse Lentiviren. Die RNA, welche die Viren trugen, codierte entweder $\text{R}\alpha_{\text{q}}$, ein Reporterogen oder ΔCnA . Als Kontrolle wurden Viren mit dem pFUW-Plasmid produziert.

B: Wie in 2.8.3. beschrieben, wurde eine Lösung, bestehend aus verschiedenen Viren, hergestellt. Damit wurden HEK293/T17-Zellen infiziert. Nachdem die entsprechende RNA in DNA umgeschrieben und als Provirus in die zelleigene DNA integriert wurde, synthetisierte die Zelle aufgrund konstitutiv aktiver Promotoren $R\alpha_q$ und ΔCnA . Nach Mediumwechsel und Serumreduktion fand die Stimulation von $R\alpha_q$ durch CNO statt. Die Aktivierung der Promotorregion (P) des Reportergens durch spezifische Transkriptionsfaktoren (X) initiierte die Synthese der Luziferase. Durch die Bestimmung der Luziferaseaktivität konnte, je nach verwendetem Promotor, die Rolle verschiedener Transkriptionsfaktoren bei der Stimulation von $R\alpha_q$ unter Einfluss von ΔCnA beurteilt werden.

Zellen, die durch lentiviralen Gentransfer NLSC α exprimierten, mussten nicht stimuliert werden. Die Zellen wurden nach der Serumreduktion für 72 h unter Standardbedingungen inkubiert. NLSC α codiert die katalytische Untereinheit der PKA. Durch die Kernlokalisationssequenz (NLS) wurde der Import der Kinase in den Zellkern sichergestellt. Die Kinaseaktivität von NLSC α wirkte dort über Phosphorylierung als endogener Stimulus.

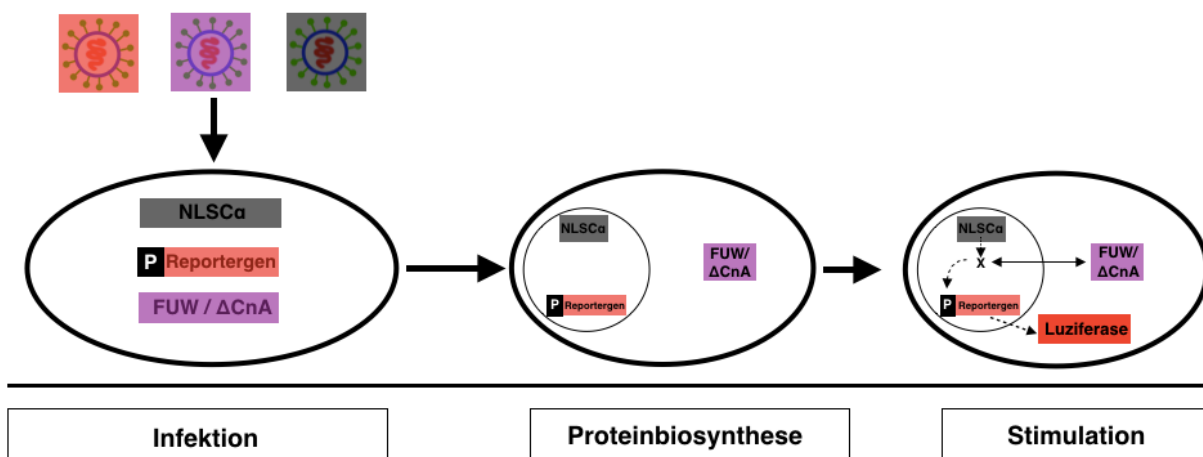


Abbildung 11: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus mit NLSC α als Stimulus

Wie in 2.8.3. beschrieben, wurde eine Lösung bestehend aus verschiedenen Viren hergestellt. Damit wurden HEK293/T17-Zellen infiziert. Nachdem die entsprechende RNA in DNA umgeschrieben und als Provirus in die zelleigene DNA integriert wurde, synthetisierte die Zelle aufgrund konstitutiv aktiver Promotoren NLSC α und ΔCnA . Bei NLSC α handelt es sich um die katalytische Domäne der PKA, gekoppelt mit einer Kernlokalisationssequenz (NLS). Die Kinaseaktivität von NLSC α fungierte hier als Stimulus. Die Aktivierung der Promotorregion (P) des Reportergens durch spezifische Transkriptionsfaktoren (X) initiierte die Synthese der Luziferase. Durch die Bestimmung der Luziferaseaktivität konnte, je nach verwendetem Promotor, die Rolle verschiedener Transkriptionsfaktoren bei der Stimulation mit NLSC α unter Einfluss von ΔCnA beurteilt werden.

In beiden Fällen konnte anhand der Messung der Luziferaseaktivität die Stimulation ($R\alpha_q$ bzw. NLSC α) mit und ohne ΔCnA verglichen werden.

2.9. Messung der Luziferaseaktivität

2.9.1. Zellernte

24 h nach der Stimulation (2.8.5.) wurden die Zellen geerntet. Diese wurden zunächst 2x mit 2 ml 1x PBS (4 °C) gewaschen, anschließend wurde je 1 ml 1x PBS (4 °C) auf die Zellkulturschalen gegeben. Die Zellen wurden mit einem Zellschaber vom Boden der Kulturschale abgekratzt. Das 1x PBS wurde mitsamt der Zellen in eine Pipettenspitze aufgenommen, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und auf Eis gelagert.

Die Reaktionsgefäße wurden mit 13.000 rpm für 10 min unter Kühlung (4 °C) zentrifugiert. Die Zellen setzten sich als Pellet auf dem Boden der Reaktionsgefäße ab und der Überstand (1x PBS) wurde verworfen. Die somit gewonnenen Zellpellets wurden bis zum Aufschluss für das BCA- und Luziferase-Assay bei -20 °C weggefroren.

2.9.2. Aufschluss der Zellen

Zur Lyse der Zellmembran wurde 1x Reporterlyspuffer (siehe 2.2.) verwendet. Die dabei eingesetzte Menge richtete sich nach der Größe der Zellpellets. Nach Zugabe des Lysepuffers wurden die Zellen zusätzlich mechanisch aufgeschlossen.

2.9.3. Luziferaseassay

Zunächst wurden 3 µl der Lysepuffer-Protein-Lösung in eine 96 Lochplatte (weiß) aufgetragen. Zur Bestimmung der Luziferaseaktivität wurden pro Loch 50 µl des Luziferase Assay Reagenz zugegeben. Die Luziferaseaktivität konnte anschließend in einem Luminometer (siehe 2.1.) gemessen werden.

2.9.4. Bicinchoninsäure (BCA) Assay

Um die Werte der Luziferasemessung mit dem Proteingehalt der Proben abgleichen zu können, wurden diese mit dem Bicinchoninsäure (BCA)-Assay bestimmt. Aus der gleichen Lysepuffer-Protein-Lösung wurden je 8 µl in eine weitere 96 Lochplatte (transparent) aufgetragen. Als Standardreihe wurden Proteinkonzentrationen von 0, 125, 250, 500, 750, 1000, 1500 und 2000 µg/ml mit einem Volumen von ebenfalls 8 µl aufgetragen. Anschließend wurden jeweils 100 µl der

fertigen BCA-Lösung, bestehend aus Lösung-A und -B (Verhältnis 1:50), in jedes Loch gegeben. Der Reaktionsansatz wurde für 30 min bei 37 °C inkubiert. In dieser Zeit konnte die Farbreaktion stattfinden. Die fertige BCA-Lösung enthielt Cu^{2+} -Ionen, welche durch die Anlagerung an Peptidbindungen zu Cu^{1+} reduziert wurden. Der Gehalt an Cu^{1+} war proportional zum Proteingehalt. Zwei Moleküle Bicinchoninsäure reagierten mit einem Cu^{1+} -Ion zu einem Komplex, welcher als violetter Farbumschlag sichtbar wurde. Der Grad des Farbumschlages konnte photometrisch (562 nm) bestimmt werden. Anhand der Absorptionswerte der Standardreihe konnte eine Eichgerade erstellt und die Proteinkonzentration der Proben errechnet werden.

2.10. Bestimmung der relativen Luziferase-Aktivität

Die relative Luziferase-Aktivität wurde als Quotient aus Luziferasemessung (siehe 2.9.3.) und Proteinbestimmung (siehe 2.9.4.) angegeben.

$$\text{relative Luziferaseaktivität} = \frac{\text{Light Units [LU]}}{\text{Proteingehalt } [\mu\text{g}]}$$

2.11. Statistik

Statistische Analysen wurden mit dem Excel Add-In WinSTAT (R. Fitch Software) durchgeführt. Alle Werte, die Abweichungen > 2 Standardabweichungen aufwiesen, wurden als Ausreißer definiert und nicht analysiert. Normalverteilte Daten wurden mit einem t-Test für unabhängige Stichproben auf Irrtumswahrscheinlichkeit (p) getestet. Diese wurden in Abbildungen wie folgt angegeben: * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$), n.s. (nicht signifikant).

3. Ergebnisse

Um eine statistisch relevante Zahl von Experimenten zu generieren, wurden einzelne Versuche von Daniel Langfermann (DL) und Prof. Dr. Gerald Thiel (GT) (beide AG Thiel, medizinische Biochemie; Homburg) durchgeführt. Genaue Angaben dazu jeweils in der Abbildungsunterschrift, z. B.: n= 3 (TS 1; DL 1; GT 1).

3.1. In HEK293-Zellen wird die Egr-1-Aktivität durch die Phosphatase Calcineurin nach Rαq-Stimulation gehemmt

Zunächst wurde untersucht, welchen Einfluss die Stimulation des Designerrezeptors Rα_q auf die Egr-1-abhängige Transkription hat. Hierzu wurde ein Reportergen verwendet, bei dem die Expression der Luziferase unter Kontrolle eines Egr-1-abhängigen Designerpromotors (EBS2⁴.luc) stand. Der aus dem humanen Synapsin-I-Gen abgeleitete Promotor enthält vier Egr-1-Bindestellen (Abbildung 12A). Somit war die Expression der Luziferase ausschließlich von Egr-1 abhängig (Al-Sarraj et al., 2005). Reportergene sowie andere Transgene wurden mittels lentiviralem Gentransfer in das Chromatin der Zellen integriert (für genauen Ablauf siehe 2.8: wird im Folgenden nicht wieder erwähnt). HEK293-Zellen wurden mit zwei verschiedenen Lentiviren infiziert. Diese codierten den Reporter EBS2⁴.luc und den Designerrezeptor Rα_q. Wie in Abbildung 12B dargestellt, resultierte die Stimulation von Rα_q mit CNO in einer 2,9-fach erhöhten Egr-1-Aktivität im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle. Dies zeigt, dass die Stimulation von Rα_q mit CNO eine Erhöhung der Egr-1-abhängigen Transkription zur Folge hat, wodurch die Daten einer vorangegangenen Studie bestätigt wurden (Kaufmann et al., 2013).

Im nächsten Schritt wurde der Einfluss der konstitutiv aktiven Form der Phosphatase CalcineurinA (ΔCnA) auf die Egr-1-abhängige Transkription nach Rα_q-Stimulation untersucht. Hierzu wurden HEK293-Zellen mit drei verschiedenen Lentiviren infiziert. Neben EBS2⁴.luc- und Rα_q-codierenden Lentiviren wurden zusätzlich ΔCnA-codierende Lentiviren verwendet. Zur Kontrolle wurden die Zellen mit Viren infiziert, die mit dem Transfervektor pFUW hergestellt wurden (genaues Verhältnis der einzelnen Viren zueinander siehe Tabelle 3: wird im Folgenden nicht wieder erwähnt). Die Expression von ΔCnA sorgte für eine signifikante Reduktion der Egr-1-abhängigen Transkription auf 48 % des Kontrollwertes nach Stimulation von Rα_q mit CNO (Abbildung 12D).

Die Daten zeigen, dass die Expression der Phosphatase ΔCnA zu einer Reduktion der Egr-1-abhängigen Transkription nach Rα_q-Stimulation führt.

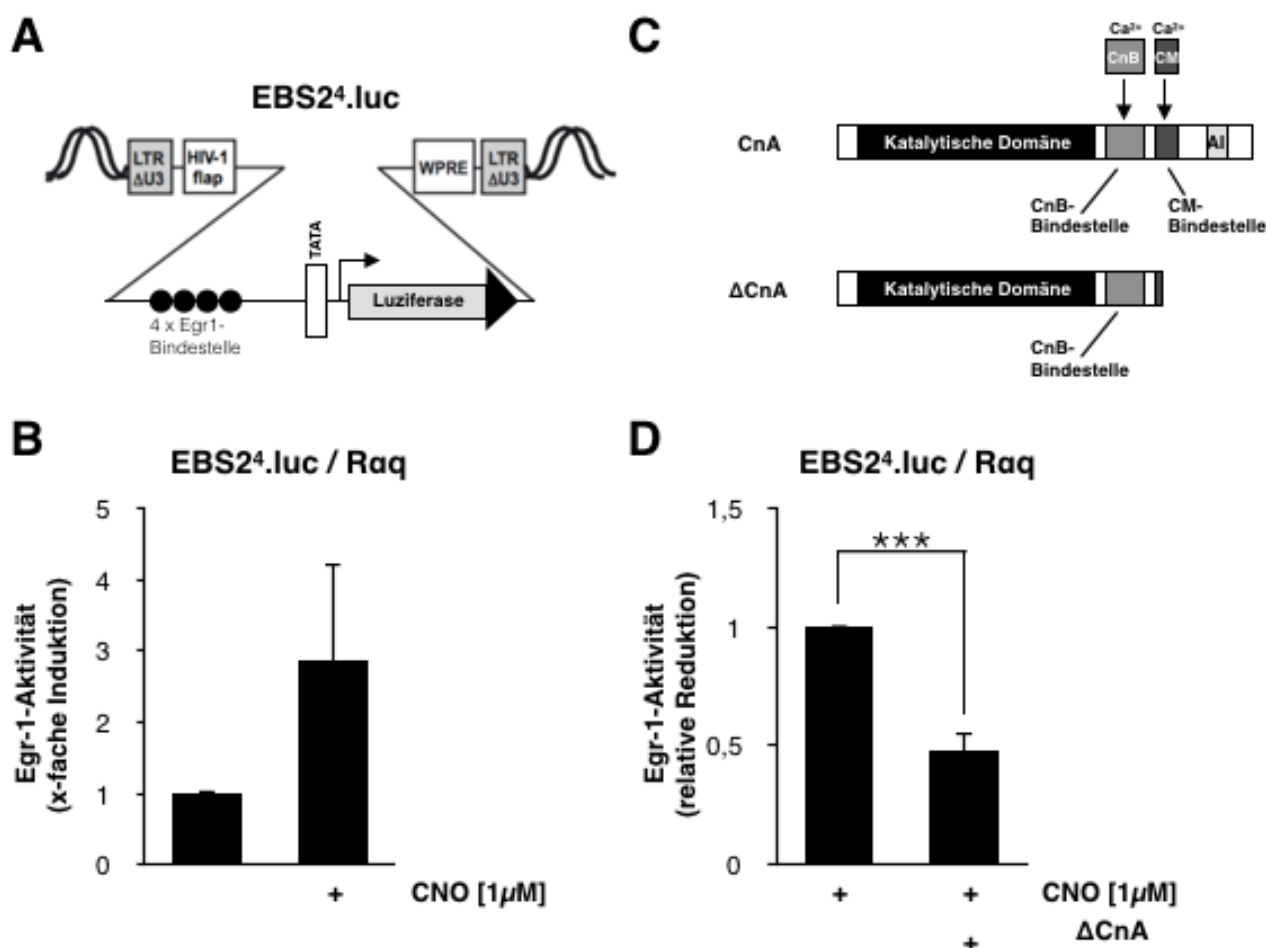


Abbildung 12: Die Expression einer konstitutiv-aktiven Mutante von Calcineurin interferiert mit der Aktivierung von Egr-1 nach Stimulation des Designerrezeptors $R\alpha_q$ mit CNO

A: Provirus, welches das EBS24/Luziferase Reportergen codiert. Die Expression der Luziferase steht unter Kontrolle eines Promotors mit vier Egr-1-Bindestellen. Dargestellt sind die beiden LTR Δ U3 Elemente, das HIV-1 flap Element und das WPRE. **B:** HEK293-Zellen wurden mit Lentiviren infiziert, welche für EBS24.luc und $R\alpha_q$ codierten. Die infizierten Zellen wurden 24 h bei 37 °C unter Serumreduktion gehalten und danach für 24 h mit 1 μ M CNO stimuliert oder blieben unstimuliert. Gezeigt ist die errechnete Induktion der Egr-1-Aktivität mit Standardabweichung nach Stimulation von $R\alpha_q$ mit CNO, bei n= 4. **C:** CalcineurinA (CnA) und Δ CnA: CnA enthält eine katalytische Domäne sowie Bindestellen für die Ca^{2+} -bindenden Proteine CalcineurinB (CnB) und Calmodulin (CM). Am C-Terminus liegt eine autoinhibitorische Domäne (AI) vor. Bei Δ CnA ist die AI sowie Teile der CM-Bindestelle deletiert, sodass die katalytische Domäne konstitutiv aktiv ist. **D:** HEK293-Zellen wurden mit Lentiviren infiziert, welche EBS24.luc, $R\alpha_q$ sowie Δ CnA codierten. Zur Kontrolle wurden Lentiviren verwendet, die mit dem Vektor pFUW produziert worden waren. Die infizierten Zellen wurden 24 h bei 37 °C unter Serumreduktion gehalten und danach für 24 h mit 1 μ M CNO stimuliert oder blieben unstimuliert. Dargestellt ist die durch Δ CnA-Expression bewirkte relative Reduktion der Egr-1-Aktivität nach $R\alpha_q$ -Stimulation mit Standardabweichung. Ein T-Test ergab eine statistische Relevanz mit $p < 0,001$ (***), bei n= 4 (TS 2; DL 2).

3.1.1. Calcineurin hemmt die Egr-1-Promotoraktivität nach $R\alpha_q$ -Stimulation

Im vorangegangenen Experiment wurde gezeigt, dass die Expression von ΔCnA hemmend auf die Egr-1-abhängige Transkription nach $R\alpha_q$ -Stimulation wirkt. In einer vorgehenden Studie wurde bereits gezeigt, dass die $R\alpha_q$ -Stimulation eine erhöhte Egr-1-Promotoraktivität zur Folge hat (Kaufmann et al., 2013). Daher wurde im Folgenden untersucht, ob die Expression der Phosphatase ΔCnA Auswirkungen auf die Egr-1-Promotoraktivität nach Stimulation von $R\alpha_q$ hat.

Um Auswirkungen auf den Egr-1-Promotor zu untersuchen, wurde ein Reportergen verwendet, bei dem die Luziferase unter Kontrolle des nativen Egr-1-Promotors exprimiert wird (Egr1.2.luc). Bei Betrachtung des in Abbildung 13A dargestellten Egr-1-Promotors wird deutlich, dass die Egr-1-Expression von der Aktivität zweier verschiedener Elemente abhängt. Das **CREB response element** (CRE) wird durch den Transkriptionsfaktor **cAMP response element binding protein** (CREB) aktiviert und das **serum response element** (SRE) wird durch einen Komplex aus **ternary complex factor** (TCF) und **serum response factor** (SRF) aktiviert. TCFs bilden den wichtigsten Aktivator des Egr-1-Promotors (Shaw and Saxton, 2003; Rösser & Thiel, 2009). Der Egr-1-Promotor setzt sich aus drei proximalen und zwei distalen SREs sowie einem dazwischen liegenden CRE zusammen (Abbildung 13A) (Rössler et al., 2008). HEK293-Zellen wurden mit zwei verschiedenen Lentiviren infiziert. Diese codierten den Reporter Egr1.2.luc sowie $R\alpha_q$. Wie in Abbildung 13B zu sehen ist, resultierte die Stimulation von $R\alpha_q$ mit CNO in einer 2,8-fach erhöhten Egr-1-Promotoraktivität, im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle. Die Daten bestätigen eine vorangegangene Studie (Kaufmann et al., 2013).

Um die Auswirkung einer ΔCnA -Expression auf den Egr-1-Promotor nach Stimulation von $R\alpha_q$ zu untersuchen, wurden HEK293 Zellen mit drei verschiedenen Lentiviren infiziert. Diese codierten Egr1.2.luc, $R\alpha_q$ und ΔCnA . Zur Kontrolle wurden die Zellen mit Lentiviren infiziert, die mit dem Vektor pFUW produziert worden waren. Die Expression von ΔCnA sorgte für eine signifikante Reduktion der Egr-1-Promotoraktivität auf 60 % des Kontrollwertes nach Stimulation von $R\alpha_q$ mit CNO (Abbildung 13C).

Es konnte gezeigt werden, dass die Phosphatase ΔCnA einen hemmenden Effekt auf die Egr-1-Promotoraktivität nach Stimulation von $R\alpha_q$ hat.

3.1.2. Die nach $R\alpha_q$ -Stimulation bewirkte Hemmung des Egr-1-Promotors durch Calcineurin ist SRE-abhängig

Nun galt es zu untersuchen, welches Element des Egr-1-Promotors, CRE oder SRE, eine reduzierte Aktivierbarkeit bei der Expression von ΔCnA aufweist. Zur Untersuchung des SRE wurde ein Reportergen verwendet, bei dem die Luziferase unter Kontrolle einer abgewandelten Form des Egr-1-Promotors stand (Egr1.SRE). Bei Egr1.SRE.luc sind die proximalen drei SREs sowie das CRE deletiert (Abbildung 13A). Somit war die Expression der Luziferase nur von den distalen SREs abhängig, welche durch einen Komplex aus SRF und TCF aktiviert werden konnten

(Rössler & Thiel, 2009). HEK293-Zellen wurden mit zwei verschiedenen Lentiviren infiziert, welche den Reporter Egr1.SRE.luc und den Designerrezeptor $R\alpha_q$ codierten. Wie in Abbildung 13D zu sehen ist, resultierte die Stimulation von $R\alpha_q$ mit CNO in einer 4-fachen Erhöhung der SRE-vermittelten Transkription, verglichen mit der unstimulierten Kontrolle. Somit wurde eine Aktivierung der SRE-vermittelten Transkription nach $R\alpha_q$ -Stimulation gezeigt. Dies bestätigt Daten einer vorangegangenen Studie (Kaufmann et al., 2013).

Um zu überprüfen, ob die SRE-vermittelte Transkription nach $R\alpha_q$ -Stimulation durch die Expression von ΔCnA beeinflusst wird, wurden HEK293-Zellen mit drei verschiedenen Lentiviren infiziert. Diese codierten Egr1.SRE.luc, $R\alpha_q$ sowie ΔCnA . Zur Kontrolle wurden die Zellen mit Viren infiziert, welche mit dem Vektor pFUW produziert wurden. Die Expression von ΔCnA sorgte für eine signifikante Reduktion der SRE-vermittelten Transkription auf 46 % des Kontrollwertes nach Stimulation von $R\alpha_q$ mit CNO (Abbildung 13E). Damit wurde gezeigt, dass die Expression der Phosphatase ΔCnA einen hemmenden Einfluss auf die SRE-vermittelte Transkription nach $R\alpha_q$ -Stimulation hat.

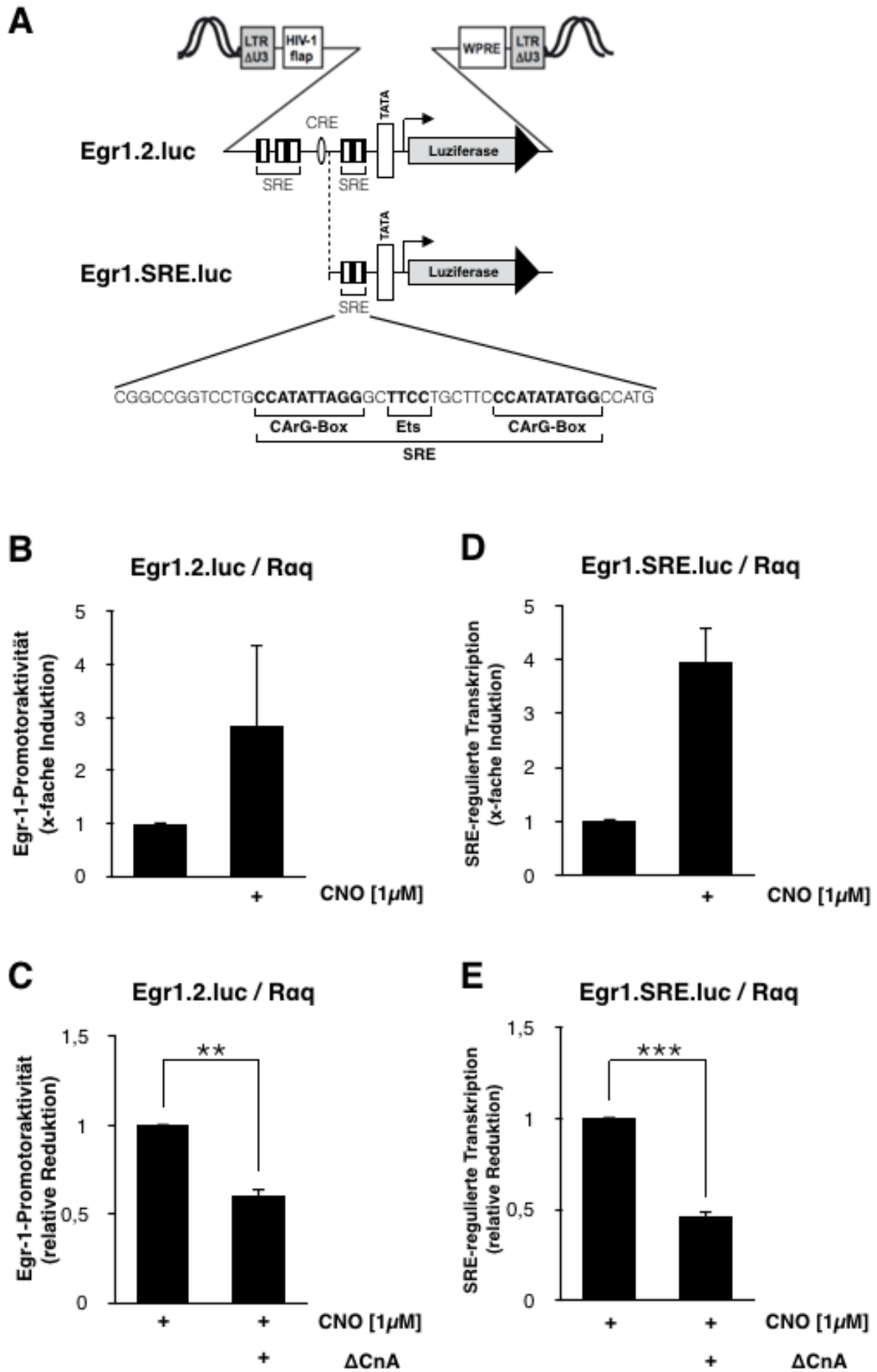


Abbildung 13: Die Expression von Δ CnA sorgt für eine Reduktion der Egr-1-Promotoraktivität nach Stimulation des Designerrezeptors $R\alpha_q$ mit CNO

A: Verwendeter Provirus, welcher das Egr1.2/Luziferase- und Egr1.SRE/Luziferase-Reportergen codiert. Bei Egr1.2.luc steht die Expression der Luziferase unter Kontrolle des nativen Egr-1-Promotors, bestehend aus zwei proximalen und drei distalen SREs. Dazwischen befindet sich ein CRE. Bei Egr1.SRE.luc sind die distalen SREs sowie das CRE aus dem nativen Egr-1-Promotor deletiert. Die Expression der Luziferase steht nur unter Kontrolle der zwei proximalen SREs. **B:** HEK293-Zellen wurden mit Lentiviren infiziert, welche Egr1.2.luc und $R\alpha_q$ codierten. Die infizierten Zellen wurden 24 h bei 37 °C unter Serumreduktion gehalten und danach für 24 h mit 1 μ M CNO stimuliert oder blieben unstimuliert. Dargestellt ist die errechnete Induktion der Egr-1-Promotoraktivität nach $R\alpha_q$ -Stimulation mit Standardabweichung, bei $n=3$. **C:** HEK293-Zellen wurden mit Lentiviren infiziert, welche für Egr1.2.luc, $R\alpha_q$ sowie Δ CnA codierten. Zur Kontrolle wurden Viren verwendet, die mit dem Vektor pFUW produziert worden waren. Die infizierten Zellen wurden 24 h bei 37 °C unter Serumreduktion gehalten und danach für 24 h mit 1 μ M CNO stimuliert oder blieben unstimuliert. Dargestellt ist die, durch Δ CnA-Expression bewirkte relative Reduktion der Egr-1-Promotoraktivität nach $R\alpha_q$ -Stimulation mit Standardabweichung. Ein T-Test ergab eine statistische Relevanz mit $p<0,01$ (**), bei $n=3$ (TS 2; DL 1). **D:** HEK293-Zellen wurden mit Lentiviren infiziert, welche für Egr1.SRE.luc und $R\alpha_q$ codierten. Die infizierten Zellen wurden 24 h bei 37 °C unter Serumreduktion gehalten und danach für 24 h mit 1 μ M CNO stimuliert oder blieben unstimuliert. Dargestellt ist die errechnete Induktion der SRE-regulierten Transkription nach $R\alpha_q$ -Stimulation, mit Standardabweichung bei $n=4$. **E:** HEK293-Zellen wurden mit Lentiviren infiziert, welche für Egr1.SRE.luc, $R\alpha_q$ sowie Δ CnA codierten. Zur Kontrolle wurden Viren verwendet, die mit dem Vektor pFUW produziert wurden. Die infizierten Zellen wurden 24 h bei 37 °C unter Serumreduktion gehalten und danach für 24 h mit 1 μ M CNO stimuliert oder blieben unstimuliert. Dargestellt ist die, durch Δ CnA-Expression bewirkte relative Reduktion der SRE-vermittelten Transkription nach $R\alpha_q$ -Stimulation mit Standardabweichung. Ein T-Test ergab eine statistische Relevanz mit $p<0,001$ (***), bei $n=4$ (TS 1; DL 3).

3.1.3. Die durch Calcineurin bedingte Hemmung der SRE-regulierten Transkription ist unabhängig vom SRF

Die Egr-1-Expression ist vor allem von der SRE-regulierten Transkription abhängig, welche durch einen Komplex aus TCF und SRF initiiert wird (Shaw & Saxton, 2003; Rösser & Thiel, 2009). Im vorangegangenen Experiment wurde eine Hemmung der SRE-vermittelten Transkription durch die Phosphatase Δ CnA nach Stimulation von $R\alpha_q$ gezeigt. Vorangegangene Studien zeigten, dass der TCF Elk-1 in Kombination mit einem SRF für die Aktivierung des im Egr-1-Promotors lokalisierten SRE verantwortlich ist (Kaufmann et al., 2013). Im folgenden Experiment wurde untersucht, ob Δ CnA eine Auswirkung auf die Elk-1-abhängige Transkription nach $R\alpha_q$ -Stimulation hat. Durch die Verwendung eines speziellen Designerpromotors wurde untersucht, ob die Elk-1-abhängige und SRF-unabhängige Transkription durch Δ CnA nach $R\alpha_q$ -Stimulation beeinflusst wird. Hierfür wurde ein Reportergen verwendet, bei dem die Expression der Luziferase spezifisch unter der Kontrolle des TCF Elk-1 stand und unabhängig vom SRF war. Bei 9E3/cCAF.luc liegen zwei Elk-1-Bindestellen im Promotor vor (Abbildung 14A), womit die Expression der Luziferase nur von Elk-1 abhängig war (Li et al., 1999). Die SRE-vermittelte Transkription bei Egr1.SRE.luc wurde durch einen Komplex aus TCF und SRF initiiert. Dagegen ist die Promotoraktivität von 9E3/cCAF.luc nur vom TCF Elk-1 abhängig und SRF-unabhängig. HEK293-Zellen wurden mit zwei verschiedenen Lentiviren infiziert. Diese codierten das Reportergen 9E3/cCAF.luc sowie den Designerrezeptor $R\alpha_q$. Die Stimulation von $R\alpha_q$ mit CNO resultierte in einer 5,7-fach erhöhten 9E3/cCAF-Promotoraktivität, verglichen mit der unstimulierten Kontrolle (Abbildung 14B). Dadurch bestätigten sich Ergebnisse einer früheren Studie (Kaufmann et al., 2013).

Im nächsten Schritt wurde die Auswirkung der Expression von ΔCnA auf die Elk-1-abhängige und SRF-unabhängige Transkription nach $\text{R}\alpha\text{q}$ -Stimulation untersucht. Hierzu wurden HEK293-Zellen mit drei verschiedenen Lentiviren infiziert. Diese codierten den Reporter 9E3/cCAF.luc, den Designerrezeptor $\text{R}\alpha\text{q}$ und ΔCnA . Zur Kontrolle wurden die Zellen mit Viren infiziert, die mit dem Transfervektor pFUW produziert worden waren. Die Expression von ΔCnA sorgte für eine signifikante Reduktion der 9E3/cCAF-Promotoraktivität auf 42 % des Kontrollwertes nach Stimulation von $\text{R}\alpha\text{q}$ mit CNO (Abbildung 14C). Die Daten zeigen, dass die Elk-1-abhängige und SRF-unabhängige Transkription durch die Phosphatase ΔCnA nach Stimulation von $\text{R}\alpha\text{q}$ signifikant reduziert wird. Die Wirkung von ΔCnA auf den TCF Elk-1 ist somit SRF-unabhängig.

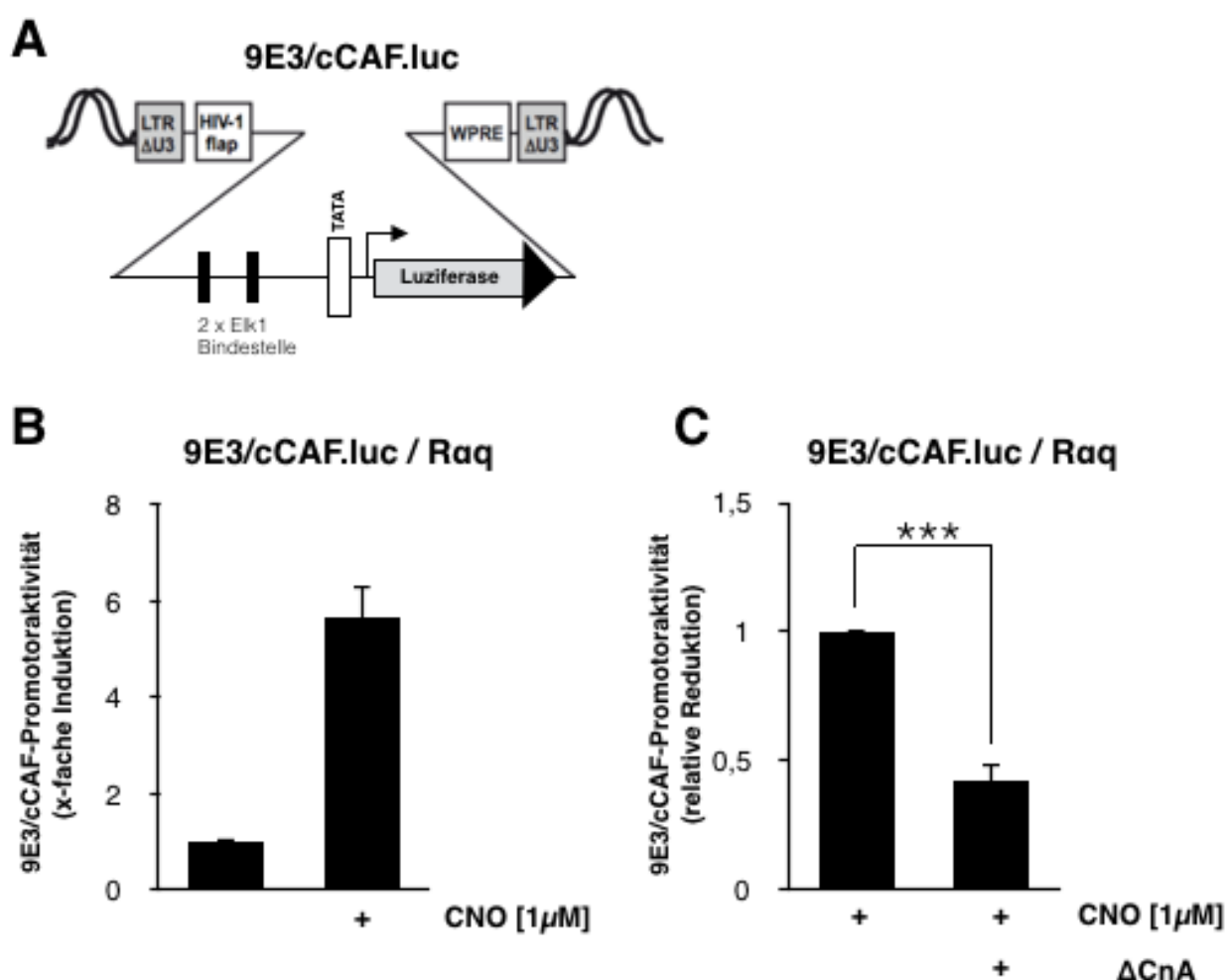


Abbildung 14: Die Expression von ΔCnA vermindert die Elk-1-abhängige Aktivierung des 9E3/cCAF-Promotors nach Stimulation des Designerrezeptors $\text{R}\alpha\text{q}$ mit CNO

A: Provirus, welches das 9E3/cCAF/Luziferase Reportergen codiert. Die Expression der Luziferase steht unter Kontrolle eines Promotors mit zwei Elk-1-Bindestellen. **B:** HEK293-Zellen wurden mit Lentiviren infiziert, welche 9E3/cCAF.luc und $\text{R}\alpha\text{q}$ codierten. Die infizierten Zellen wurden 24 h bei 37 °C unter Serumreduktion gehalten und danach für 24 h mit 1 μM CNO stimuliert oder blieben unstimuliert. Gezeigt ist die errechnete Induktion der 9E3/cCAF-Promotoraktivität nach $\text{R}\alpha\text{q}$ -Stimulation mit Standardabweichung, bei n= 3. **C:** HEK293-Zellen wurden mit Lentiviren infiziert, welche für 9E3/cCAF.luc, $\text{R}\alpha\text{q}$ sowie ΔCnA codierten. Zur Kontrolle wurden Viren verwendet, die mit dem Vektor pFUW produziert worden waren. Die infizierten Zellen wurden 24 h bei 37 °C unter Serumreduktion gehalten und danach für 24 h mit 1 μM CNO stimuliert oder blieben unstimuliert. Dargestellt ist die, durch ΔCnA -Expression bewirkte relative Reduktion der 9E3/cCAF-Promotoraktivität nach $\text{R}\alpha\text{q}$ -Stimulation mit Standardabweichung. Ein T-Test ergab eine statistische Relevanz mit p<0,001 (***), bei n= 3 (TS 1; DL 2).

3.1.4. Das transkriptionelle Aktivierungspotential des TCF Elk-1 wird durch Calcineurin vermindert

Elk-1 muss, um als Transkriptionsfaktor biologisch aktiv zu sein, phosphoryliert werden (Price et al., 1996). Die im vorangegangenen Experiment gezeigte Reduktion der Elk-1-abhängigen Transkription kann also auf einer verminderten transkriptionellen Aktivität von Elk-1 beruhen. Im folgenden Experiment wurde untersucht, ob die Expression von Δ CnA eine Veränderung des transkriptionellen Elk-1-Aktivierungspotentials nach R α q-Stimulation zur Folge hat. Um dieses zu bestimmen, wurde ein GAL4-Elk-1-Fusionsprotein exprimiert, welches sich aus der DNA-Bindedomäne von GAL4, einem hefespezifischen Transkriptionsfaktor und einer verkürzten Form von Elk-1 zusammensetzt. Bei der verkürzten Form von Elk-1 waren die DNA-Bindedomäne sowie die SRF-Bindestelle deletiert. Die Aktivierungsdomäne mit den beiden Phosphorylierungsstellen Ser-383 und Ser-389 war jedoch enthalten (Abbildung 15B). Als Reportergen wurde UAS⁵Sp1².luc verwendet (Abbildung 15A). Dieses beinhaltet zwei „*specifity protein 1*“ (SP1) -Sequenzen sowie fünf „*upstream activation sequences*“ (UAS), an die GAL4 spezifisch bindet. Zur Expression der Luziferase war das Binden von GAL4 an UAS sowie die Phosphorylierung der im GAL4-Elk-1-Fusionsprotein vorhandenen Aktivierungsdomäne notwendig (Kaufmann et al., 2013). Die Expression der Luziferase spiegelte somit das transkriptionelle Aktivierungspotential von Elk-1 wieder (Rössler et al., 2008). HEK293-Zellen wurden mit drei verschiedenen Lentiviren infiziert. Diese codierten das GAL4-Elk-1-Fusionsprotein, den Reporter UAS⁵Sp1².luc sowie den Designerrezeptor R α q. Wie in Abbildung 15C zu sehen, resultierte die Stimulation von R α q mit CNO in einem 2,5-fach erhöhten transkriptionellen Elk-1-Aktivierungspotential, was vorangegangene Ergebnisse bestätigt (Kaufmann et al., 2013).

Im Folgenden wurde untersucht, ob die Expression von Δ CnA einen Effekt auf das transkriptionelle Elk-1-Aktivierungspotential nach R α q-Stimulation hat. Hierzu wurden HEK293-Zellen mit vier verschiedenen Lentiviren infiziert. Diese codierten das Reportergen UAS⁵Sp1².luc, das GAL4-Elk-1-Fusionsprotein, den Designerrezeptor R α q sowie Δ CnA. Zur Kontrolle wurden die Zellen mit Viren infiziert, die mit dem Vektor pFUW hergestellt wurden. Die Expression von Δ CnA sorgte für eine signifikante Reduktion des transkriptionellen Elk-1-Aktivierungspotentials auf 44 % des Kontrollwertes nach Stimulation von R α q mit CNO (Abbildung 15D).

Daraus kann geschlossen werden, dass die Expression von Δ CnA eine Erniedrigung des transkriptionellen Aktivierungspotentials des TCF Elk-1 nach R α q-Stimulation zur Folge hat.

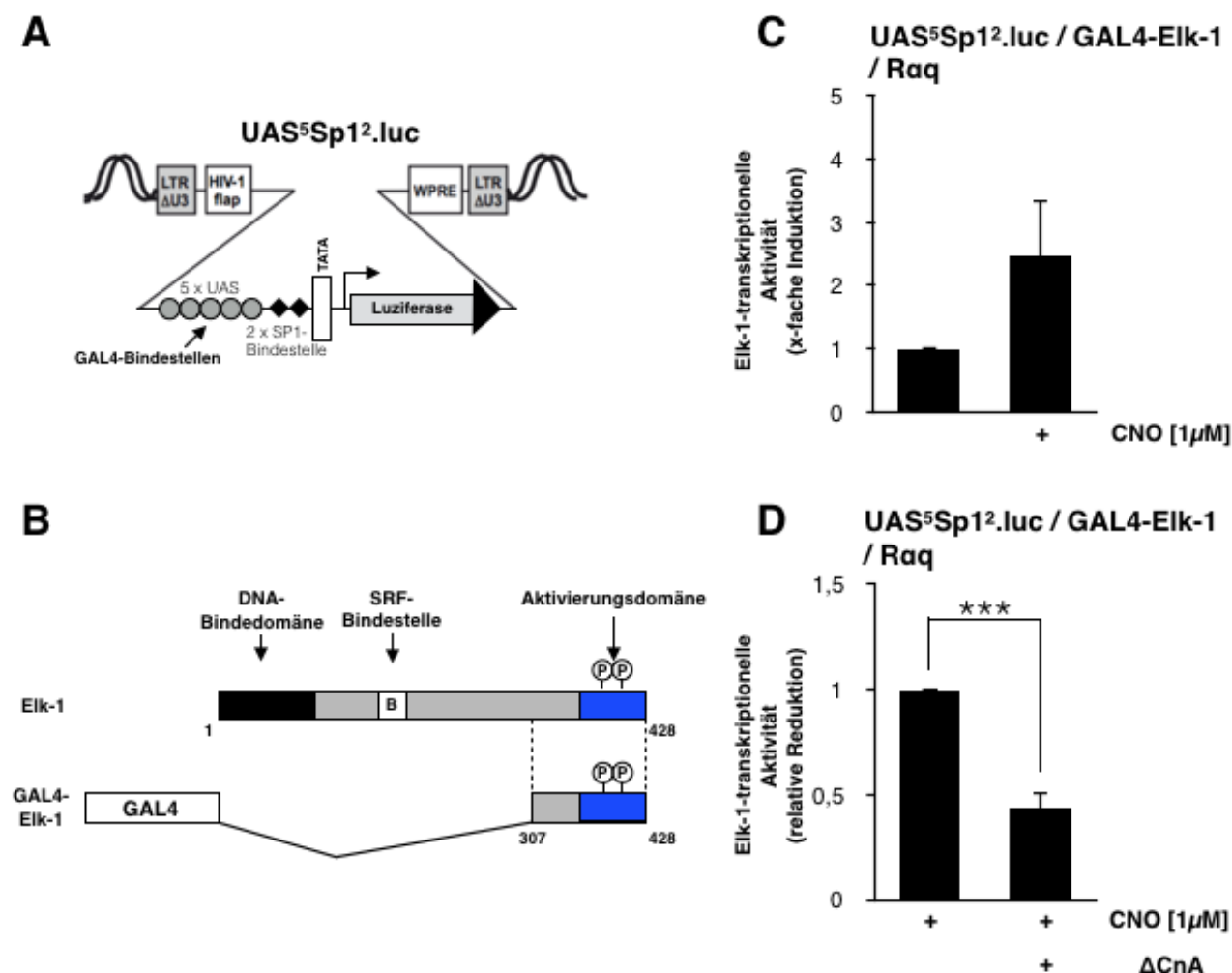


Abbildung 15: Die Expression von Δ CnA vermindert das transkriptionelle Aktivierungspotential des TCF Elk-1 nach Stimulation des Designerrezeptors $R_{\alpha q}$ mit CNO

A: Provirus, der das UAS⁵Sp1²/Luziferase Reportergen codiert. Die Expression der Luziferase steht unter Kontrolle eines Promotors mit fünf UAS. **B:** Darstellung des TCF Elk-1 und des Fusionsproteins GAL4-Elk-1. **Elk-1:** Die DNA-Bindedomäne liegt am N-Terminus, die Aktivierungsdomäne mit den beiden Phosphorylierungsstellen Ser-383 und Ser-389 liegt am C-Terminus. Dazwischen liegt die SRF-Bindestelle (B-Domäne). **GAL4-Elk-1:** Die DNA-Bindedomäne sowie die SRF-Bindestelle von Elk-1 wurden deletiert. Die C-Terminale Aktivierungsdomäne ist mit der DNA-Bindedomäne von GAL4 fusioniert. Die Expression der Luziferase bei UAS⁵Sp1².luc ist somit von der GAL4-Bindung an UAS sowie der Phosphorylierung der Aktivierungsdomäne im GAL4-Elk-1-Fusionsprotein abhängig. **C:** HEK293-Zellen wurden mit Lentiviren infiziert, welche für UAS⁵Sp1².luc, GAL4-Elk-1 sowie $R_{\alpha q}$ codierten. Die infizierten Zellen wurden 24 h bei 37 °C unter Serumreduktion gehalten und danach für 24 h mit 1 μM CNO stimuliert oder blieben unstimuliert. Gezeigt ist die errechnete Induktion der transkriptionellen Elk-1-Aktivität nach $R_{\alpha q}$ -Stimulation mit Standardabweichung, bei n= 4. **D:** HEK293-Zellen wurden mit Lentiviren infiziert, welche für UAS⁵Sp1².luc, GAL4-Elk-1, $R_{\alpha q}$ sowie Δ CnA codierten. Zur Kontrolle wurden Viren verwendet, die mit dem Vektor pFUW produziert worden waren. Die infizierten Zellen wurden 24 h bei 37 °C unter Serumreduktion gehalten und danach für 24 h mit 1 μM CNO stimuliert oder blieben unstimuliert. Dargestellt ist die, durch Δ CnA-Expression bewirkte, relative Reduktion der transkriptionellen Elk-1-Aktivität nach $R_{\alpha q}$ -Stimulation mit Standardabweichung. Ein T-Test ergab eine statistische Relevanz mit p<0,001 (***), bei n= 4 (TS 2; DL 2).

3.1.5. Die Expression von Calcineurin hemmt auch die CRE-vermittelte Transkription nach $R\alpha_q$ -Stimulation

Die im Egr-1-Promotor enthaltenen SRE und CRE werden durch Transkriptionsfaktoren wie den TCF Elk-1 (SRE) und CREB (CRE) aktiviert. In den vorangegangenen Experimenten wurde gezeigt, dass die Expression der Phosphatase Δ CnA eine Reduktion der SRE-vermittelten Transkription nach $R\alpha_q$ -Stimulation zur Folge hat. Dies kann durch ein vermindertes transkriptionelles Aktivierungspotential des TCF Elk-1 nach $R\alpha_q$ -Stimulation erklärt werden. In vorangegangenen Studien wurden Zusammenhänge zwischen der Aktivität der Phosphatase Calcineurin, der CREB-Aktivität und somit der CRE-vermittelten Transkription gezeigt (Kingsbury et al., 2007; Bito et al., 1996; Schwaninger et al., 1993; Hahm et al., 2003; Lam et al., 2009). Daher wurde im Folgenden untersucht, ob die Expression von Δ CnA einen Einfluss auf die CRE-vermittelte Transkription nach Stimulation von $R\alpha_q$ hat. Um diese zu untersuchen, wurde ein Reportergen verwendet, bei dem die Expression der Luziferase unter Kontrolle von CRE steht (c-FosCRE⁴.luc). Bei c-FosCRE⁴.luc steht die Expression der Luziferase unter Kontrolle von vier aus dem c-Fos-Promotor abgeleiteten CREs (Thiel et al., 2005). HEK293-Zellen wurden mit zwei verschiedenen Lentiviren infiziert. Diese codierten das Reportergen c-FosCRE⁴.luc sowie den Designerrezeptor $R\alpha_q$. Die Stimulation von $R\alpha_q$ durch CNO resultierte in einer 5,2-fachen Erhöhung der CRE-regulierten Transkription, im Vergleich zur umstimulierten Kontrolle (Abbildung 16B). Dies bestätigt frühere Daten (Kaufmann et al., 2013).

Um die Auswirkung der Expression von Δ CnA auf die CRE-vermittelte Transkription zu untersuchen, wurden HEK293-Zellen mit drei verschiedenen Lentiviren infiziert. Diese codierten den Reporter c-FosCRE⁴.luc, den Designerrezeptor $R\alpha_q$ und Δ CnA. Zur Kontrolle wurden die Zellen mit Viren infiziert, die mit dem Vektor pFUW produziert wurden. Die Expression von Δ CnA sorgte für eine signifikante Reduktion der CRE-vermittelten Transkription auf 57 % des Kontrollwertes nach Stimulation von $R\alpha_q$ mit CNO (Abbildung 16C). Dies zeigt, dass die CRE-vermittelte Transkription nach Stimulation von $R\alpha_q$ durch die Expression der Phosphatase Δ CnA signifikant reduziert wird.

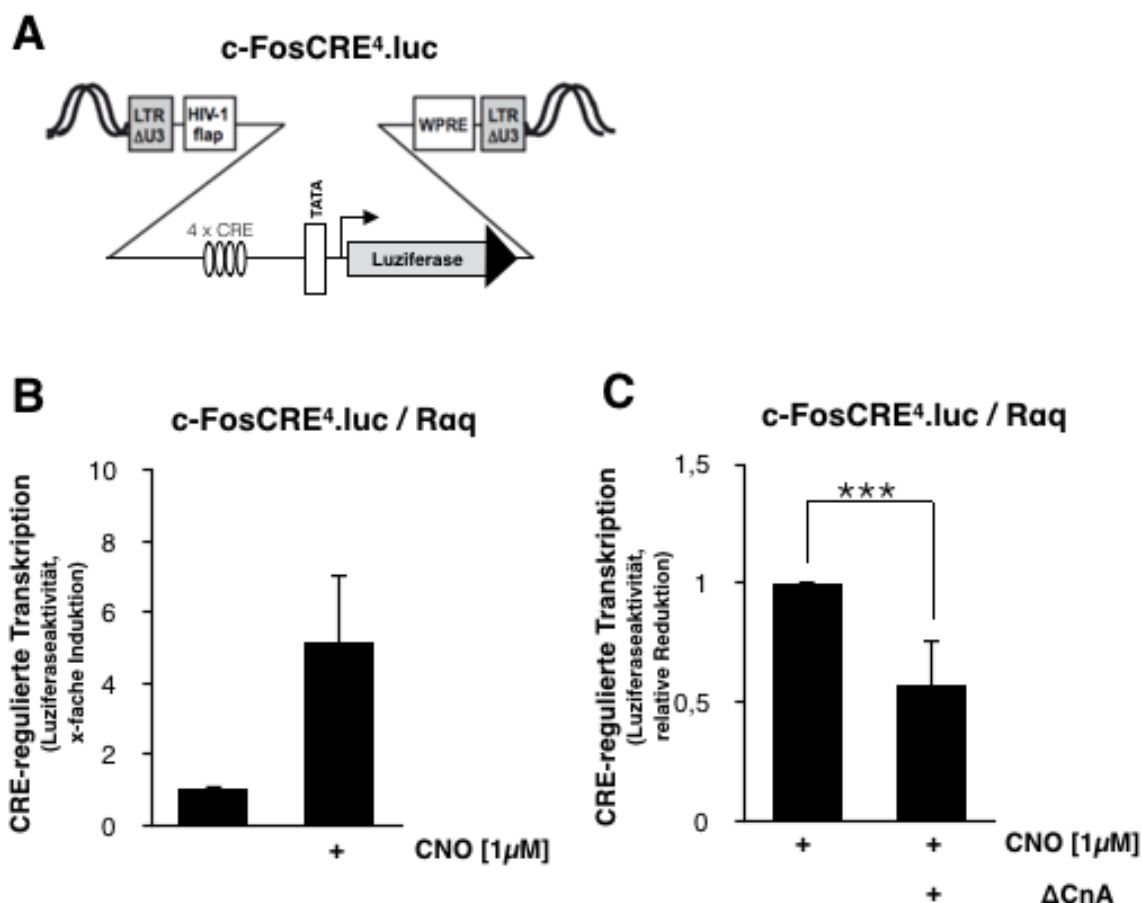


Abbildung 16: Die Expression von Δ CnA interferiert mit der CRE-regulierten Transkription nach Stimulation des Designerrezeptors $R\alpha_q$ mit CNO

A: Provirus, welcher das c-FosCRE⁴/Luziferase Reportergen codiert. Die Expression der Luziferase steht unter Kontrolle eines Promotors mit vier aus dem c-Fos-Promotor stammenden CREs. **B:** HEK293-Zellen wurden mit Lentiviren infiziert, welche c-FosCRE⁴.luc und $R\alpha_q$ codierten. Die infizierten Zellen wurden 24 h bei 37 °C unter Serumreduktion gehalten und danach für 24 h mit 1 μM CNO stimuliert oder blieben unstimuliert. Gezeigt ist die errechnete Induktion der CRE-regulierten Transkription nach $R\alpha_q$ -Stimulation mit Standardabweichung bei n= 5. **C:** HEK293-Zellen wurden mit Lentiviren infiziert, welche für c-FosCRE⁴.luc, $R\alpha_q$ sowie Δ CnA codierten. Zur Kontrolle wurden Viren verwendet, die mit dem Vektor pFUW produziert worden waren. Die infizierten Zellen wurden 24 h bei 37 °C unter Serumreduktion gehalten und danach für 24 h mit 1 μM CNO stimuliert oder blieben unstimuliert. Dargestellt ist die durch Δ CnA-Expression bewirkte relative Reduktion der CRE-regulierten Transkription nach $R\alpha_q$ -Stimulation mit Standardabweichung. Ein T-Test ergab eine statistische Relevanz mit $p < 0,001$ (***), bei n= 5 (TS 2; DL 3).

3.1.6. Calcineurin hemmt die transkriptionelle CREB-Aktivität nach Stimulation von $R\alpha_q$ und bei Expression der katalytischen Untereinheit der Proteinkinase A

Es wurde gezeigt, dass die Stimulation von $R\alpha_q$ in HEK293-Zellen eine Erhöhung der CRE-vermittelten Transkription zur Folge hat und diese durch die Expression der Phosphatase Δ CnA reduziert wird (Abbildung 16). Die CRE-vermittelte Transkription wird durch die Aktivierung des Transkriptionsfaktors CREB initiiert. Wie auch TCFs muss CREB phosphoryliert werden, um transkriptionell aktiv zu sein. Es existieren unterschiedliche Signalkaskaden, an deren Ende die Phosphorylierung und somit die Steigerung der transkriptionellen Aktivität von CREB steht. Durch

die Stimulation von $R\alpha_q$ wird die Kaskade der MAP-Kinasen im Zytosol aktiviert. Die MAP-Kinase Erk wird dabei phosphoryliert (P-Erk), gelangt in den Zellkern und wirkt dort durch die Phosphorylierung kernspezifischer Faktoren, wie zum Beispiel MSK. MSK wiederum ist in der Lage CREB zu phosphorylieren, wodurch dessen transkriptionelle Aktivität steigt und die CRE-vermittelte Transkription aktiviert wird (Abbildung 5). Der bedeutenste Weg, der zu einer Steigerung der transkriptionellen Aktivität von CREB führt, läuft jedoch über die PKA. Diese wird cAMP-abhängig nach Stimulation von $G\alpha_s$ -Rezeptoren aktiviert (siehe 1.3.2.).

Im folgenden Experiment wurde das transkriptionelle Aktivierungspotential von CREB in Abhängigkeit der unterschiedlichen Stimulationswege untersucht. Zum einen nach $R\alpha_q$ -Aktivierung über MAP-Kinasen und im Vergleich dazu über die Aktivität der PKA (für Übersicht beider Stimulationswege, siehe Abbildung 5). Um das transkriptionelle Aktivierungspotential von CREB nach Stimulation durch die PKA und deren Beeinflussung durch ΔCnA zu untersuchen, wurden die Zellen mit Viren infiziert, welche eine konstitutiv aktive Form der katalytischen Untereinheit der PKA codieren (NLSC α). Vorangegangene Studien zeigten, dass NLSC α eine hohe Potenz hat, das transkriptionelle Aktivierungspotential von CREB zu steigern und die CREB-abhängige Transkription zu initiieren (Thiel et al., 2005).

Im folgenden Experiment wurde untersucht, ob das transkriptionelle Aktivierungspotential von CREB durch die Expression von ΔCnA beeinflusst wird. Hierfür wurde ein GAL4-CREB-Fusionsprotein exprimiert. Dieses setzte sich aus der DNA-Bindedomäne von GAL4, einem hefespezifischen Transkriptionsfaktor und einer verkürzten Form von CREB zusammen. Bei dieser verkürzten Form von CREB war die am C-Terminus lokalisierte „basische Leucin-Zipper“ (bZIP)-DNA-Bindedomäne deletiert. Die Aktivierungsdomäne mit der Phosphorylierungsstelle Ser-133 (= *kinase induced domain*; KID) war jedoch enthalten (Abbildung 17A). Es wurde das Reportergen UAS⁵Sp1².luc verwendet. Somit war die Expression der Luziferase lediglich von der Phosphorylierung der KID im GAL4-CREB-Fusionsprotein abhängig (Rössler et al., 2008).

Um das transkriptionelle Aktivierungspotential von CREB nach der Stimulation des Designerrezeptors $R\alpha_q$ zu untersuchen, wurden HEK293-Zellen mit drei verschiedenen Lentiviren infiziert. Diese codierten UAS⁵Sp1².luc, GAL4-CREB und den Designerrezeptor $R\alpha_q$. Die Stimulation des Designerrezeptors $R\alpha_q$ durch CNO resultierte in einer 3,3-fachen Erhöhung des transkriptionellen Aktivierungspotentials von CREB, im Vergleich zur umstimulierten Kontrolle (Abbildung 17B). Dadurch wurden frühere Daten bestätigt (Kaufmann et al., 2013).

Im nächsten Schritt wurde überprüft, ob die Expression der Phosphatase ΔCnA einen Einfluss auf das transkriptionelle Aktivierungspotential von CREB nach $R\alpha_q$ -Stimulation hat. Hierzu wurden HEK293-Zellen mit vier verschiedenen Lentiviren infiziert. Diese codierten UAS⁵Sp1².luc, GAL4-CREB, den Designerrezeptor $R\alpha_q$ und ΔCnA . Zur Kontrolle wurden die Zellen mit Viren infiziert, die mit dem Vektor pFUW produziert wurden. Die Expression von ΔCnA sorgte für eine signifikante Reduktion des transkriptionellen Aktivierungspotentials von CREB auf 45 % des Kontrollwertes nach Stimulation von $R\alpha_q$ mit CNO (Abbildung 17C).

Um das transkriptionelle CREB-Aktivierungspotential bei Expression von NLSC α zu untersuchen, wurden HEK293-Zellen mit drei verschiedenen Lentiviren infiziert. Diese codierten UAS⁵Sp1².luc, GAL4-CREB und NLSC α (für den genauen Ablauf der Stimulation durch NLSC α , siehe 2.8.6. und

Abbildung 11). Zur Kontrolle wurden die Zellen statt mit NLSC α -codierenden Viren mit Viren infiziert, welche mit dem Vektor pFUW produziert worden waren. Die Expression von NLSC α resultierte in einem 3,8-fach erhöhten transkriptionellen Aktivierungspotential von CREB, verglichen mit der Kontrolle (Abbildung 17D).

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob die Expression der Phosphatase Δ CnA einen Einfluss auf das transkriptionelle Aktivierungspotential von CREB bei der Expression von NLSC α hat. Hierzu wurden HEK293-Zellen mit vier verschiedenen Lentiviren infiziert. Diese codierten UAS⁵Sp1².luc, GAL4-CREB, NLSC α und Δ CnA. Zur Kontrolle wurden die Zellen wiederum mit Viren infiziert, die mit dem Vektor pFUW produziert wurden. Die Expression von Δ CnA sorgte für eine signifikante Reduktion der transkriptionellen Aktivität von CREB auf 45 % des Kontrollwertes bei der Expression von NLSC α (Abbildung 17E).

Somit konnte gezeigt werden, dass die Expression der Phosphatase Δ CnA einen hemmenden Einfluss auf das transkriptionelle CREB-Aktivierungspotential hat. Diese Hemmung liegt sowohl nach Stimulation des Designerrezeptors R α_q vor als auch bei der Expression von NLSC α .

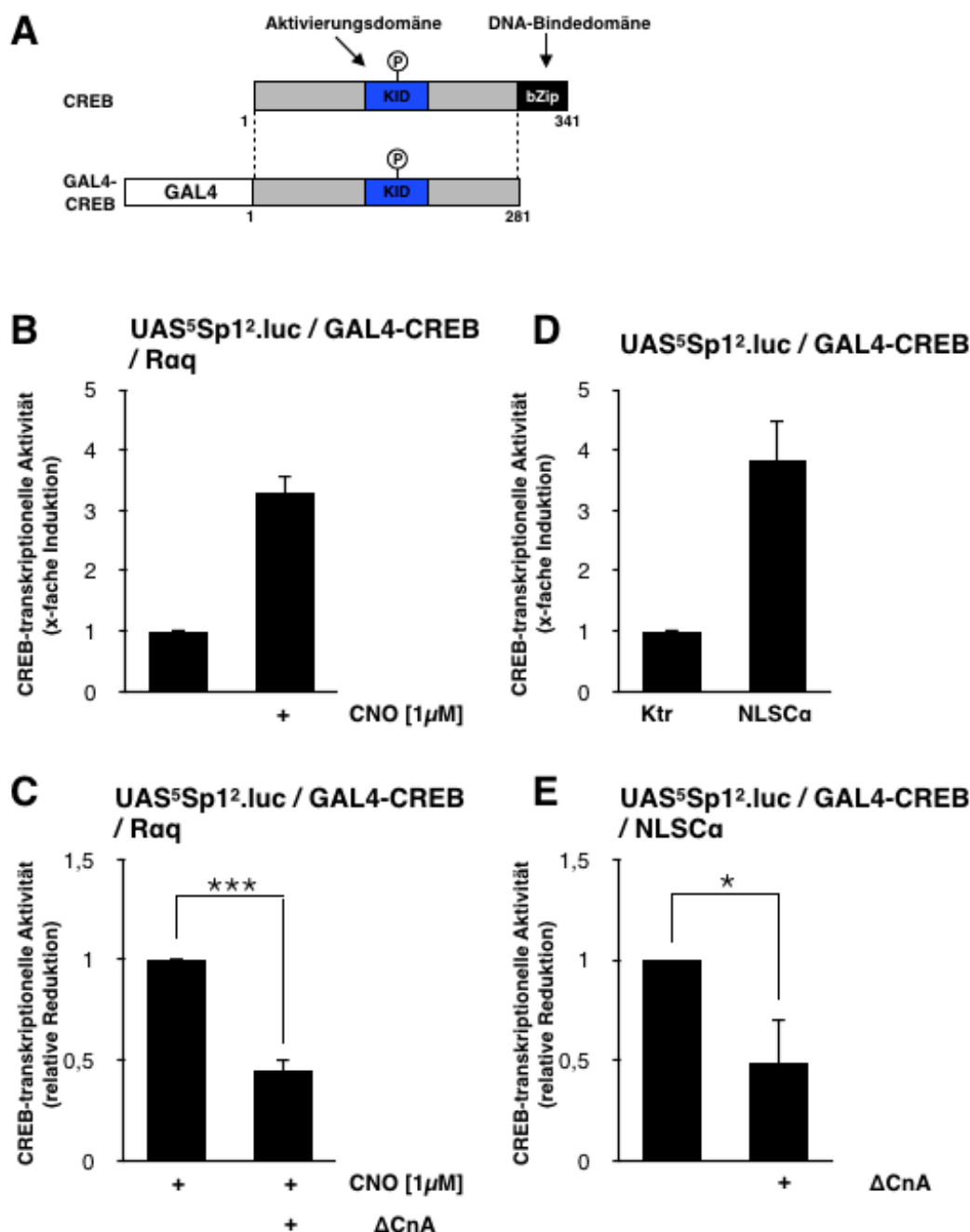


Abbildung 17: Die Expression von Δ CnA vermindert die transkriptionelle Aktivität von CREB nach Stimulation des Designerrezeptors $R\alpha_q$ mit CNO sowie nach Expression von NLSC α

A: Modulare Struktur von CREB sowie des GAL4-CREB-Fusionsproteins. CREB: Die DNA-Bindedomäne befindet sich als bZIP-Domäne am C-Terminus. Zwischen N- und C-Terminus liegt die „Kinasen induzierte Domäne“ (KID) mit der Phosphorylierungsstelle Ser-133. GAL4-EIk-1: Die C-terminale DNA-Bindedomäne von CREB ist deletiert. Der Rest von CREB, einschließlich der KID, wurde mit der DNA-Bindedomäne von GAL4 fusioniert. **B:** HEK293-Zellen wurden mit Lentiviren infiziert, welche für UAS⁵Sp1².luc, GAL4-CREB sowie $R\alpha_q$ codierten. Die infizierten Zellen wurden 24 h bei 37 °C unter Serumreduktion gehalten und danach für 24 h mit 1 μM CNO stimuliert oder blieben unstimuliert. Gezeigt ist die Induktion der transkriptionellen CREB-Aktivität nach $R\alpha_q$ -Stimulation, mit Standardabweichung bei n= 4. **C:** HEK293-Zellen wurden mit Lentiviren infiziert, welche für UAS⁵Sp1².luc, GAL4-CREB, $R\alpha_q$ sowie Δ CnA codierten. Zur Kontrolle wurden Viren verwendet, die mit dem Vektor pFUW produziert worden waren. Die infizierten Zellen wurden 24 h bei 37 °C unter Serumreduktion gehalten und danach für 24 h mit 1 μM CNO stimuliert oder blieben unstimuliert. Dargestellt ist die durch Δ CnA-Expression bewirkte relative Reduktion der transkriptionellen CREB-Aktivität nach $R\alpha_q$ -Stimulation mit Standardabweichung. Ein T-Test ergab eine statistische Relevanz mit p<0,001 (***), bei n= 5. **D:** HEK293-Zellen wurden mit Lentiviren infiziert, welche für UAS⁵Sp1².luc und GAL4-CREB codierten. Zusätzlich wurden die Zellen mit Lentiviren infiziert, welche für

NLSC α codierten. Zur Kontrolle wurden die Zellen statt für NLSC α -codierende Viren, mit Viren infiziert, die mit dem Vektor pFUW produziert worden waren. Die infizierten Zellen wurden 48 h bei 37 °C unter Serumreduktion gehalten. Gezeigt ist die durch NLSC α -Expression bewirkte Induktion der transkriptionellen CREB-Aktivität mit Standardabweichung, bei n= 3. **E:** HEK293-Zellen wurden mit Lentiviren infiziert, welche für UAS^{Sp12}.luc, GAL4-CREB, NLSC α , sowie Δ CnA codierten. Zur Kontrolle wurden Viren verwendet, die mit dem Vektor pFUW produziert worden waren. Die infizierten Zellen wurden 48 h bei 37 °C unter Serumreduktion gehalten. Dargestellt ist die durch Δ CnA bewirkte relative Reduktion der transkriptionellen CREB-Aktivität bei NLSC α -Expression mit Standardabweichung. Ein T-Test ergab eine statistische Relevanz mit p<0,05 (*), bei n= 3 (TS 1; DL 2).

3.2. Die Expression von Δ CnA sowie von CalcineurinB hemmt die AP-1-abhängige Transkription nach R α_q -Stimulation

„*Activator protein 1*“ (AP-1) ist ein Transkriptionsfaktor, welcher sich als Homo- bzw. Heterodimer aus den bZIP-Proteinen c-Fos, c-Jun und ATF bildet. Die Zusammensetzung ist je nach Signaltransduktionsweg und dem zu aktivierenden Gen variabel (Chiu et al., 1988). In vorangegangenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die Stimulation des Designerrezeptors R α_q mit CNO in HEK293-Zellen zu einer Aktivierung der AP-1-abhängigen Transkription führt (Kaufmann et al., 2013).

Zunächst wurde gezeigt, dass die Stimulation von R α_q mit CNO die AP-1-abhängige Transkription initiiert. Es wurde ein Reporter gen verwendet, bei dem Expression der Luziferase ausschließlich von AP-1 abhängt. Hierzu eignet sich der Promotor des Kollagenase-Gens. Dieser beinhaltet das AP-1 sensitive „*TPA response element*“ (TRE), welchem eine hohe Affinität zu c-Jun/c-Fos Heterodimeren zugeschrieben wird (Chiu et al., 1988; Curran & Franza, 1988; Angel et al., 1987). Der Promotor des Kollagenase-Gens wurde mit dem offenen Leserahmen des Luziferase-Gens kombiniert, woraus das AP-1-abhängige Reporter gen Coll.luc entstand (Rössler et al., 2008) (Abbildung 18A). Coll.luc wurde bereits in diversen Studien verwendet, um die AP-1-abhängige Transkription zu untersuchen (Angel et al., 1987; Thiel & Rössler 2014). Für das Experiment wurden HEK293-Zellen mit zwei verschiedenen Lentiviren infiziert. Diese codierten den Reporter Coll.luc sowie den Designerrezeptor R α_q . Die Stimulation von R α_q mit CNO sorgte für eine 10,2-fach erhöhte AP-1-abhängige Transkription, im Vergleich zur umstimulierten Kontrolle (Abbildung 18B). Damit wurden frühere Daten bestätigt (Kaufmann et al., 2013). Im nächsten Schritt wurde überprüft, ob eine Expression der Phosphatase Δ CnA einen Einfluss auf die AP-1-abhängige Transkription nach Stimulation von R α_q , hat. Hierzu wurden HEK293-Zellen mit drei verschiedenen Lentiviren infiziert. Diese codierten Coll.luc, den Designerrezeptor R α_q sowie Δ CnA. Zur Kontrolle wurden die Zellen mit Viren infiziert, die mit dem Vektor pFUW produziert wurden. Die Expression von Δ CnA sorgte für eine signifikante Reduktion der AP-1-abhängigen Transkription auf 36 % des Kontrollwertes (Abbildung 18C) nach Stimulation von R α_q mit CNO.

Damit wurde gezeigt, dass die Expression von Δ CnA einen hemmenden Einfluss auf die AP-1-abhängige Transkription nach Stimulation von R α_q mit CNO hat.

Der Signaltransduktionsweg nach Stimulation des Designerrezeptors R α_q mit CNO wurde bereits in 1.4.2. vorgestellt. Dabei spielt der Ca²⁺-Ausstrom aus dem ER eine entscheidende Rolle (Ciarcia et al. 2012; Kaufmann et al., 2013). Es existiert eine Vielzahl von Ca²⁺-responsiven Proteinen, über

die eine Signalweiterleitung erfolgen kann. Eines dieser Proteine ist CalcineurinB (CnB). CnB ist einer der Aktivatoren von CnA (Abbildung 12C) und besitzt vier EF-Motive, wobei es sich um eine spezifische Abfolge von Aminosäuren mit hoher Affinität zu Ca^{2+} -Ionen handelt (Abbildung 18D). Nach der Ca^{2+} -Bindung kommt es zu einer Konformationsänderung, wodurch die Aktivierung von CnA erfolgen kann. Im folgenden Experiment wurde untersucht, ob die Expression von CnB einen Einfluss auf die AP1-abhängige Transkription nach Stimulation von $\text{R}\alpha_q$, hat. Ein solcher Einfluss konnte bereits für HEK293-Zellen nach Stimulation von TRPM3 (*Transient receptor potential cation channel subfamily M member 3*) mit Pregnenolonsulfat gezeigt werden (Lesch et al., 2017). Um das Experiment durchführen zu können, wurden HEK293-Zellen mit drei verschiedenen Lentiviren infiziert. Diese codierten für das Reportergen Coll.luc, den Designerrezeptor $\text{R}\alpha_q$ sowie CnB. Als Kontrolle wurden die Zellen mit Viren infiziert, die mit dem Vektor pFUW produziert wurden. Die Expression von CnB sorgte für eine signifikante Reduktion der AP-1-abhängigen Transkription auf 63 % des Kontrollwertes nach Stimulation von $\text{R}\alpha_q$ mit CNO (Abbildung 18E). Es wurde gezeigt, dass sowohl die Expression der Phosphatase ΔCnA als auch die Expression des Ca^{2+} -bindenden Proteins CnB einen hemmenden Einfluss auf die AP1-Aktivität nach Stimulation von $\text{R}\alpha_q$ mit CNO haben.

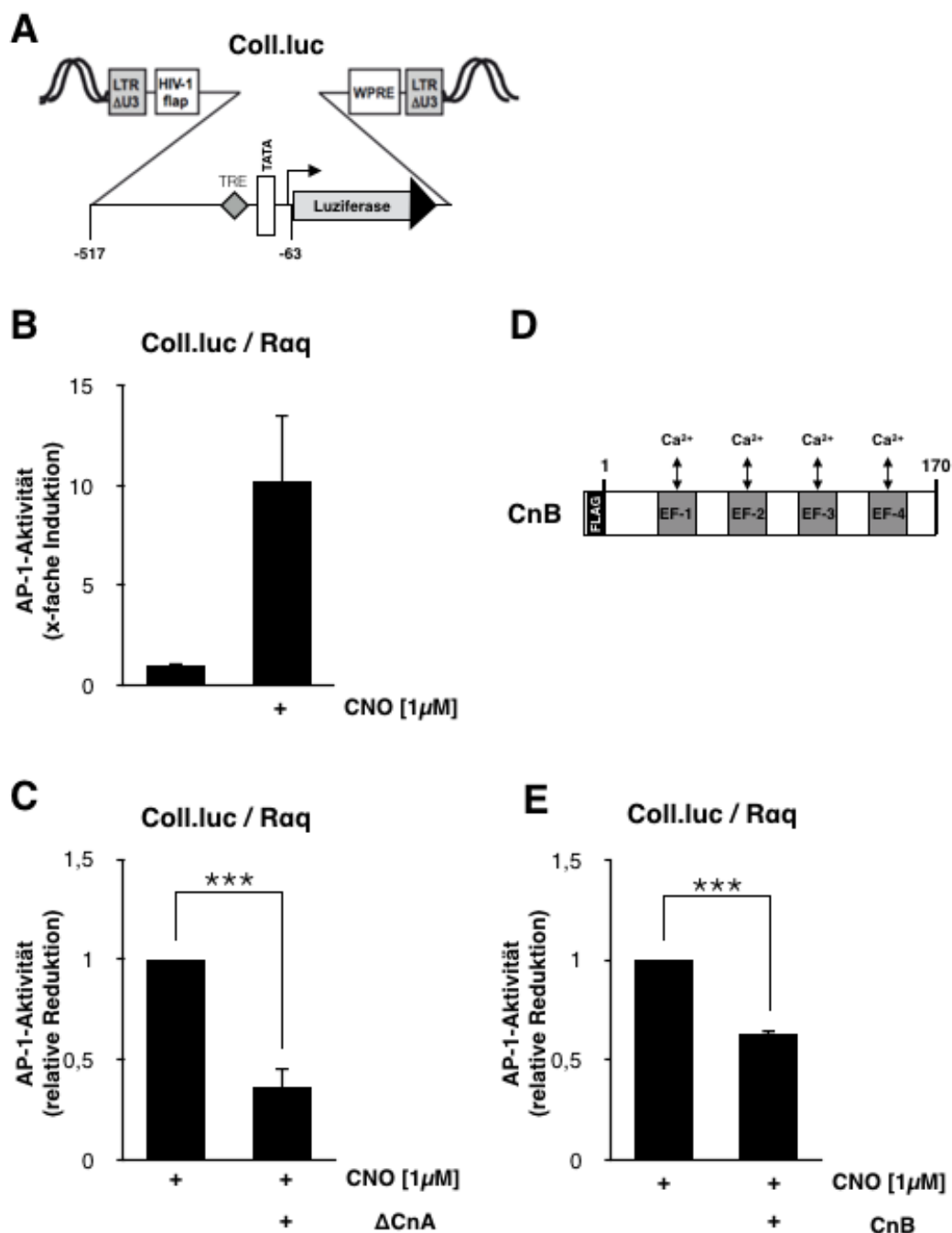


Abbildung 18: Die Expression von Δ CnA sowie von CnB hemmen die AP1-Aktivität nach Stimulation des Designerrezeptors $R\alpha_q$ mit CNO

A: Provirus, welcher für das Kollagenase/Luziferase Reportergen codiert. Die Expression der Luziferase steht unter Kontrolle eines AP-1-responsiven Promotors. **B:** HEK293-Zellen wurden mit Lentiviren infiziert, welche für Coll.luc und $R\alpha_q$ codierten. Die infizierten Zellen wurden 24 h bei 37 °C unter Serumreduktion gehalten und danach für 24 h mit 1 μM CNO stimuliert oder blieben unstimuliert. Gezeigt ist die Induktion der AP1-Aktivität nach $R\alpha_q$ -Stimulation mit Standardabweichung, bei n= 4. **C:** HEK293-Zellen wurden mit Lentiviren infiziert, welche für Coll.luc, $R\alpha_q$ sowie Δ CnA codierten. Zur Kontrolle wurden Viren verwendet, die mit dem Vektor pFUW produziert worden waren. Die infizierten Zellen wurden 24 h bei 37 °C unter Serumreduktion gehalten und danach für 24 h mit 1 μM CNO stimuliert oder blieben unstimuliert. Dargestellt ist die, durch Δ CnA bewirkte relative Reduktion der AP-1-Aktivität nach $R\alpha_q$ -Stimulation mit Standardabweichung. Ein T-Test ergab eine statistische Relevanz mit $p < 0,001$ (***), bei n= 4 (TS 1; DL 1; GT 2). **D:** CalcineurinB (CnB): Hierbei handelt es sich um ein Ca²⁺-bindendes Protein mit vier Ca²⁺-sensitiven EF-Domänen. CnB kann CnA spezifisch aktivieren. **E:** HEK293-Zellen wurden mit Lentiviren infiziert, welche für Coll.luc, $R\alpha_q$ sowie CnB codierten. Zur Kontrolle wurden Viren verwendet, die mit dem Vektor pFUW produziert worden waren. Die infizierten Zellen wurden 24 h bei 37 °C unter Serumreduktion gehalten und danach für 24 h mit 1 μM CNO stimuliert oder blieben unstimuliert. Dargestellt ist die durch CnB-Expression

bewirkte relative Reduktion der AP-1-Aktivität nach $R\alpha_q$ -Stimulation mit Standardabweichung. Ein T-Test ergab eine statistische Relevanz mit $p < 0,001$ (***), bei $n = 3$ (TS 1; DL 2).

3.2.1. ΔCnA vermindert die c-Jun-Promotoraktivität und das transkriptionelle Aktivierungspotential von c-Jun nach $R\alpha_q$ -Stimulation

Im vorangegangenen Experiment wurde gezeigt, dass die Expression der Phosphatase ΔCnA einen hemmenden Effekt auf die AP1-abhängige Transkription nach Stimulation von $R\alpha_q$ mit CNO hat. Der AP-1-Sensor Coll.luc ist spezifisch für c-Jun/c-Fos-Heterodimere (Chiu et al., 1988; Curran & Franza, 1988). Beide Faktoren müssen phosphoryliert werden, um biologisch aktiv zu sein. Eine mögliche Erklärung für die reduzierte AP-1-abhängige Transkription ist eine verminderte Phosphorylierung und somit ein vermindertes transkriptionelles Aktivierungspotential von c-Jun oder c-Fos. In den folgenden Experimenten wurde untersucht, ob die Expression der Phosphatase ΔCnA die biologische Aktivität von c-Jun und c-Fos beeinträchtigt.

Zunächst wurde die Aktivität von c-Jun nach Stimulation von $R\alpha_q$ mit CNO untersucht. Hierzu wurde ein GAL4-c-Jun-Fusionsprotein exprimiert, bei dem GAL4 mit einer verkürzten Form von c-Jun fusioniert war. Bei dieser verkürzten Form von c-Jun war die am C-Terminus lokalisierte bZip-DNA-Binde- und Dimerisierungsdomäne deletiert. Die phosphorylierbare Aktivierungsdomäne war jedoch enthalten (Abbildung 19A). Es wurde das Reportergen $UAS^5Sp1^2.luc$ verwendet, bei dem GAL4 spezifisch an das UAS-Motiv bindet. Die Expression der Luziferase war neben der Bindung von GAL4 an UAS von der Phosphorylierung der c-Jun Aktivierungsdomäne im GAL4-c-Jun-Fusionsprotein abhängig (Rössler et al., 2008). Zur Durchführung des Experimentes wurden HEK293-Zellen mit drei verschiedenen Lentiviren infiziert. Diese codierten $UAS^5Sp1^2.luc$, GAL4-c-Jun und den Designerrezeptor $R\alpha_q$. Die Stimulation des Designerrezeptors $R\alpha_q$ mit CNO resultierte in einer 2-fach erhöhten biologischen Aktivität von c-Jun, verglichen mit der umstimulierten Kontrolle (Abbildung 19B).

Nun wurde untersucht, welchen Einfluss die Expression der Phosphatase ΔCnA auf die c-Jun-Aktivität nach Stimulation von $R\alpha_q$ durch CNO hat. Hierzu wurden HEK293-Zellen mit vier verschiedenen Lentiviren infiziert. Diese codierten für $UAS^5Sp1^2.luc$, GAL4-c-Jun, $R\alpha_q$ sowie ΔCnA . Zur Kontrolle wurden die Zellen mit Viren infiziert, die mit dem Vektor pFUW produziert wurden. Die Expression von ΔCnA sorgte für eine signifikante Reduktion der biologischen Aktivität von c-Jun auf 65 % des Kontrollwertes (Abbildung 19C) nach Stimulation des Designerrezeptors $R\alpha_q$ mit CNO.

Damit wurde gezeigt, dass die Expression von ΔCnA einen hemmenden Einfluss auf die Aktivität von c-Jun nach Stimulation von $R\alpha_q$ mit CNO, hat.

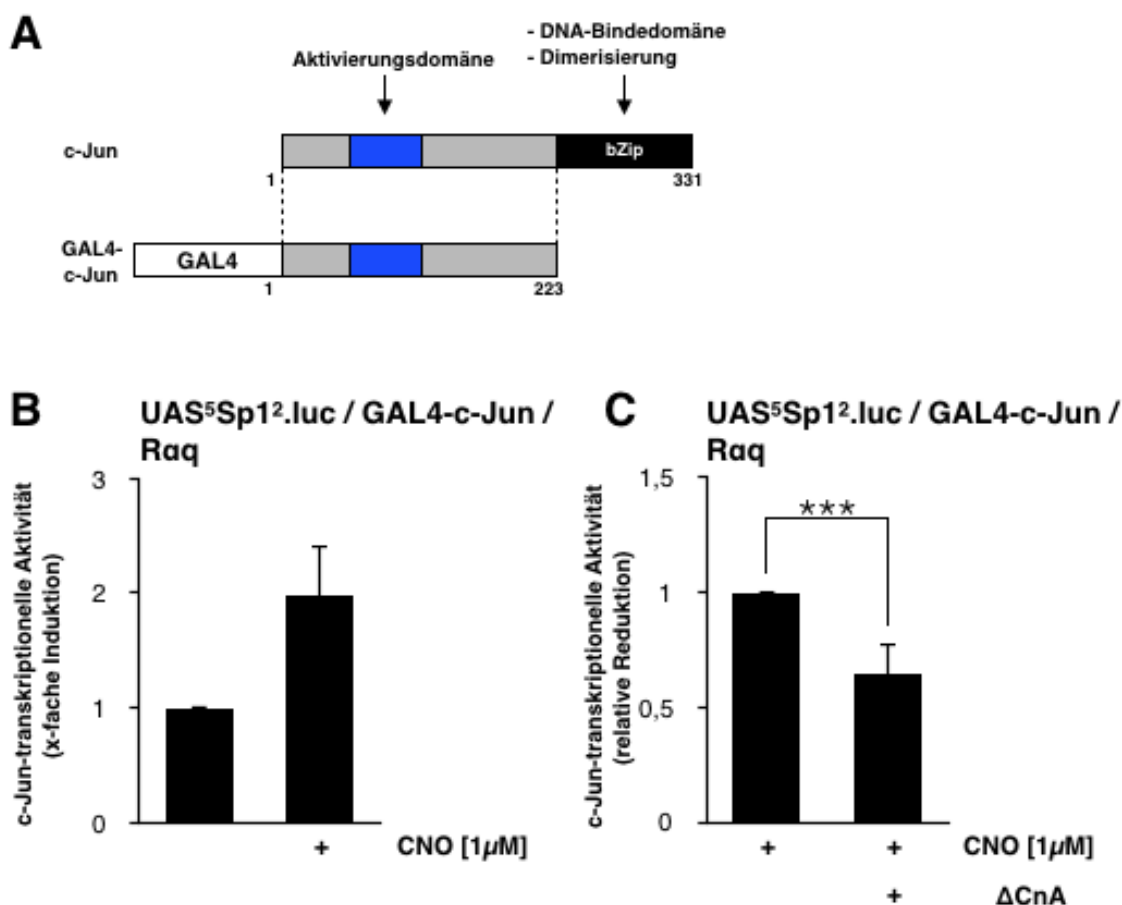


Abbildung 19: Die Expression von Δ CnA vermindert das transkriptionelle Aktivierungspotential von c-Jun nach Stimulation des Designerrezeptors $R\alpha_q$ mit CNO

A: Modulare Struktur von c-Jun und dem GAL4-c-Jun-Fusionsprotein. c-Jun: Die DNA-Binde- und Dimerisierungsdomäne befindet sich als bZIP-Domäne am C-Terminus. Nahe des N-Terminus liegen die Phosphorylierungsstellen. GAL4-c-Jun: Die C-terminale DNA-Binde- und Dimerisierungsdomäne von c-Jun wurde deletiert. Der Rest von c-Jun wurde mit der DNA-Binde- und Dimerisierungsdomäne von GAL4 fusioniert. **B:** HEK293-Zellen wurden mit Lentiviren infiziert, welche für UAS⁵Sp1².luc, GAL4-c-Jun und $R\alpha_q$ codierten. Die infizierten Zellen wurden 24 h bei 37 °C unter Serumreduktion gehalten und danach für 24 h mit 1 μ M CNO stimuliert oder blieben unstimuliert. Gezeigt ist die errechnete relative Induktion der transkriptionellen c-Jun-Aktivität nach $R\alpha_q$ -Stimulation mit Standardabweichung bei n= 4. **C:** HEK293-Zellen wurden mit Lentiviren infiziert, welche für UAS⁵Sp1².luc, GAL4-c-Jun, $R\alpha_q$ sowie Δ CnA codierten. Zur Kontrolle wurden Viren verwendet, die mit dem Vektor pFUW produziert worden waren. Die infizierten Zellen wurden 24 h bei 37 °C unter Serumreduktion gehalten und danach für 24 h mit 1 μ M CNO stimuliert oder blieben unstimuliert. Dargestellt ist die, durch Δ CnA bewirkte, relative Reduktion der transkriptionellen c-Jun-Aktivität mit Standardabweichung. Ein T-Test ergab eine statistische Relevanz mit p<0,001 (***), bei n= 4 (TS 1; DL 2).

Kaufmann und Kollegen (2013) zeigten, dass die Aktivierung des Designerrezeptors $R\alpha_q$ mit CNO neben einer erhöhten c-Jun-Aktivität auch eine erhöhte c-Jun-Expression zur Folge hat. Daher wurde untersucht, welchen Einfluss die Expression der Phosphatase Δ CnA auf die c-Jun-Promotoraktivität hat. Hierzu wurde ein Reporter-gen verwendet, bei dem die Expression der Luziferase unter Kontrolle des c-Jun-Promotors stand. Dieser beinhaltet zwei AP-1-responsive TREs (Abbildung 20A) (Thiel & Rössler, 2011). HEK293-Zellen wurden zunächst mit zwei verschiedenen Lentiviren infiziert. Diese codierten für den Reporter c-Jun.luc sowie für $R\alpha_q$. Die

Stimulation von $R\alpha_q$ mit CNO resultierte in einer 2-fach erhöhten c-Jun-Promotoraktivität, verglichen mit der umstimulierten Kontrolle (Abbildung 20B).

Um den Einfluss von ΔCnA auf die c-Jun-Promotoraktivität nach Stimulation von $R\alpha_q$ durch CNO zu untersuchen, wurden HEK293-Zellen mit drei verschiedenen Lentiviren infiziert. Diese codierten für c-Jun.luc, $R\alpha_q$ sowie ΔCnA - bzw. zur Kontrolle pFUW. Die Expression von ΔCnA sorgte für eine signifikante Reduktion der c-Jun-Promotoraktivität auf 61 % des Kontrollwertes nach Stimulation des Designerrezeptors $R\alpha_q$ mit CNO (Abbildung 20C).

Damit wurde gezeigt, dass die Expression der Phosphatase ΔCnA den c-Jun-Promotor nach Stimulation von $R\alpha_q$ mit CNO hemmt.

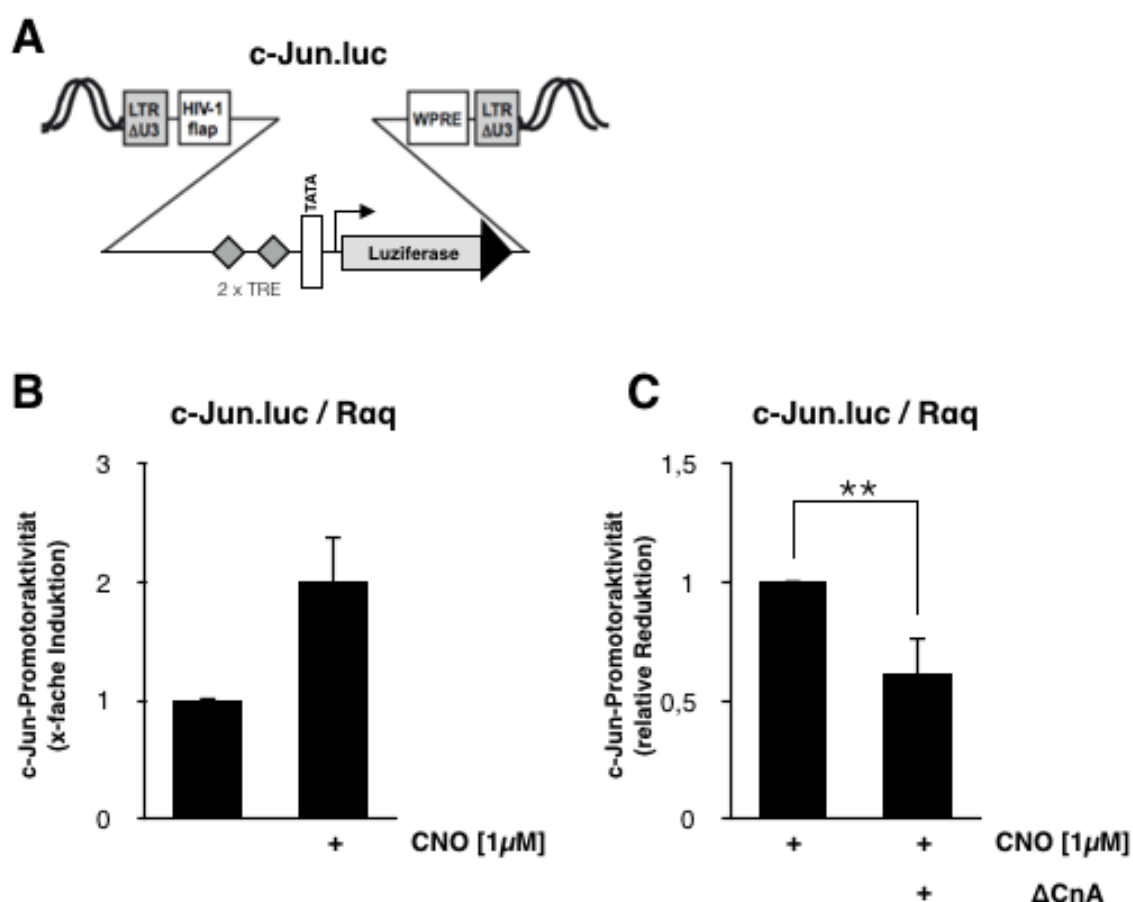


Abbildung 20: Die Expression von ΔCnA reduziert die c-Jun-Promotoraktivität nach Stimulation des Designerrezeptors $R\alpha_q$ mit CNO

A: Provirus, welches für das c-Jun/Luziferase Reportergen codiert. **B:** HEK293-Zellen wurden mit Lentiviren infiziert, welche c-Jun.luc und $R\alpha_q$ codierten. Die infizierten Zellen wurden 24 h bei 37 °C unter Serumreduktion gehalten und danach für 24 h mit 1 μM CNO stimuliert oder blieben unstimuliert. Gezeigt ist die errechnete Induktion der c-Jun-Promotoraktivität nach $R\alpha_q$ -Stimulation mit Standardabweichung, bei n=4. **C:** HEK293-Zellen wurden mit Lentiviren infiziert, welche für c-Jun.luc, $R\alpha_q$ sowie ΔCnA codierten. Zur Kontrolle wurden Viren verwendet, die mit dem Vektor pFUW produziert worden waren. Die infizierten Zellen wurden 24 h bei 37 °C unter Serumreduktion gehalten und danach für 24 h mit 1 μM CNO stimuliert oder blieben unstimuliert. Dargestellt ist die durch ΔCnA bewirkte relative Reduktion der c-Jun-Promotoraktivität nach $R\alpha_q$ -Stimulation mit Standardabweichung. Ein T-Test ergab eine statistische Relevanz mit $p < 0,001$ (***), bei n=4 (TS 2; DL 2).

3.2.2. Δ CnA vermindert die c-Fos-Promotoraktivität sowie das transkriptionelle Aktivierungspotential von c-Fos nach Stimulation von $R\alpha_q$

Es wurde gezeigt, dass die AP-1-abhängige Transkription durch die Expression der Phosphatase Δ CnA nach Stimulation von $R\alpha_q$ gehemmt wird. Der nächste Schritt bestand darin, zu untersuchen, wie die verminderte AP1-abhängige Transkription zustande kommt. Es wurde bereits gezeigt, dass die biologische c-Jun-Aktivität sowie die c-Jun-Promotoraktivität nach Stimulation von $R\alpha_q$ durch die Expression von Δ CnA gehemmt werden. Nun galt es herauszufinden, ob die Expression von Δ CnA einen ähnlichen Effekt auf c-Fos hat. Wie auch bei c-Jun erfolgt die c-Fos-Aktivierung durch Phosphorylierung. Um die biologische Aktivität von c-Fos zu untersuchen, wurde ein GAL4-c-Fos-Fusionsprotein exprimiert. Hierbei war GAL4 mit einer verkürzten Form von c-Fos fusioniert. Bei der verkürzten Variante von c-Fos war die zwischen N- und C-Terminus lokalisierte bZIP-DNA-Binde- und Dimerisierungsdomäne sowie die proximale Aktivierungsdomäne deletiert. Eine zweite, distale Aktivierungsdomäne war jedoch enthalten (Abbildung 21A). Durch die Verwendung des Reporters UAS⁵Sp1².luc war die Expression der Luziferase neben der Bindung von GAL4 an UAS von der Phosphorylierung der im GAL4-c-Fos-Fusionsprotein enthaltenen Aktivierungsdomäne abhängig (Thiel & Rössler, 2011). HEK293-Zellen wurden mit drei verschiedenen Lentiviren infiziert. Diese codierten UAS⁵Sp1².luc, GAL4-c-Fos sowie $R\alpha_q$. Die Stimulation des Designerrezeptors $R\alpha_q$ mit CNO resultierte in einer 2-fach erhöhten c-Fos-Aktivität, verglichen mit der umstimulierten Kontrolle (Abbildung 21B).

Als nächstes wurde untersucht, welchen Einfluss die Expression von Δ CnA auf die Aktivität von c-Fos nach $R\alpha_q$ -Stimulation hat. Hierzu wurden HEK293-Zellen mit vier verschiedenen Lentiviren infiziert. Diese codierten UAS⁵Sp1².luc, GAL4-c-Fos, $R\alpha_q$ sowie Δ CnA. Zur Kontrolle wurden die Zellen mit Viren infiziert, die mit dem Vektor pFUW produziert wurden. Die Expression von Δ CnA sorgte für eine signifikante Reduktion der c-Fos-Aktivität auf 50 % des Kontrollwertes (Abbildung 21C) nach Stimulation des Designerrezeptors $R\alpha_q$ mit CNO.

Es wurde gezeigt, dass die Expression von Δ CnA hemmend auf die c-Fos-Aktivität nach Stimulation von $R\alpha_q$ mit CNO wirkt.

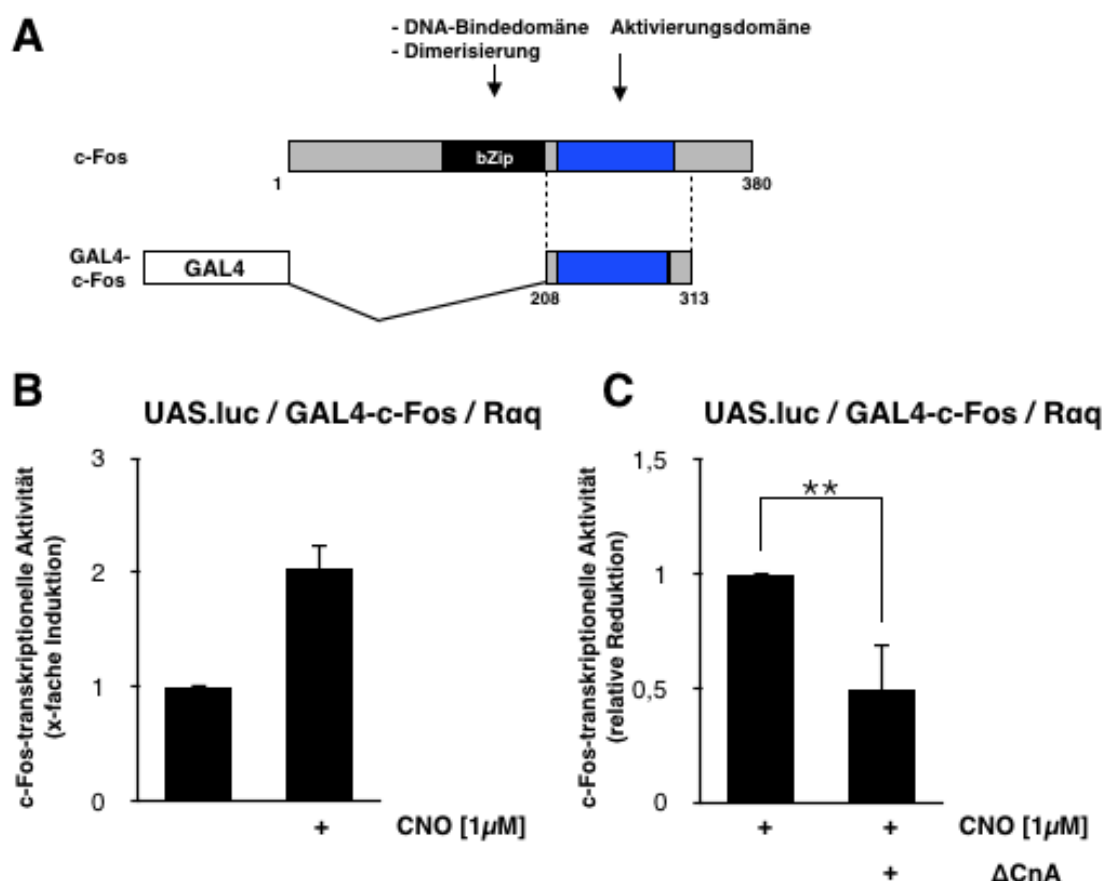


Abbildung 21: Die Expression von Δ CnA vermindert die transkriptionelle Aktivität von c-Fos nach Stimulation des Designerrezeptors Rmq mit CNO

A: Modulare Struktur von c-Fos und dem GAL4-c-Fos-Fusionsprotein. c-Fos: DNA-Binde- sowie Dimerisierungsdomäne befindet sich als bZIP-Domäne zwischen N- und C-Terminus. Die Aktivierungsdomäne mit den Phosphorylierungsstellen befindet sich nahe des C-Terminus. GAL4-c-Jun: Die DNA-Bindedomäne sowie der proximal davon gelegene Abschnitt von c-Jun wurden deletiert. Der Rest, einschließlich der Aktivierungsdomäne, wurde mit der DNA-Bindedomäne von GAL4 fusioniert. **B:** HEK293-Zellen wurden mit Lentiviren infiziert, welche für UAS⁵Sp1².luc, GAL4-c-Fos und Rmq codierten. Die infizierten Zellen wurden 24 h bei 37 °C unter Serumreduktion gehalten und danach für 24 h mit 1 μM CNO stimuliert oder blieben unstimuliert. Gezeigt ist die errechnete relative Induktion der transkriptionellen c-Fos-Aktivität nach Rmq-Stimulation mit Standardabweichung bei n= 4. **C:** HEK293-Zellen wurden mit Lentiviren infiziert, welche für UAS⁵Sp1².luc, GAL4-c-Fos, Rmq sowie Δ CnA codierten. Zur Kontrolle wurden Viren verwendet, die mit dem Vektor pFUW produziert worden waren. Die infizierten Zellen wurden 24 h bei 37 °C unter Serumreduktion gehalten und danach für 24 h mit 1 μM CNO stimuliert oder blieben unstimuliert. Dargestellt ist die, durch Δ CnA bewirkte, relative Reduktion der transkriptionellen c-Fos-Aktivität nach Rmq-Stimulation mit Standardabweichung. Ein T-Test ergab eine statistische Relevanz mit $p < 0,01$ (**), bei n= 4 (TS 2; DL 2).

Es wurde bereits, wie auch für c-Jun, gezeigt dass die Stimulation von Rmq neben einer erhöhten c-Fos-Aktivität auch eine gesteigerte c-Fos-Expression zur Folge hat (Kaufmann et al., 2013). Daher wurde der Einfluss der Phosphatase Δ CnA auf die c-Fos-Promotoraktivität nach Stimulation von Rmq untersucht.

Hierzu wurde ein Reportergen verwendet, bei dem die Expression der Luziferase unter Kontrolle des c-Fos-Promotors stand. Dieser beinhaltet ein SRE sowie ein CRE (Thiel & Rössler, 2011). HEK293-Zellen wurden mit zwei verschiedenen Lentiviren infiziert. Diese codierten c-Fos.luc sowie

den Designerrezeptor R_{aq}. Die Stimulation von R_{aq} mit CNO resultierte in einer 2,1-fach erhöhten c-Fos-Promotoraktivität, verglichen mit der unstimulierten Kontrolle (Abbildung 22B).

Um den Einfluss von Δ CnA auf die c-Fos-Promotoraktivität nach Stimulation von R_{aq} durch CNO zu untersuchen wurden HEK293-Zellen mit drei verschiedenen Lentiviren infiziert. Diese codierten c-Fos.luc, R_{aq} sowie Δ CnA. Zur Kontrolle wurden die Zellen mit Viren infiziert, die mit dem Vektor pFUW produziert wurden. Die Expression von Δ CnA sorgte für eine signifikante Reduktion der c-Fos-Promotoraktivität auf 64 % des Kontrollwertes (Abbildung 22C) nach Stimulation des Designerrezeptors R_{aq} mit CNO.

Damit wurde gezeigt, dass die Expression von Δ CnA den c-Fos-Promotor nach Stimulation von R_{aq} mit CNO hemmt.

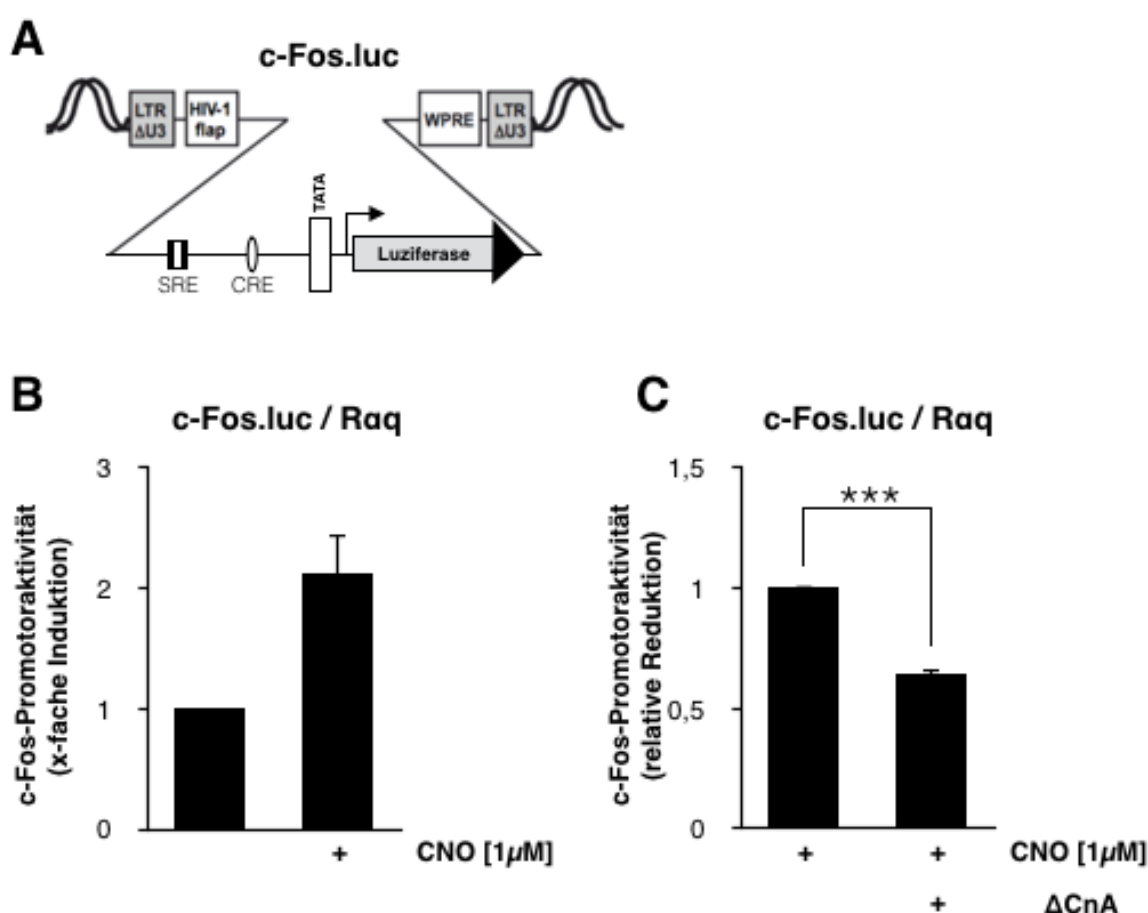


Abbildung 22: Die Expression von Δ CnA reduziert die c-Fos-Promotoraktivität nach Stimulation des Designerrezeptors R_{aq} mit CNO

A: Provirus, welcher für das c-Fos/Luziferase Reportergen codiert. **B:** HEK293-Zellen wurden mit Lentiviren infiziert, welche c-Fos.luc und R_{aq} codierten. Die infizierten Zellen wurden 24 h bei 37 °C unter Serumreduktion gehalten und danach für 24 h mit 1 μ M CNO stimuliert oder blieben unstimuliert. Gezeigt ist die errechnete Induktion der c-Fos-Promotoraktivität nach R_{aq}-Stimulation mit Standardabweichung bei n= 3. **C:** HEK293-Zellen wurden mit Lentiviren infiziert, welche für c-Fos.luc, R_{aq} sowie Δ CnA codierten. Die infizierten Zellen wurden 24 h bei 37 °C unter Serumreduktion gehalten und danach für 24 h mit 1 μ M CNO stimuliert oder blieben unstimuliert. Dargestellt ist die, durch Δ CnA bewirkte, relative Reduktion der c-Fos-Promotoraktivität nach R_{aq}-Stimulation mit Standardabweichung. Ein T-Test ergab eine statistische Relevanz mit p<0,001 (***), bei n= 3 (TS 1; DL 2).

4. Diskussion

4.1. Calcineurin - Struktur

Calcineurin ist eine Ca^{2+} /Calmodulin (CM) abhängige Serin/Threonin-Phosphatase. Das Holoenzym setzt sich aus zwei Untereinheiten (Calcineurin A (CnA) und Calcineurin B (CnB)) zusammen. CnA (MW 61 kDa) ist die katalytische Untereinheit und dephosphoryliert Proteine an Serin- und Threoninresten, wobei CnB als Ca^{2+} -bindende, regulatorische Untereinheit fungiert. CnB- und CM-Bindestellen sowie eine autoinhibitorische-Domäne (AI) befinden sich nahe am C-Terminus von CnA (Rusnak & Mertz, 2000). Bei der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Calcineurin-Mutante (ΔCnA) ist die CnB- und CM-Bindestelle sowie die AI-Domäne deletiert. Somit ist ΔCnA konstitutiv aktiv und bedarf keiner Regulation durch CnB oder CM (Rössler et al., 2008; Lesch et al., 2017, Langfermann et al., 2018, Lam et al., 2009; Tian et al., 1999). Die Expression eines ΔCnA -GFP-Fusionsproteins in HEK293-Zellen zeigte die Lokalisation im Zytosol (Lesch et al., 2017).

4.2. Methode

Um die Funktion von Proteinen zu untersuchen existieren grundsätzlich zwei Ansätze. Es gibt die Möglichkeit, die Expression oder Aktivität des zu untersuchenden Proteins zu hemmen („**loss-of-function**“). Dies kann durch genetische Manipulation oder pharmakologische Hemmung erfolgen. Aus dem resultierenden Phänotyp des untersuchten Organismus können Rückschlüsse zur physiologischen Funktion des Proteins geschlossen werden. Eine weitere Möglichkeit ist es, das zu untersuchende Protein in hohem Maße der Zelle zur Verfügung zu stellen („**gain-of-function**“). Dies geschieht durch eine erhöhte Expression nach Einbringen von DNA in Zellen. Die DNA codiert für zu untersuchende Proteine. Hierbei kann das Holoenzym, aber auch nur eine bestimmte Untereinheit oder konstitutiv aktive Variante des Proteins exprimiert werden. Aus dem daraus entstehenden Phänotyp können Schlüsse zur physiologischen Funktion des Proteins gezogen werden.

Eine Problem der „**loss-of-function**“-Ansätze ist, dass pharmakologische Calcineurin-Inhibitoren, wie CsA oder F506 oft an mehr als ein Substrat (Optimalfall nur Calcineurin) binden und somit mehrere Proteine beeinflusst werden. Es ist beschrieben, dass CsA und F506 inhibitorische Auswirkungen auf den ABC-Transporter p-Glykoprotein haben. Dies kann zur Akkommodierung potentiell toxischer Substanzen in der Zelle führen, was eine Verfälschung von Ergebnissen zur Folge haben kann (Anglicheau et al., 2006; Quezada et al., 2008). Des Weiteren werden CsA und F506 über das Cytochrom-P-450-System abgebaut (Mihatsch et al., 1989; Preissner et al., 2010). Eine starke Beanspruchung des Cytochrom-P-450-Systems kann zu dessen Inhibition und somit zur Akkommodierung toxischer Substanzen in der Zelle führen. Klinischen Studien zeigen, dass hohe Dosen an CsA Nebenwirkungen wie Nierenschäden, Leberschäden und arterielle Hypertonie

zur Folge haben (Mithasch et al., 1989). Obwohl molekulare Mechanismen hierfür nicht bekannt sind, ist von einer toxischen Wirkung auf verschiedene Zelltypen auszugehen.

Um die Problematik zu umgehen, wurde in der vorliegenden Arbeit ein „*gain of funktion*“-Ansatz gewählt, indem eine konstitutiv aktive Form von CnA (Δ CnA) exprimiert wurde. Ein solcher Ansatz wurde in anderen Studien bereits verwendet, hier aber in unterschiedlichen Modellsystemen (Lesch et al., 2017; Langfermann et al., 2018; Rössler et al., 2008).

4.3. Designerrezeptor

In vorangegangenen Studien wurden aktivitätsabhängige Wirkungen von CnA auf verschiedene Transkriptionsfaktoren untersucht. Als Stimuli wurden elektronische oder chemische Membrandepolarisation genutzt (Bito et al., 1996; Lam et al., 2009) oder pankreatische β -Zellen mit Glukose stimuliert (Duan & Cobb, 2010).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Auswirkung der Stimulation eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors (GPCR) vom Typ $G_{\alpha q}$ untersucht. Es existiert eine Vielzahl von GPCRs, bei denen unterschiedliche Liganden mehrere Rezeptoren aktivieren können, was es schwierig macht, einen Signaltransduktionsweg isoliert zu betrachten. Um dieses Problem zu umgehen, wurde ein $G_{\alpha q}$ -gekoppelter Designerrezeptor verwendet (R αq), welcher sich vom muscarinergen Acetylcholinrezeptor M3 der Ratte ableitet. Durch zwei Punktmutationen in der dritten und fünften Transmembrandomäne verlor der Rezeptor die Sensitivität gegenüber Acetylcholin, kann jedoch spezifisch durch die synthetische Substanz CNO aktiviert werden (Guettier et al., 2009). Da CNO inert gegenüber endogener Rezeptoren ist, kann eine unspezifische Aktivierung anderer Signalwege ausgeschlossen werden (Thiel et al., 2013; Wess et al., 2013).

Nach Stimulation von $G_{\alpha q}$ -gekoppelten Rezeptoren kommt es zur Aktivierung der Phospholipase C (PLC), die den *second messenger* IP_3 aus PIP_2 abspaltet. Dieser sorgt im Verlauf für eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration. Bei dem verwendeten Rezeptor wurde gezeigt, dass die Stimulation zu einer Aktivierung der MAP-Kinasen führt (Kaufmann et al., 2013). Denkbar ist auch, dass die erhöhte Ca^{2+} -Konzentration nach R αq -Stimulation zur Aktivierung von Calcineurin führen kann.

4.4. Modellgen: c-Fos

Das c-Fos-Gen ist ein gut charakterisiertes Modellsystem zur Untersuchung verschiedener Transkriptionsfaktoren. Das SRE, welches durch einen Komplex aus SRF und TCF (wie Elk-1) aktiviert wird, wurde im c-Fos-Promotor entdeckt und erstmals beschrieben (Treisman, 1985, 1986, 1987; Cahill et al., 1995). Verschiedene Stimulationswege, wie die Aktivierung spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanäle, GPCRs oder Rezeptor-Tyrosinkinasen nehmen unterschiedlichen Einfluss auf die SRE-vermittelte Transkription im c-Fos-Promotor (Gallin &

Greenberg, 1995; Treisman, 1992). Des Weiteren wurden viele Untersuchungen des CREB-responsiven CRE am c-Fos-Promotor durchgeführt (Cahill et al., 1995; Whitmarsh et al., 1995; Treisman et al., 1995; Price et al., 1996). Es existiert eine Vielzahl von Studien zur Regulation SRE- und CRE-vermittelter Transkription, die den c-Fos-Promotor betrachten (Cahill et al., 1995; Thiel & Rössler, 2014; Rubil et al., 2016; Langfermann et al., 2018), wobei in einer davon die Stimulation des Designerrezeptors Rqg verwendet wurde (Kaufmann et al., 2013).

4.4.1. Auswirkung von Δ CnA auf SRE

Wie bereits beschrieben, wurde das *serum response element* (SRE) durch Untersuchungen am c-Fos-Promotor entdeckt (Treisman 1985, 1986, 1987; Cahill et al., 1995). Es existieren viele SRE-enhaltende Promotoren (Cahill et al., 1995), welche durch einen Komplex aus SRF und TCF aktiviert werden (Hardingham et al., 1997). Der TCF Elk-1 spielt dabei eine wichtige Rolle und kann mitunter durch die MAP-Kinasen aktiviert werden (Marais et al., 1993; Whitmarsh et al., 1995; Xia et al., 1996). Die Kinase Erk phosphoryliert Elk-1 dabei an Serin-383, welches somit aktiv ist (Marais et al., 1993; Whitmarsh et al., 1995). Vorangegangene Studien zeigten, dass die Stimulation von Rqg eine Steigerung der SRE-vermittelten Transkription zur Folge hat (Kaufmann et al., 2013). In der vorliegenden Arbeit wurde nun die Auswirkung der konstitutiv aktiven Phosphatase Δ CnA auf die SRE-vermittelte Transkription nach Rqg-Stimulation untersucht. Hierzu wurden verschiedene Reportergene mit SRE-enhaltenden Promotoren exprimiert.

Es wurde gezeigt, dass die Δ CnA-Expression einen hemmenden Einfluss auf die SRE-vermittelte Transkription nach Rqg-Stimulation hat. Diese Hemmung ist abhängig vom TCF Elk-1, dessen Aktivität durch Δ CnA vermindert ist.

Die Ergebnisse stimmen mit Untersuchungen von Lam et al. (2009) überein. Lam et al. (2009) untersuchten hippocampale Neurone, wobei nach Stimulation durch KCl-Gabe die SRE-vermittelte Transkription quantifiziert wurde. Eine Kontrollgruppe wurde dabei mit Calcineurin-Inhibitor (CsA und F506)-behandelten Zellen verglichen. Lam et al. (2009) zeigten eine gesteigerte SRE-vermittelte Transkription bei der pharmakologischen Hemmung von Calcineurin. Passend dazu wurde eine erhöhte Egr-1-Promotoraktivität, welche SRE-abhängig ist, bei der pharmakologischen Hemmung von Calcineurin gezeigt (Lam et al., 2009). Somit wurde die gleiche Wirkung von Calcineurin auf die SRE-vermittelte Transkription in einem *gain-of-function*- und einem *loss-of-function*-Experiment gezeigt. Passend dazu wurde in einer Studie mit Neuroblastomzellen gezeigt, dass Δ CnA nach Aktivierung muscarinerger Acetylcholinrezeptoren einen hemmenden Einfluss auf die Egr-1-Expression hat (Rössler et al., 2008).

Zusammen mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit zeigt dies, dass die Calcineurin-Aktivität einen hemmenden Einfluss auf die SRE-vermittelte Transkription hat.

Da das SRE von einem Komplex aus SRF und TCF, wie Elk-1, aktiviert wird und die Elk-1-Aktivität nachweislich durch die Δ CnA-Expression vermindert ist, ist es naheliegend, dass eine verminderte Elk-1-Aktivität unter Δ CnA-Expression zur verminderten SRE-vermittelten Transkription führt.

Vorangegangene Studien zeigten, dass Elk-1 ein direktes Substrat von Calcineurin ist, indem die Elk-1-Aktivierungsstelle Serin-383 dephosphoryliert wird (Sugimoto et al., 1997; Tian et al., 1999). Als charakteristische Substratbindemotive für Calcineurin wurden „LxVP“ und „PxIxIT“ („x“ steht für eine beliebige Aminosäure) identifiziert (Park et al., 2000; Aramburu et al., 1998). Unter „x“ existieren Aminosäuren mit höherer Affinität als andere. Die höchste Bindeaffinität hat das Motiv „PVIVIT“, welches in NFAT konserviert vorliegt (Aramburu et al., 1998; Li et al., 2011). Manche beschriebene Calcineurin-Substrate, wie **Elk-1**, DARPP-32 und AKAP79, weisen keines der Motive auf, wofür es verschiedene Erklärungsansätze gibt (Sugimoto et al., 1997; Tian et al., 1999; Li et al., 2011). Zum einen gibt es die Möglichkeit der Existenz noch nicht beschriebener Bindemotive. Eine weitere Möglichkeit sind Adapterproteine, welche Calcineurin-Bindemotive enthalten, an Substrate binden und somit eine Brücke zwischen Substrat und Calcineurin bilden. Dies ist für AKAP79 beschrieben, wo ein Brückenprotein, welches das Calcineurin-Bindemotiv enthält als Adapter fungiert (Li et al., 2011).

Durch das Ausbleiben der Elk-1-Phosphorylierung kann es nicht zur Komplexbildung mit dem SRF kommen und die SRE-Aktivierung bleibt somit aus.

4.4.2. Auswirkungen von Δ CnA auf CRE

CREB response element (CRE) ist ein regulatorisches Element vieler Promotoren, welches auch im c-Fos-Promotor beschrieben ist (Cahill et al., 1995). Der Transkriptionsfaktor CREB wird von der cAMP abhängigen Proteinkinase A (PKA) aktiviert (Kida & Serita, 2014), kann jedoch auch über die Ca^{2+} -abhängige PKC (Xie et al., 1995) oder die MSK aktiviert werden (Wiggin et al., 2002). Dabei ist die Phosphorylierung an Serin-133 von besonderer Bedeutung (Gustavo et al., 1989; Kida & Serita, 2014). Ein dadurch entstehendes phospho-CREB-Dimer ist in der Lage, CRE zu binden und die Transkription zu initiieren (Chriviva et al., 1993). Es ist eine Vielzahl an Rezeptoren beschrieben, die CRE-vermittelte Transkription durch unterschiedliche Wege initiieren können (Rubil et al., 2015; Kaufmann et al., 2013; Gustavo et al., 1989). In der Literatur existieren zum Zusammenhang von Calcineurin-Aktivität und CRE-vermittelter Transkription sowie CREB-Aktivität widersprüchliche Daten (Duan et al., 2010; Bito et al., 1996; Kingsbury et al., 2007; Schwaninger et al., 1993). Eine vorangegangene Studie zeigte, dass die Stimulation von Rq in HEK293-Zellen zu einer Erhöhung der CRE-vermittelten Transkription führt (Kaufmann et al., 2013). In der vorliegenden Arbeit wurde die Auswirkung der konstitutiv aktiven Phosphatase Δ CnA auf die CRE-vermittelte Transkription nach Rq-Stimulation untersucht.

Es konnte gezeigt werden, dass die CRE-vermittelte Transkription sowie die CREB-Aktivität nach Rq-Stimulation bei der Expression von Δ CnA vermindert sind. Dies passt zu den Daten von Bito et al. (1996), wo nach aktivitätsabhängiger Hemmung von Calcineurin in hippocampalen Neuronen eine erhöhte CREB-Phosphorylierung nachgewiesen wurde (Bito et al., 1996). Diskutiert wurde hierzu, dass Calcineurin Ca^{2+} -abhängig aktiviert wird und eine inhibitorische Domäne der Protein-Phosphatase 1 (PP1) dephosphoryliert. In diesem Zustand ist PP1 aktiv und in der Lage Phospho-CREB zu dephosphorylieren (Bito et al., 1996). Demgegenüber existieren Studien, die einen

entgegengesetzten Effekt beschreiben. Lam et al. (2009) zeigten eine verminderte CRE-vermittelte Transkription bei pharmakologischer Blockade von Calcineurin in hippocampalen Neuronen (Lam et al., 2009). Andere Arbeiten zeigten nach pharmakologischer Hemmung von Calcineurin ebenfalls eine verminderte CRE-vermittelte Transkription sowohl in Nervenzellen als auch in pankreatischen Inselzellen (Kingsbury et al., 2007, Schwaninger et al., 1993).

Die Diskrepanz zur vorliegenden Arbeit kann unterschiedliche Gründe haben. In den Arbeiten wurden unterschiedliche Zellsysteme verwendet (HEK293-Zellen, Neuronen, pankreatische Inselzellen), wobei Signalwege unterschiedlicher Regulation unterliegen können. Die Blockade von Calcineurin kann außerdem pharmakologische Nebenwirkungen zur Folge haben, was Ergebnisse verfälschen kann. Um dies zu vermeiden, wurde in der vorliegenden Arbeit ein *gain-of-function*-Experiment gewählt. In den Arbeiten von Lam, Kingsbury und Schwaninger wurden Reportergene als Plasmid-DNA durch Transfektion in die Zellen eingebracht (Lam et al., 2009; Schwaninger et al., 1993; Kingsbury et al., 2007). In der vorliegenden Arbeit wurden Reportergene mittels lentiviralem Gentransfer in das Chromatin der Zellen integriert, wodurch eine höhere Effizienz, niedrigere Zelltoxizität und physiologischere Bedingungen geschaffen wurden (Keim et al., 2012). Der Vergleich mit der Literatur legt den Schluss nahe, dass die Calcineurin-Wirkung auf die CRE-vermittelte Transkription und CREB-Aktivität in verschiedenen Zellsystemen und unterschiedlichen Stimulationswegen individuell reguliert ist. Dies macht es schwierig, eine generelle Aussage zur Wirkung von Calcineurin auf die CRE-vermittelte Transkription zu treffen.

Eine Hypothese, die die in der vorliegenden Arbeit erzielten Resultate erklären kann, ist die Aktivierung von PP1 durch Calcineurin. CREB ist ein beschriebenes PP1-Substrat, wodurch es direkt dephosphoryliert werden kann (Bito et al., 1996). Denkbar ist auch die direkte Dephosphorylierung von CREB durch Calcineurin, was in der Literatur jedoch bisher nicht beschrieben ist. Kingsbury et al. (2007) untersuchten den Gehalt an phospho-CREB mit Phosphorylierung an Serin-133 mittels Wetsern-Blot. Dabei konnte keine Auswirkung auf die Serin-133-Phosphorylierung nach pharmakologischer Blockade von Calcineurin festgestellt werden (Kingsbury et al., 2007). CREB enthält, wie auch Elk-1, kein Calcineurin-Bindemotiv. Jedoch ist auch hier das Vorhandensein noch nicht identifizierter Motive oder auch die Vermittlung über Adapterproteine denkbar.

4.5. Auswirkungen von Δ CnA auf AP-1

Bei AP-1 handelt es sich um einen Transkriptionsfaktor, der sich als Homo- bzw. Heterodimer aus den bZip-Proteinen c-Jun, c-Fos und ATF zusammensetzt. Der in der vorliegenden Arbeit verwendete AP-1-Sensor Coll.luc weist eine hohe Spezifität für c-Jun/c-Fos Heterodimere auf und wurde bereits in diversen Studien zur Quantifizierung der AP-1-Aktivität verwendet (Chiu et al., 1988; Curran & Franza, 1988; Angel et al., 1987; Thiel & Rössler, 2014). Kaufmann und Mitarbeiter (2013) zeigten, dass die Stimulation von R α q eine gesteigerte AP-1-Aktivität zur Folge hat. Nun wurde der Einfluss von Δ CnA auf die AP-1-Aktivität nach R α q-Stimulation untersucht.

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die AP-1-Aktivität nach R α q-Stimulation bei der Expression von Δ CnA gehemmt wird. Passend dazu konnte gezeigt werden, dass sowohl die Promotoraktivität als auch das transkriptionelle Aktivierungspotential der AP-1-bildenden Faktoren c-Jun und c-Fos bei der Expression von Δ CnA gehemmt wurden.

Die erzielten Ergebnisse stimmen mit mehreren publizierten Studien überein. Rössler et al. (2008) untersuchten die AP-1-Aktivität in Neuroblastomzellen. Dabei wurden muscarinerge Acetylcholin-Rezeptoren durch Carbachol aktiviert, wodurch die AP-1-Aktivität anstieg. Es wurde gezeigt, dass die Expression von Δ CnA einen hemmenden Effekt auf die AP-1-Aktivität nach Carbachol-Stimulation hatte (Rössler et al., 2008). In einer weiteren Studie wurden TRPM3-Kanäle in HEK293-Zellen mit Pregnenolonsulfat stimuliert, wodurch die AP-1-Aktivität anstieg. Auch hier wurde gezeigt, dass die Expression von Δ CnA einen hemmenden Einfluss auf die AP-1-Aktivität hatte (Lesch et al., 2017). Ergänzend dazu zeigten Worton et al. (2014) eine gesteigerte Expression AP-1-bildender Faktoren nach mechanischer Stimulation von Osteozyten und pharmakologischer Blockade von Calcineurin (Worton et al., 2014).

Übereinstimmend mit der Literatur wurde in der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass die Calcineurin-Aktivität einen hemmenden Effekt auf die AP-1-Aktivität hat. Grund dafür könnte die verminderte c-Jun und c-Fos-Promotoraktivität bei der Expression von Δ CnA sein. Die verminderte c-Fos-Promotoraktivität könnte auf einer Hemmung der SRE- und CRE-vermittelten Transkription beruhen. Es ist denkbar, dass c-Jun und c-Fos ein direktes Calcineurin-Substrat sind oder auch die Kaskade der MAP-Kinasen durch die Expression von Δ CnA gehemmt wird. Der letzte Punkt wird im Folgenden weiter erläutert. Wie auch bei Elk-1 und CREB liegt sowohl bei c-Jun als auch bei c-Fos kein Calcineurin-Bindemotiv vor.

4.6. Direkte Auswirkung von Calcineurin auf die MAP-Kinasen

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimente zeigen, dass Calcineurin-Aktivität die CRE- und SRE-abhängige Transkription hemmt. Der verwendete Stimulationsweg über den Designerrezeptor R α q führt durch die Erhöhung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration zur Aktivierung der MAP-Kinasen. An deren Ende wird die Kinase *Erk* phosphoryliert. Phosphoryliertes Erk gelangt in den Zellkern und wirkt dort durch die Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren wie Elk-1, CREB, c-Jun oder c-Fos (Kaufmann et al., 2013, Alvarez-Curto et al., 2011). Ein denkbarer Mechanismus, der die gezeigten Ergebnisse erklären kann, ist die Beeinflussung des MAP-Kinase-Weges durch Δ CnA. Eine Studie an Astrozyten zeigte bereits, dass die pharmakologische Blockade von Calcineurin eine Erhöhung von phosphoryliertem-Erk zur Folge hat (Gabryel et al., 2006).

5. Literaturverzeichnis

- Al-Sarraj A, Day RM & Thiel G (2005). Specificity of transcriptional regulation by the zinc finger transcription factors Sp1, Sp3, and Egr-1. *J Cell Biochem*, 94: 153-67.

- Alvarez-Curto E, Prihandoko R, Tautermann CS, Zwier JM, Padiani JD, Lohse MJ, Hoffmann C, Tobin AB & Milligan G (2011). Developing Chemical Genetic Approaches to Explore G Protein-Coupled Receptor Function: Validation of the Use of a Receptor Activated Solely by Synthetic Ligand (RASSL). *Mol Pharmacol*, 80: 1033-1046.

- Angel P, Baumann I, Stein B, Delius H, Rahmsdorf HJ & Herrlich P (1987). 12-Otetradecanoyl-phorbol-13-acetate induction of the human collagenase gene is mediated by an inducible enhancer located in the 5' flanking region. *Mol Cell Biol*, 7: 2256-66.

- Anglicheau D, Pallet N, Rabant M, Marquet P, Cassinat B, Méria P, Beaune P, Legendre C & Thervet E (2006). Role of P-glycoprotein in cyclosporine cytotoxicity in the cyclosporine-sirolimus interaction. *Kidney International*, 70: 1019-1025.

- Aramburu J, Garcia-Cózar F, Raghavan A, Okamura H, Rao A & Hogan PG (1998). Selective inhibition of NFAT activation by a peptide spanning the calcineurin targeting site of NFAT. *Mol Cell*, 5: 627-637.

- Bito H, Deisseroth K & Tsien RW (1996). CREB Phosphorylation and Dephosphorylation: A Ca²⁺- and Stimulus Duration-Dependent Switch for Hippocampal Gene Expression. *Cell*, 87: 1203-1214.

- Cahill MA, Janknecht R & Nordheim A (1995). Signal uptake by the c-fos serum response element. *Inducible Gene Expression*, 2: 39-72.

- Chiu R, Boyle WJ, Meek J, Smeal T, Hunter T & Karin M (1988). The c-fos protein interacts with c-jun/AP-1 to stimulate transcription of AP-1 responsive genes. *Cell*, 54: 541-552.

- Chrivia JC, Kwok RP, Lamb N, Hagiwara M, Montminy MR & Goodman RH (1993). Phosphorylated CREB binds specifically to the nuclear protein CBP. *Nature*, 365: 855-859.

- Ciarcia R, Vitiello MT, Galdiero M, Pacilio C, Iovane V, d'Angelo D, Pagnini D, Caparrotti G, Conti D, Tomei V, Florio S & Giordano A (2012). Imatinib Treatment Inhibit IL-6, IL-8, NF-KB and AP-1 Production and Modulate Intracellular Calcium in CML Patients. *J Cell Physiol*, 227: 2798-2803.

- Cooper DM (2003). Regulation and organization of adenylyl cyclases and cAMP. *Biochem J*, 375: 517-529.

- Curran T & Franza BR (1988). Fos and jun: The AP-1 connection. *Cell*, 55: 395-397.

- Davé V, Childs T, Xu Y, Ikegami M, Besnard V, Maeda Y, Wert SE, Neilson JR, Crabtree GR & Whitsett JA (2006). Calcineurin/Nfat signaling is required for perinatal lung maturation and function. *J Clin Invest*, 116: 2597-2609.

- Duan L & Cobb MH (2010). Calcineurin increases glucose activation of ERK1/2 by reversing negative feedback. *Proc Natl Acad Sci USA*, 107: 22314-19.

- Emmel EA, Verweij CL, Durand DB, Higgins KM, Lacy E, & Crabtree GR (1989). Cyclosporin A specifically inhibits function of nuclear proteins involved in T cell activation. *Science*, 246: 1617-1620.

- Fukami K (2002). Structure, regulation, and function of phospholipase C isozymes. *J Biochem*, 131: 293-299.

- Gabryel B, Pudielko A, Adamczyk J, Fischer I & Malecki A (2006). Calcineurin and Erk1/2-signaling pathways are involved in the antiapoptotic effect of cyclosporin A on astrocytes exposed to simulated ischemia in vitro. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 374: 127-139.

- Gallin WJ & Greenberg ME (1995). Calcium regulation of gene expression in neurons: the mode of entry matters. *Curr Opin Neurobiol*, 5: 367-374.

- Gilman AG (1995). G proteins and regulation of adenylyl cyclase. *Biosci Rep*, 15: 65–97.
- Gomperts BD, Kramer IM & Tatham PER (2009). *Signal Transduction*, 2. Auflage. Academic Press.
- Guettier JM, Gautam D, Scarselli M, Ruiz de Azua I, Li JH, Rosemond E, Ma X, Gonzalez FJ, Armbruster BN, Lu H, Roth BL & Wess J (2009). A chemical-genetic approach to study G protein regulation of β cell function in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*, 106: 19197-19202.
- Gustavo AG & Montminy MFT (1989). Cyclic AMP Stimulates Somatostatin Gene Transcription by Phosphorylation of CREB at Serine 133. *Cell*, 59: 675-680.
- Hahm SH, Chen Y, Vinson C & Eiden LE (2003). A calciuminitiated signaling pathway propagated through calcineurin and cAMP response element-binding protein activates proenkephalin gene transcription after depolarization. *Mol Pharmacol*, 64: 1503-1511.
- Hancock J (2010). *Cell Signalling 3rd. Auflage*. Oxford Universtiy Press.
- Hardingham GE, Chawla S, Johnson CM & Bading H (1997). Distinct functions of nuclear and cytoplasmic calcium in the control of gene expression. *Nature*, 16: 260-265.
- Heit JJ, Apelqvist ÅA, Gu X, Winslow MM, Neilson JR, Crabtree GR & Kim SK (2006). Calcineurin/NFAT signalling regulates pancreatic β -cell growth and function. *Nature*, 443: 345-349.
- Hermans E (2003). Biochemical and pharmacological control of the multiplicity of coupling at G-protein-coupled receptors. *Pharmacol Ther*, 99: 25-44.
- Hoefflich KP, Ikura M (2002). Calmodulin in action: diversity in target recognition and activation mechanisms. *Cell*, 108: 739-742.

- Müller I (2011). Regulation der Genexpression in Insulinoma-Zellen und β -Zellen des Pankreas. *Dissertation, Universität des Saarlandes*.
- Kaufmann A, Keim A & Thiel G (2013). Regulation of Immediate-Early Gene Transcription Following Activation of Gq-Coupled Designer Receptors. *J Cell Biochem*, 114: 681-696.
- Keim A, Müller I & Thiel G (2012). Efficient genetic manipulation of 1321N1 astrocytoma cells using lentiviral gene transfer. *J Neurosci Meth*, 206: 138-142.
- Kida S & Serita T (2014). Functional roles of CREB as a positive regulator in the formation and enhancement of memory. *Brain Research Bulletin*, 105: 17-24.
- Kingsbury TJ, Bambrick LL, Roby CD & Krueger BK (2007). Calcineurin activity is required for depolarization-induced, CREB-dependent gene transcription in cortical neurons. *J Neurochem*, 103: 761-770.
- Kobilka B (2013). The structural basis of G-protein-coupled receptor signaling. *Angew Chem Int Ed Engl*, 52: 6380-6388.
- Krauss G (2008). *Biochemistry of Signal Transduction and Regulation*, 4. Auflage. Wiley-VCH.
- Lagerström MC & Schiöth HB (2008). Structural diversity of G protein-coupled receptors and significance for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov*, 7: 339-357.
- Lam BYH, Zhang W, Enticknap N, Haggis E, Cader MZ & Chawla S (2009). Inverse Regulation of Plasticity-related Immediate Early Genes by Calcineurin in Hippocampal Neurons. *J Biol Chem*, 284: 12562-12571.
- Langfermann DS, Roessler OG & Thiel G (2018). Stimulation of B-Raf increases c-Jun and c-Fos expression and upregulates AP-1 -regulated gene transcription in insulinoma cells. *Mol Cell Endocrinol*, in press.

- Lefkowitz RJ (2013). A brief history of G-protein coupled receptors. *Angew Chem Int Ed Engl*, 52: 6366-6378.
- Lesch A, Rössler OG & Thiel G (2017). Extracellular Signal-Regulated Protein Kinase, c-Jun N-Terminal Protein Kinase, and Calcineurin Regulate Transient Receptor Potential M3 (TRPM3) Induced Activation of AP-1. *J Cell Biochem*, 118: 2409-2419.
- Li QJ, Vaingankar S, Green HM & Martins-Green M (1999). Activation of the 9E3/cCAF chemokine by phorbol esters occur via multiple signal transduction pathways that converge to MEK1/ERK2 and activate Elk1 transcription factor. *J Biol Chem*, 274: 15454-15465.
- Li H, Rao A & Hogan PG (2011): Interaction of calcineurin with substrates and targeting proteins. *Trends Cell Biol*, 21: 91-103.
- Löffler & Petrides: Biochemie und Pathobiochemie, 9. Auflage (2015)
- Lois C, Hong EJ, Pease S, Brown EJ & Baltimore D (2002). Germline transmission and tissue-specific expression of transgenes delivered by lentiviral vectors. *Science*, 295: 868-872.
- Luthman H & Magnusson G (1983). High efficiency polyoma DNA transfection of chloroquine treated cells. *Nucleic Acids Res*, 11: 1295-1308.
- Marais R, Wynne J & Treisman R (1993). The SRF Accessory Protein Elk-1 Contains a Growth Factor-Regulated Transcriptional Activation Domain. *Cell*, 73: 391-393.
- Mattila PS, Ullman KS, Fiering S, Emmel EA, McCutcheon M, Crabtree GR & Herzenberg LA. (1990). The actions of cyclosporin A and FK506 suggest a novel step in the activation of T lymphocytes. *EMBO J*, 13: 4425-4433.
- Mellor H & Parker PJ (1998). The extended protein kinase C superfamily. *Biochem J*, 332: 281-292.

- Mihatsch MJ, Thiel G & Ryffel B (1989). Cyclosporin A: action and site-effects. *Toxicology letters*, 46: 125-139.
- Müller I (2011). Regulation der Genexpression in Insulinoma-Zellen und β -Zellen des Pankreas. *Dissertation an der medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes*.
- Park S, Uesugi M & Verdine GL (2000). A second calcineurin binding site on the NFAT regulatory domain. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97: 7130-7135.
- Pear WS, Nolan GP, Scott ML & Baltimore D (1993). Production of High-Titer Helper- Free Retroviruses by Transient Transfection. *Proc Natl Acad Sci*, 90: 8392-8396.
- Preissner S, Kroll K, Dunkel M, Senger C, Goldsobel G, Kuzman D, Guenther S, Winnenburg R, Schroeder M & Preissner R (2010). SuperCYP: a comprehensive database on Cytochrome P450 enzymes including a tool for analysis of CYP-drug interactions. *Nucleic Acids Res*, 38: 37-43.
- Price MA, Cruzalegui FH & Treisman R (1996). The p38 and ERK MAP kinase pathways cooperate to activate ternary complex factors and c-fos transcription in response to UV light. *EMBO J*, 15: 6552-6563.
- Quezada CA, Garrido WX, Gonzalez-Oyarzun MA, Rauch MC, Salas MR, San Martin RE, Claude AA, Yanez AJ, Slebe JC & Carcamo JG (2008). Effect of tacrolimus on activity and expression of P-glycoprotein and ATP-binding cassette transporter A5 (ABCA5) proteins in hematoencephalic barrier cells. *Biol Pharm Bull*, 31: 1911-1916.
- Rössler OG & Thiel G (2009). Thrombin induces Egr-1 expression in fibroblasts involving elevation of the intracellular Ca^{2+} concentration, phosphorylation of ERK and activation of ternary complex factor. *BMC Mol Biol*, 10: 40.
- Rössler OG, Henß I, Thiel G (2008). Transcriptional response to muscarinic acetylcholine receptor stimulation: regulation of Egr-1 biosynthesis by ERK, Elk-1, MKP-1, and calcineurin in carbachol-stimulated human neuroblastoma cells. *Arch Biochem Biophys*, 470: 93-102.

- Rubil S, Lesch A, Mukaida N & Thiel G (2018). Stimulation of transient receptor potential M3 (TRPM3) channels increases Interleukin-8 Promotor activity involving AP-1 and extracullular signal-regulated Protein kinase. *Cytokine*, 103: 133-141.
- Rusnak F & Mertz P (2000). Calcineurin: Form and Function. *Physiol Rev*, 80: 1483-1521.
- Schwaninger M, Blume R, Oetjen E, Lux G & Willhart (1993). Inhibition of CAMP responsive Element-mediated Gene Transcription by Cyclosporin A and FK506 after Membrane Depolarization. *J Biol Chem*, 31: 23111-23115.
- Shaw PE & Saxton J (2003). Ternary complex factors, prime targets for mitogen-activated protein kinases. *Int J Biochem Cell Biol*, 35: 1210-1226.
- Stefano L, Rössler OG, Griesemer D, Hoth M & Thiel G (2007). P2X(7) receptor stimulation upregulates Egr-1 biosynthesis involving a cytosolic Ca(2+) rise, transactivation of the EGF receptor and phosphorylation of ERK and Elk-1. *J Cell Physiol*, 213: 36-44.
- Sugimoto T, Stewart S & Guan KL (1997). The Calcium/Calmodulin dependent Protein Phosphatase Calcineurin Is the Major Elk-1 Phosphatase. *J Biol Chem*, 47: 29415-29418.
- Sukhatme VP, Cao X, Chang L, Tsai-Morris CH, Stamenkovich D, Ferreira P, Cohen D, Edwards S, Shows T, Curran T, Le-Beau M & Adamson ED (1988). A zinc finger encoding gene coregulated with c-fos during growth and differentiation. *Cell*, 53: 37-43.
- Thiel G, Al Sarraj J, Vinson C, Stefano L & Bach K (2005). Role of basic region leucine zipper transcription factors cyclic AMP response element binding protein (CREB), CREB2, activating transcription factor 2 and CAAT/enhancer binding protein alpha in cyclic AMP response element-mediated transcription. *J Neurochem*, 92: 321-336.
- Thiel G & Rössler OG (2014). Resveratrol Stimulates AP-1-Regulated Gene Transcription. *Mol Nutr Food Res*, 58: 1402-1413.

- Thiel G & Rössler OG (2011). Immediate-Early Transcriptional Response to Angiotensin II in Human Adrenocortical Cells. *Endocrinology*, 152: 4211-4223.
- Thiel G, Kaufmann A & Rössler OG (2013). G-protein-coupled designer receptors – new chemical-genetic tools for signal transduction research. *Biol Chem*, 394: 1615-1622.
- Tian J & Karin M (1999). Stimulation of Elk1 transcriptional activity by mitogenactivated protein kinases is negatively regulated by protein phosphatase 2B (calcineurin). *J Biol Chem*, 274: 15173-80.
- Treisman R (1985). Transient accumulation of c-fos RNA following serum stimulation requires a conserved 5' element and c-fos 3' sequences. *Cell*, 42: 889-902.
- Treisman R (1986). Identification of a protein-binding site that mediates transcription response of the c-fos gene to serum factors. *Cell*, 46: 567-574.
- Treisman R (1987). Identification and purification of a polypeptide that binds the c-fos serum response element. *EMBO J*, 6: 2711-2717.
- Treisman R, McKnight SL & Yamamoto KR (1992). Structure and function of serum response factor. In: Transcriptional Regulation. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*.
- Treisman R (1995). Journey to the surface of the cell: the SRE and c-fos regulation. *EMBO J*, 14: 4905-4913.
- Wess J, Nakajima K & Jain S (2013). Novel designer receptors to probe GPCR signaling and physiology. *Trends Pharmacol Sci*, 34: 385-392.
- Whitmarsh AJ, Shore P, Sharrocks AD, Davis RJ (1995). Integration of MAP Kinase Signal Transduction Pathways at the Serum Response Element. *Science*, 269: 403-406.

- Wiggin GR, Soloaga A, Foster JM, Murray-Tait V, Cohen P & Arthur JSC (2002). MSK1 and MSK2 Are Required for the Mitogen- and Stress-Induced Phosphorylation of CREB and ATF1 in Fibroblasts. *Mol Cell Biol*, 22: 2871-2881.
- Worton LE, Kwon RY, Gardiner EM, Gross TS & Srinivasan S (2014). Enhancement of flow-induced AP-1 gene expression by cyclosporin A requires NFAT-independent signaling in bone cells. *Cell Mol Bioeng*, 7: 254-265.
- Wortzel I & Seger R (2011). The ERK Cascade: Distinct Functions within Various Subcellular Organelles. *Genes Cancer*, 2: 195–209.
- Xia Z, Dudek H, Miranti CK & Greenberg ME (1996). Calcium Influx via the NMDA Receptor Induces Immediate Early Gene Transcription by a MAP Kinase/ERK-Dependent Mechanism. *J Neurosci*, 16: 5425–5436.
- Xie H & Rothstein TL (1995). Protein kinase C mediates activation of nuclear cAMP response element-binding protein (CREB) in B lymphocytes stimulated through surface Ig. *J Immunol*, 154: 1717-1723.

6. Publikationen

- Tobias Schmidt, Daniel S. Langfermann, Oliver G. Rössler, Gerald Thiel: Calcineurin controls gene transcription following stimulation of Gαq-coupled designer receptors. Manuskript in Vorbereitung.