

# Identifizierung und biochemische Charakterisierung neuer Calcineurin-Inhibitoren

## Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium

vorgelegt der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät der  
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

**Frank Erdmann**

geb. 30.08.1971 in Merseburg

Halle/Saale, November 2002

1. Gutachter: Herr Prof. G. Fischer (MPG FS für Enzymologie der Proteinfaltung Halle)
2. Gutachter: Frau Prof. S. Grabley (Hans-Knöll-Institut für Naturstoff-Forschung Jena)
3. Gutachter: Herr Prof. R. Wetzker (Friedrich-Schiller-Universität Jena)

Datum der Verteidigung: 26.02.2003

**urn:nbn:de:gbv:3-000004794**

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000004794>]

# Inhaltsverzeichnis

## Abkürzungsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Phosphorylierung von Proteinen	1
1.2	Unterteilung der Proteinphosphatasen	3
1.3	Calcineurin als Proteinphosphatase	4
1.3.1	Vorkommen von Calcineurin	4
1.3.2	Eigenschaften von Calcineurin	5
1.3.3	Calcineurin-Inhibitoren	7
1.3.4	Physiologische Bedeutung von Calcineurin	13
1.3.4.1	Rolle von Calcineurin in Nervenzellen	14
1.3.4.2	Funktion von Calcineurin im Myocard	15
1.3.4.3	Funktion von Calcineurin in Zellen der Skelettmuskulatur	16
1.3.4.4	Aufgaben von Calcineurin in Zellen des Immunsystems	16
1.3.5	Rolle von Calcineurin in intrazellulären Signalprozessen	17
1.3.5.1	Der NFAT-Signalweg	17
1.3.5.2	Der NF $\kappa$ B-Signalweg	20
1.3.5.3	Der AP-1-Signalweg	23
1.3.5.4	Der MAP-Kinase-Signalweg	25
1.3.5.5	Regulation des Immunstatus	31
<b>2</b>	<b>Zielstellung der Arbeit</b>	<b>32</b>
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>33</b>
3.1	Material	33
3.1.1	Laborchemikalien	33
3.1.2	Radiochemikalien	34
3.1.3	Calcineurin-Inhibitoren	34
3.1.3.1	Gossypol und -Derivate	34
3.1.3.2	Cyclosporin und -Derivate	34
3.1.4	Enzyme und Substrate	34
3.1.5	Antikörper	35
3.1.6	Standards	35
3.1.7	Plasmide und Oligonukleotide	36
3.1.7.1	Plasmide	36
3.1.7.2	Oligonukleotide	36
3.1.7.2.1	DNA-Sequenzen für PCR	36
3.1.7.2.2	DNA-Sequenzen für EMSA	36
3.1.8	Bakterienstämme	37
3.1.9	Medien für Kultivierung von <i>Escherichia coli</i>	37
3.1.10	Biologisches Material und Zellkultur	37
3.1.10.1	Primärzellen	37
3.1.10.2	Chemikalien/Medien für Zellkultur	37
3.1.11	Kits	38
3.2	Methoden	38
3.2.1	Enzymkinetische und Proteinchemische Methoden	38
3.2.1.1	Reinigung von Calcineurin	38
3.2.1.2	SDS-Gelelektrophorese	38
3.2.1.3	Coomassie-Färbung	39
3.2.1.4	Proteinbestimmung nach BRADFORD	39
3.2.1.5	Proteinbestimmung über Extinktionskoeffizienten	40
3.2.1.6	Western Blot	40

3.2.1.7	Messung der PPlase-Aktivität .....	41
3.2.1.8	Präparation des RII-Phosphopeptids .....	42
3.2.1.9	Phosphatase-Aktivitätsmessung mit pNPP-Substrat.....	43
3.2.1.10	Phosphatase-Aktivitätsmessung mit Peptid-Substrat.....	44
3.2.1.11	Präparation der radioaktiv markierten Phosphoproteine .....	44
3.2.1.12	Phosphatase-Aktivitätsmessung gegenüber Protein-Substrat.....	45
3.2.1.13	Bestimmung der Luciferase-Aktivität .....	45
3.2.1.14	Bestimmung der $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität.....	45
3.2.1.15	Kopräzipitation von Calcineurin durch CsA und [DAT-Sar] <sup>3</sup> CsA.....	46
3.2.1.16	Simultane Inhibition von Calcineurin durch mehrere Inhibitoren .....	46
3.2.1.17	Reversibilität der Calcineurin-Inhibition.....	48
3.2.1.18	Kompetition von [DAT-Sar] <sup>3</sup> CsA durch Cyclophilin .....	48
3.2.1.19	Kompetition von Calcineurin durch Gossypol .....	49
3.2.2	Molekularbiologische Methoden.....	49
3.2.2.1	Herstellung chemisch-kompetenter <i>E. coli</i> .....	49
3.2.2.2	Transformation von <i>E. coli</i> .....	50
3.2.2.3	Maxipräparation von Plasmiden.....	50
3.2.2.4	Quantifizierung von Nukleinsäuren .....	50
3.2.2.5	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	50
3.2.2.6	Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen .....	51
3.2.2.7	Ligation von DNA-Fragmenten in Vektor-DNA .....	52
3.2.2.8	Radioaktive Markierung von Oligonukleotiden .....	52
3.2.2.9	Agarose-Gelelektrophorese .....	53
3.2.2.10	Minipräparation von Plasmiden.....	53
3.2.2.10.1	Plasmid-Minipräparation mittels Qiagen-Kit.....	53
3.2.2.10.2	Alkalische Lyse.....	53
3.2.2.11	Kultivierung und Lagerung von <i>E. coli</i> .....	54
3.2.3	Zellbiologische Methoden.....	54
3.2.3.1	Gelshift-Assay (EMSA) .....	54
3.2.3.2	Herstellung zytosolischer Extrakte .....	55
3.2.3.3	Herstellung von Kernextrakten .....	55
3.2.3.4	MTT-Zytotoxizitätstest.....	56
3.2.3.5	Isolierung von PBMC aus Blut .....	57
3.2.3.6	Isolierung von T-Zellen aus PBMC .....	57
3.2.3.7	Kultivierung von PBMC bzw. T-Zellen .....	58
3.2.3.8	Bestimmung des Aktivierungsgrades von MAP-Kinasen .....	58
3.2.3.9	Nonvirale Transfektion von primären T-Zellen.....	58
4	<b>Ergebnisse</b> .....	59
4.1	Calcineurin-Inhibition durch Gossypol.....	59
4.1.1	Inhibition von Calcineurin durch Gossypol und -Derivate.....	60
4.1.2	Reversibilität der Calcineurin-Inhibition durch Gossypol .....	64
4.1.3	Einfluß von Zusätzen auf die Inhibition des Calcineurins .....	66
4.1.4	Identifizierung der Gossypol-Bindungsstelle am Calcineurin .....	67
4.1.5	Spezifität der Calcineurin-Inhibition durch Gossypol .....	70
4.1.5.1	Inhibition von Proteinphosphatasen.....	70
4.1.5.2	Inhibition von PPlasen.....	71
4.1.6	Inhibition von Calcineurin durch Gossypol <i>in vivo</i> .....	72
4.1.6.1	Inhibition der NFAT-Translokation in den Zellkern .....	72
4.1.6.2	Inhibition der NFAT-Reportergen-Aktivität durch Gossypol .....	74
4.1.6.3	Veränderungen im NFAT-Gelshift durch Gossypol .....	75
4.2	CaN-Inhibition durch Cyclosporin-Derivate .....	76
4.2.1	Inhibition der PPlase-Aktivität durch Cyclosporine.....	78
4.2.2	Calcineurin-Inhibition durch Cyclosporine <i>in vitro</i> .....	79

4.2.3	Spezifität der Calcineurin-Inhibition durch [DAT-Sar] <sup>3</sup> CsA.....	83
4.2.4	Lokalisation der [DAT-Sar] <sup>3</sup> CsA-Bindungsstelle am Calcineurin .....	84
4.2.5	Calcineurin-Inhibition durch Cyclosporine <i>in vivo</i> .....	86
4.2.5.1	Einfluß der Cyclosporine auf NFAT-Reporter-Gen-Aktivität .....	86
4.2.5.2	Veränderungen im NFAT-Gelshift durch Cyclosporine .....	88
4.2.5.3	Einfluß der Cyclosporine auf NFκB-Reporter-Gen-Aktivität.....	90
4.2.5.4	Veränderungen im NFκB-Gelshift durch Cyclosporine .....	92
4.2.5.5	Einfluß der Cyclosporine auf AP-1-Reporter-Gen-Aktivität .....	95
4.2.5.6	Veränderungen im AP-1-Gelshift durch Cyclosporine.....	96
4.2.6	Einfluß der Cyclosporine auf MAPK-Signalwege .....	99
5	<b>Diskussion</b> .....	105
5.1	Gossypol inhibiert Calcineurin <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> .....	105
5.2	[DAT-Sar] <sup>3</sup> CsA inhibiert CaN <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> .....	111
6	<b>Zusammenfassung</b> .....	123
7	<b>Anhang</b> .....	125
	Literatur .....	125
	Danksagung.....	153
	Selbständigkeitserklärung .....	154

## Abkürzungsverzeichnis

% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Masseprozent
(±)	racemisch
α	Hemmfaktor
Ab	Antikörper
[Ac-MeBmt] <sup>1</sup> CsH	[O-Acetyl-(4R)-4-[(E)-2-butenyl]-4-Methyl-(L)-Thr] <sup>1</sup> CsH
ADP	Adenosindiphosphat
[AD-Ser] <sup>8</sup> CsA	[2-Amino-3-[(5-amino-pentylcarbamoyl)-methoxy]-propionyl-Ser] <sup>8</sup> CsA
AKAP	<i>A-kinase-anchoring protein</i>
AP-1	Aktivierendes Protein 1
ARRE	<i>Distal antigen receptor response element</i>
ATF2	Aktivierender Transkriptionsfaktor 2
ATP	Adenosintriphosphat
bcl-2	B-Zell-Leukämie-Onkogen 2
Bcl-x <sub>L</sub>	B-Zell-Leukämie-Onkogen x <sub>L</sub>
bidest.	2fach destilliert
BSA	bovines Serumalbumin
C3	Komplement-Faktor 3
CaMK	Ca <sup>2+</sup> /Calmodulin-abhängige Kinase
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CaN	Calcineurin
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
cdk2	<i>Cell division protein kinase 2</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CK1	Casein-Kinase 1
CK2	Casein-Kinase 2
cNMP	zyklisches Nukleotidmonophosphat
CRE	<i>cAMP response element</i>
CsA	Cyclosporin A
CsB	Cyclosporin B
CsC	Cyclosporin C
CsD	Cyclosporin D
CsG	Cyclosporin G
CsH	Cyclosporin H
Cyp	Cyclophilin

## Abkürzungsverzeichnis

---

DAG	Diacylglycerol
[DAT-Sar] <sup>3</sup> CsA	[(R) $\alpha$ -N, N-Dimethylaminoethylthiosarcosin] <sup>3</sup> CsA methansulfonat
DBD	DNA-bindende Domäne
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphate
ds	doppelsträngig
DTT	Dithiothreitol
E	Enzym
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykol-bis-(2-aminoethyl)-tetraessigsäure
Elk1	<i>Ets domain protein</i>
EMSA	elektrophoretischer Mobilitätsshift-Assay
ER	endoplasmatisches Retikulum
ERK	<i>Extracellular signal-regulated protein kinase</i>
F <sub>c</sub>	<i>Fragment crystallizable</i> , Teil des Antikörper-Moleküls
FK506	Tacrolimus
FKBP	FK506-bindendes Protein
FMLP	Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin
FRK	c-fos-regulierende Kinase
G-CSF	Granulozyten-koloniestimulierender Faktor
GDP	Guanosindiphosphat
GPCR	G-Protein-gekoppelten Rezeptoren
GSK3	Glykogen-Synthase-Kinase 3
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure
HIV-1	humaner Immundefizienz-Virus Typ1
HUGO	<i>Human genome project</i>
HWZ	Halbwertszeit
I	Inhibitor
IC <sub>50</sub>	Konzentration, bei der 50 % einer Aktivität inhibiert sind
I $\kappa$ B	NF $\kappa$ B-Inhibitor
IFN	Interferon
IGF-1	<i>Insulin-like growth factor 1</i>

## Abkürzungsverzeichnis

---

IgG	Immunglobulin G
IKK	I $\kappa$ B-Kinase
IL	Interleukin
IP3	Inositol-1,4,5-trisphosphat
JNK	c-jun-N-terminale-Kinase
K	Kelvin
kDa	Kilodalton
k.I.	keine Inhibition
K <sub>i</sub>	Inhibitionskonstante
K <sub>m</sub>	Michaelis-Menten-Konstante
l	Liter
LDH	Laktatdehydrogenase
LTR	<i>Long terminal repeat</i>
M	Molar
MAPK	Mitogen-aktivierte-Proteinkinase
MAPKAP-Kinase	Mitogen-aktivierte-Proteinkinase-aktivierte Proteinkinase
MAP-Kinase	mitogen-aktivierte Proteinkinase
MBP	<i>Myelin basic protein</i>
MEF	<i>Myocyte enhancer factor</i>
MEK	Mitogen-aktivierte-ERK-Kinase (=MKK)
MEKK	<i>Mitogen-activated protein Kinase/ERK kinase kinase</i>
MEKKK	Mitogen-aktivierte-ERK-Kinase-Kinase (=MKKK)
MHC	<i>Major-histocompatibility complex</i>
min	Minute
MKK	Mitogen-aktivierte-Proteinkinase-Kinase (=MEK)
MKKK	Mitogen-aktivierte-Proteinkinase-Kinase-Kinase (=MEKK)
MLK3	<i>Mixed lineage kinase 3</i>
MTT	3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromid
NF $\kappa$ B	nukleärer Faktor, der an <i>enhancer</i> des Immunglobulins $\kappa$ bindet
NFAT	nukleärer Faktor aktivierter T-Zellen
NHR	NFAT-Homologie Region
NHS	N-Hydroxysuccinimid
NMDA	<i>N-Methyl-D-Aspartat</i>
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
NP-40	Nonidet P-40
[Ac-MeBmt] <sup>1</sup> CsH	[O-Acetyl-(4R)-4-[(E)-2-butenyl]-4-Methyl-(L)-Threonin] <sup>1</sup> CsH
OD	optische Dichte

## Abkürzungsverzeichnis

---

oNPG	ortho-Nitrophenyl- $\beta$ -galaktopyranosid
p.a.	<i>pro analysi</i>
Par	Parvulin
PBMC	periphere mononukleäre Zellen des Blutes
PBS	phosphatgepufferte isotone Kochsalzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
pH	negative $\log[H^+]$
P <sub>i</sub>	anorganisches Phosphat
PI3K	Phosphoinositol-3-Kinase
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PLC $\gamma$	Phospholipase C $\gamma$
PMA	Phorbol-12-myristyl-13-azetat
pNPP	para-Nitrophenylphosphat
PP1	Proteinphosphatase vom Typ 1
PP2A	Proteinphosphatase vom Typ 2A
PP2B	Proteinphosphatase vom Typ 2B
PP2C	Proteinphosphatase vom Typ 2C
PPIase	Peptidyl-Prolyl- <i>cis/trans</i> -Isomerase
pS	Phospho-Serin
pT	Phospho-Threonin
pY	Phospho-Tyrosin
RII	RII-Untereinheit der bovinen PKA
RA	Restaktivität
RLU	relative Lumineszenz-Einheiten
RNase	Ribonuclease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RSK	ribosomale S6-Kinase
RT	Raumtemperatur
RyR	Ryanodin-Rezeptor
S	Substrat
s	Sekunde
SAPK	Stress-aktivierte Proteinkinase
SD	Standardabweichung
SR	sarkoplasmatisches Retikulum
SRE	<i>Serum response element</i>
SV40	<i>Simian virus 40</i>



## Abkürzungsverzeichnis

---

TAD	Transaktivierungsdomäne
TAE	Tris/Azetat/EDTA-Puffer
TBE	Tris/Borat/EDTA-Puffer
TCA	Trichloressigsäure
TCEP	Tris-(2-carboxyethyl)-phosphin-hydrochlorid
TCR	T-Zell-Rezeptor
TGF $\beta$	<i>Transforming growth factor <math>\beta</math></i>
TNF	Tumornekrosefaktor
TonEBP	<i>Tonicity-responsive enhancer-binding protein</i>
TPA	12-O-Tetradecanoylphorbol-13-azetate
TRE	<i>TPA response element</i>
U	Unit
UV	Ultraviolett
v	Reaktionsgeschwindigkeit
X	beliebige Aminosäure
x g	x-fachem der Erdbeschleunigung

# 1 Einleitung

## 1.1 Phosphorylierung von Proteinen

Die Phosphorylierung/Dephosphorylierung von Proteinen stellt ein wichtiges Regulationsprinzip sowohl in prokaryontischen als auch in eukaryontischen Zellen dar. Durch diese posttranslationale Modifikation der Proteine wird es den Zellen ermöglicht, auf eine Vielzahl sich verändernder Umweltbedingungen, wie z.B. osmotischen und oxidativen Stress (Kishi et al., 2001), UV-Strahlung (Luo et al., 2001), Nährstoffmangel (Dean und Cartee, 2000), Wachstumsfaktoren (Douville und Downward, 1997) oder diverse andere Substanzen (Rondinone et al., 1996) adäquat zu reagieren und somit zu adaptieren. Gut untersuchte Beispiele, bei denen die reversible Phosphorylierung eines Proteins zelluläre Ereignisse reguliert, sind z.B. Membrantransport (Shibasaki et al., 1996) und Permeabilität (Staddon et al., 1995), Metabolismus (Lin et al., 1997), Ionenfluß durch Ionenkanäle (Davis et al., 2001), Kontraktilität (Srivastava und StLouis, 1997) sowie die Transkription und Translation von Genen (Darpa und Liu, 1995; Alcazar et al., 1996). Die Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung erfüllt dabei die Funktion eines molekularen Schalters, der die enzymatische Aktivität eines Proteins bzw. die Bindung an andere Proteine oder DNA verändern kann (Sugiura et al., 1999; Okamura et al., 2000a).

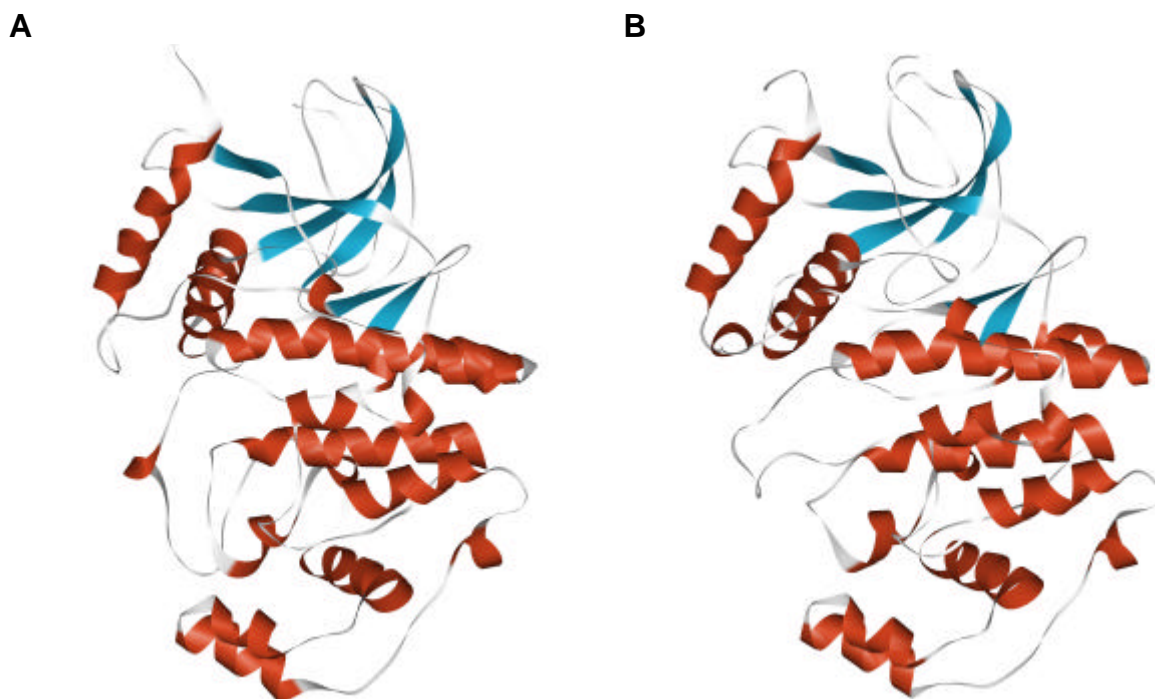


Abb. 1.1: Tertiärstruktur-Änderung in der MAP-Kinase ERK2 (*Rattus norvegicus*) durch Phosphorylierung. Durch MEK1/2-katalysierte Phosphorylierung der Reste Thr183 und Tyr185 wird in der inaktiven Form (A) eine Konformationsänderung (B) induziert, die zu einer Aktivierung des Enzyms führt (PDB-Einträge: 1ERK und 2ERK) (Ellingerziegelbauer et al., 1997).

Oft liegt das Protein in einer inaktiven Form vor, die durch Phosphorylierung oder Dephosphorylierung in eine aktive Form überführt werden kann (Abb.1.1), was den Vorteil hat, daß bei einem Bedarf die zeit- und energieaufwendige Neusynthese des Proteins entfallen kann (Pearson et al., 2001). Auf molekularer Ebene werden durch die Phosphorylierung eine oder zwei zusätzliche negative Ladungen in das Protein eingeführt. Somit ist die Möglichkeit gegeben, daß positiv geladene Gruppen desselben oder eines anderen Proteins mit dem modifizierten Aminosäure-Rest interagieren können. Folgen dieser Interaktion können Konformationsänderungen des Proteins sein, die zu einer Modulation der enzymatischen Aktivität führen (Canagarajah et al., 1997). Ebenso könnten durch die sterische Veränderung potentielle Bindemotive maskiert werden oder die Zugänglichkeit von aktiven Zentren für Substrate oder Inhibitoren erschwert werden (Park et al., 1995b). Aber Ladungseffekte sind nicht die einzigen Determinanten der Phosphatgruppen-Effekte. Wie KIPPING et al. am Beispiel des Hirudins zeigen konnten, steigt die Flexibilität des Peptid-Rückgrat durch die Phosphorylierung (Kipping et al., 2001). Da Phosphorylierungen und Dephosphorylierungen meist kaskadenartig in das engmaschige Signalnetzwerk der Zelle eingebunden sind, resultieren daraus die Möglichkeiten einer Regulation auf verschiedenen Stufen der Signalweiterleitung und einer Signalverstärkung (Eyster, 1998; Keyse, 2000). Erst diese Feinregulation ermöglicht den zeitgenauen Ablauf solcher komplexen zellulären Prozesse, wie z.B. Zellteilung und -differenzierung (Black et al., 1999).

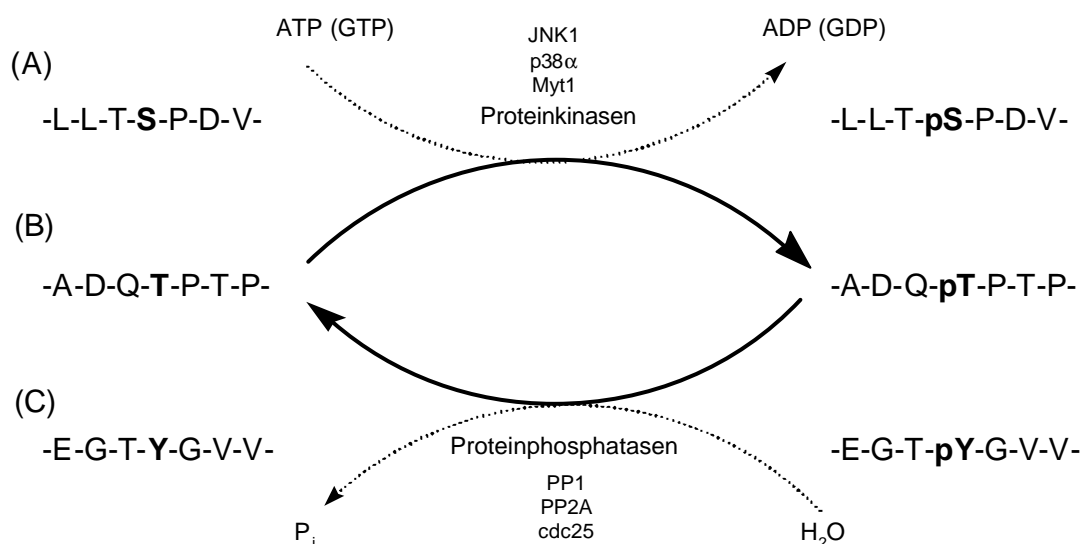


Abb. 1.2: **O-Phosphorylierung und Dephosphorylierung von Serin-, Threonin- und Tyrosin-Resten in Proteinen durch spezifische Proteinkinasen und Proteinphosphatasen.**

Beispiel (A) Phosphorylierung/Dephosphorylierung von Ser63 des humanen c-jun Proteins (Leppa et al., 1998);  
 Beispiel (B) Phosphorylierung/Dephosphorylierung von Thr51 des humanen ATF2 Proteins (Livingstone et al., 1995);  
 Beispiel (C) Phosphorylierung/Dephosphorylierung von Tyr15 des humanen cdk1 Proteins (Kaufmann, 1998).

Bei der O-Phosphorylierung von Proteinen in Eukaryonten wird im Allgemeinen die gammaständige Phosphat-Gruppe des energiereichen Phosphatdonors ATP auf die Hydroxyl-Gruppen der Aminosäuren Serin, Threonin oder Tyrosin als Phosphatakzeptoren übertragen (Abb. 1.2). Neuere Untersuchungen belegen, daß N-Phosphorylierungen von Histidin-Resten nicht nur in Prokaryonten, sondern auch in Eukaryonten von großer Bedeutung sein können (Klumpp und Krieglstein, 2002). Enzyme, die den Transfer von Phosphat-Gruppen auf Proteine katalysieren, werden als Proteinkinasen bezeichnet. Da die Aktivierung/Deaktivierung durch Phosphorylierung reversibel sein muß (Barford, 1999; Dahmus, 1996), existieren in der Zelle auch Enzyme, welche die Hydrolyse der Phosphorsäureester-Bindung katalysieren und der Klasse der Proteinphosphatasen (EC 3.1.3.16) angehören.

## 1.2 Unterteilung der Proteinphosphatasen

Die Proteinphosphatasen, welche von veresterten Hydroxyl-Gruppen in Proteinen und Peptiden die Abspaltung von anorganischem Phosphat ( $P_i$ ) katalysieren, werden unterteilt in die Tyrosin-Proteinphosphatasen, die dualspezifische Proteinphosphatasen und die Serin/Threonin-Proteinphosphatasen (Cohen, 1989). Im Gegensatz zu den Tyrosin- und Serin/Threonin-Proteinphosphatasen erkennen die dualspezifischen Proteinphosphatasen sowohl Phospho-Tyrosin- als auch Phospho-Serin- bzw. -Threonin-Reste. Die Serin/Threonin-Proteinphosphatasen wurden ursprünglich von INGBRITSEN et al. auf Grund ihrer biochemischen Eigenschaften, wie z.B. Substratspezifität und Inhibierbarkeit in zwei Klassen eingeteilt (Ingebritsen und Cohen, 1983). Die Typ 1-Phosphatasen (PP1) werden durch zwei hitzestabile Proteine inhibiert, welche deshalb auch als Inhibitor 1 und Inhibitor 2 bezeichnet werden. Mitglieder der PP1-Klasse dephosphorylieren bevorzugt die  $\beta$ -Untereinheit der Glykogen-Phosphorylase-Kinase. Die Typ 2-Phosphatasen (PP2) werden weder durch Inhibitor 1 noch Inhibitor 2 inhibiert. Diese Phosphatasen dephosphorylieren bevorzugt die  $\alpha$ -Untereinheit der Glykogen-Phosphorylase-Kinase. Die Typ 2-Phosphatasen können weiter nach ihrer Abhängigkeit von divalenten Kationen in die Kationen-indifferente PP2A, die  $Ca^{2+}$ -abhängige PP2B und die  $Mg^{2+}$ -abhängige PP2C unterteilt werden. In den vergangenen Jahren wurden aber auch zahlreiche neue Proteinphosphatasen entdeckt, die sich aber nicht eindeutig in die bestehende Nomenklatur einordnen lassen (Wera und Hemmings, 1995; Chinkers, 2001). Nach neueren Untersuchungen werden die Proteinphosphatasen entsprechend ihrer phylogenetischen Verwandtschaft in zwei Gen-Familien eingeteilt (Barford, 1996). Danach gehören PP1, PP2A und PP2B der PPP-Gen-Familie an, während die PP2C der PPM-Gen-Familie zugerechnet wird (Abb. 1.3).

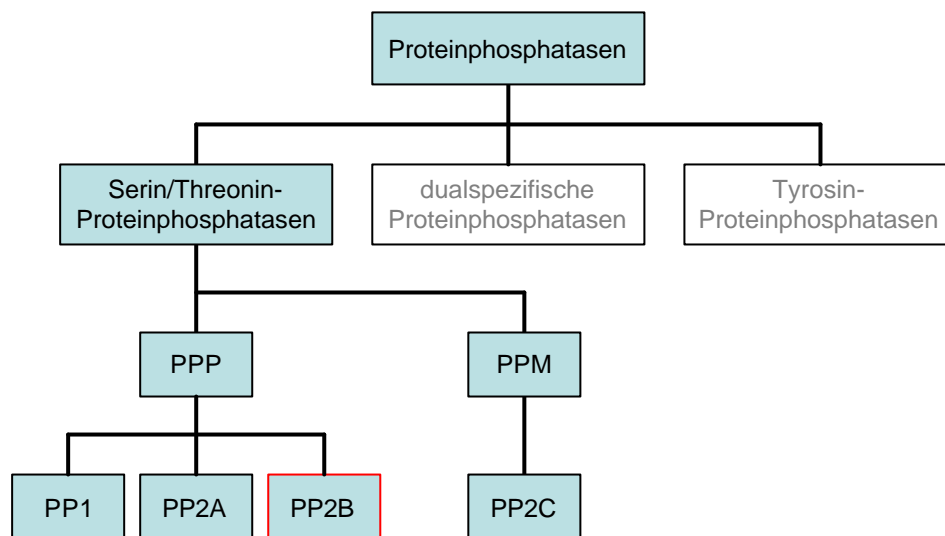


Abb.1.3: **Unterteilung der Proteinphosphatasen (nach Cohen, 1989).**

Enzyme, die in der Lage sind, Phosphosäureester-Bindungen zu hydrolysieren, werden unterteilt in Tyrosin-Proteinphosphatasen, dualspezifische Proteinphosphatasen und Ser/Thr-Proteinphosphatasen. Letztere beinhaltet die Klassen PPP und PPM. Die PP1, PP2A und PP2B werden der PPP-Gen-Familie und die PP2C der PPM-Klasse zugerechnet. Die PP2B (Calcineurin) ist rot umrandet dargestellt.

## 1.3 Calcineurin als Proteinphosphatase

Die PP2B, auch Calcineurin (CaN) genannt, wurde 1979 erstmals von KLEE et al. als Calmodulin-bindendes Protein aus bovinem Hirn isoliert (Klee et al., 1979). Dabei wurde festgestellt, daß nicht nur Calmodulin mit hoher Affinität  $\text{Ca}^{2+}$  binden kann, sondern auch CaN. Im Jahre 1982 wurde entdeckt, daß CaN Phosphatase-Eigenschaften besitzt und somit in der Lage ist, die phosphorylierte  $\alpha$ -Untereinheit der Phosphorylase-Kinase zu dephosphorylieren (Stewart et al., 1982; Sugiura et al., 1999). Die Anwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$  und Calmodulin sind essentiell für die katalytische Aktivität des Enzyms. Deshalb wird CaN auch als  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-abhängige Phosphatase bezeichnet (Klee et al., 1983; Tonks und Cohen, 1983).

### 1.3.1 Vorkommen von Calcineurin

CaN ist in vielen eukaryontischen Lebewesen zu finden. Zahlreiche Untersuchungen belegen, daß es auch in vielen Geweben des Säugerorganismus exprimiert wird, wie z.B. in den Organen Herz (Strack et al., 1996), Leber (Hanley et al., 1987) und Niere (Buttini et al., 1995), aber auch in T- und B-Lymphozyten (Kincaid et al., 1987), Skelettmuskel (Manalan et al., 1984), Plazenta (Pallen et al., 1985) und Spermien (Moriya et al., 1995). Den höchsten Gehalt weisen jedoch Hirn und andere neuronale Gewebe auf (Jiang et al., 1997).

Dabei sind im Menschen von der katalytischen Untereinheit A drei Isoformen und von der regulatorischen Untereinheit B bislang nur eine Isoform bekannt (Rusnak und Mertz, 2000). Die Aminosäuresequenz der  $\beta$ -Isoform ist zu 80 % und die der  $\gamma$ -Isoform zu 77 % identisch mit der Sequenz der  $\alpha$ -Isoform. Während die  $\alpha$ -Isoform vorwiegend in Hirn und Herz exprimiert wird, ist die  $\beta$ -Isoform bevorzugt in Milz, Thymus und Lymphozyten anzutreffen. Intrazellulär findet man CaN meist im Zytoplasma (Omura et al., 1998; Hanley et al., 1987). Unter bestimmten Umständen, wie z.B. durch Aktivierung der Zelle mit Calcium-Ionophoren (Shibasaki et al., 1996) oder in Maus-Spermatozyten (Moriya et al., 1995) kommt CaN auch im Zellkern vor. Außerdem wurde noch von Assoziationen mit Bestandteilen der Zellmembran (Alexander et al., 1988; Pallen et al., 1985) bzw. des Zytoskeletts (Papadopoulos et al., 1990; Ferreira et al., 1993) berichtet.

### 1.3.2 Eigenschaften von Calcineurin

CaN ist ein phylogenetisch hoch konserviertes heterodimeres Enzym, welches nur in Eukaryonten vorkommt und aus einer großen katalytischen Untereinheit A (58-59 kDa) und einer kleinen regulatorischen Untereinheit B (19-20 kDa) besteht (Abb. 1.4) (Klee et al., 1979). Die B-Untereinheit liegt in der Zelle Nterminal myristyliert vor (Aitken et al., 1984). Zur physiologischen Funktion dieser Modifizierung ist bislang wenig bekannt (Kennedy et al., 1996; Zhu et al., 1995). Zwei integrale „EF-Hand“-Strukturmodule in der regulatorischen Untereinheit sind für die hochaffine Calcium-Bindung ( $K_D = 0.1$  nM) verantwortlich, wodurch insgesamt vier  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen pro CaN-Molekül binden können (Klee und Haiech, 1980; Kakalis et al., 1995). In ruhenden Zellen beträgt die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration ca. 100 nM. Wenn diese Zellen durch physiologische Ereignisse oder  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionophore aktiviert werden, strömt Calcium aus den zellulären Speichern des ER/SR und erhöht die Konzentration auf ca. 1  $\mu\text{M}$  (Berridge et al., 2000). Dadurch wird neben anderen  $\text{Ca}^{2+}$ -bindenden Proteinen auch Calmodulin aktiviert, welches an CaN bindet und durch Wechselwirkung mit der B-Untereinheit das Enzym aktivieren kann (Yang et al., 1982). Im aktiven Zentrum des CaN ist ein  $\text{Fe}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ -Cluster als Bestandteil eines „Phosphoesterase-Motivs“ anzutreffen (King und Huang, 1984; Villafranca et al., 1996). Wenn das zweiwertige Eisen durch oxidative Prozesse zum dreiwertigen Eisen oxidiert wird, verliert das Enzym schnell an Aktivität. Die Anwesenheit einer Superoxiddismutase kann die oxidative Inaktivierung verhindern (Namgaladze et al., 2002). Von HASHIMOTO et al. wurde berichtet, daß CaN *in vivo* durch die Proteinkinase C (PKC) und die Casein-Kinase 2 (CK2) phosphoryliert wird. Diese Phosphorylierung zeigt nur eine Verdopplung des  $K_m$ -Wertes für das Phosphoprotein-Substrat, wobei die Calmodulin-Bindung aber unbeeinflusst bleibt (Hashimoto und Soderling, 1989).

A

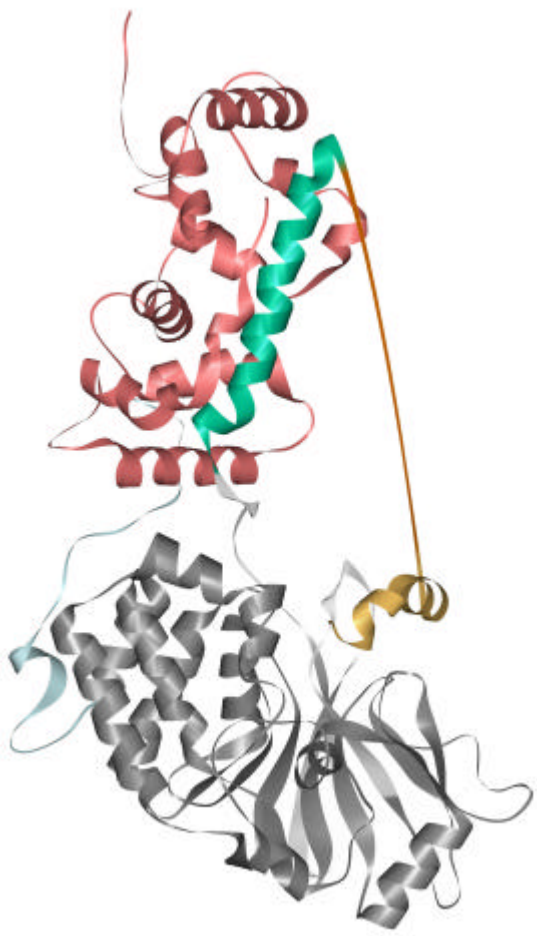
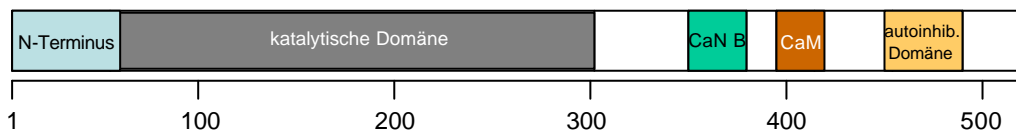


Abb.1.4: **Struktur von humanem CaN.**

(A) 3D-Struktur des rekombinant in *E. coli* hergestellten heterodimeren CaN-Enzymkomplexes (PDB-Eintrag: 1AU1). Die regulatorische Untereinheit ■ bindet nicht-kovalent an eine Helix ■ der katalytischen Untereinheit. In der katalytischen Domäne ■ ist das aktive Zentrum lokalisiert, welches aber im nicht-aktivierten Zustand durch die autoinhibitorische Domäne ■ abgeschirmt und somit für Substratpeptide bzw. -proteine unzugänglich ist. Der N-Terminus ■ befindet sich am äußersten linken Rand der Abbildung. Mit einem fast senkrechten Strich ■ ist die Lage der Calmodulin-bindenden Domäne gekennzeichnet, von der allerdings noch keine Strukturinformationen vorliegen. (B) Aminosäuresequenz und Domänenstruktur der  $\alpha$ -Isoform des humanen CaN.

B



```

1  MSEPKAIDPK LSTTDRVVKV VPFPPSHRLT AKEVFDNDGK PRVDILKAHL
51  MKEGRLEESV ALRIITEGAS ILRQEKNLID IDAPVTVCGD IHGQFFDLMK
101 LFEVGGSPAN TRYLFLGDYV DRGYFSIECV LYLWALKILY PKTLFLLRGN
151 HECRHLTEYF TFKQECKIKY SERVYDACMD AFDCLPLAAL MNQQFLCVHG
201 GLSPEINTLD DIRKLDRFKE PPAYGPMCDI LWSDPLEDFG NEKTQEHFTH
251 NTVRGCSYFY SYPVACEFLQ HNNLLSILRA HEAQDAGYRM YRKSQTTGFP
301 SLITIFSAPN YLDVYNNKAA VLKYENNVMN IRQFNCSPHP YWLPNFM DVF
351 TWSLPFVGEK VTEMLVNVLN ICSDDELGSE EDGFDGATAA ARKEVIRNKI
401 RAIGKMARVF SVLREESESV LTLKGLTPTG MLPSGVLSSG KQTLQSATVE
451 AIEADEAIAIK FSPQHKITSF EEAKGLDRIN ERMPRRR DAM PSDANLNSIN
501 KALTSETNGT DSNGSNSNSNI Q
    
```

### 1.3.3 Calcineurin-Inhibitoren

Da CaN in eine Vielzahl von physiologischen und pathologischen Vorgängen involviert ist, wurden zahlreiche Anstrengungen unternommen, diese Prozesse durch Anwendung spezifischer CaN-Hemmstoffe zu beeinflussen. In Abb. 1.5 sind die wichtigsten CaN-Inhibitoren tabellarisch aufgeführt. Leider stehen damit nur wenige Substanzen zur Verfügung, die den Anforderungen einer klinischen Anwendung - wie z.B. Wirksamkeit, Spezifität und Stabilität - gerecht werden. Alle physiologischen Inhibitoren sind aufgrund ihres Polypeptid-Charakters und der damit verbundenen Instabilität bzw. unzureichenden Zellpermeabilität als Medikament nicht einsetzbar. Aber auch die synthetischen und semisynthetischen Inhibitoren sind als Arzneimittel nicht zu verwenden, da sie entweder zu schlecht wirken (z.B. Dibefurin) oder die katalytische Aktivität anderer Proteinphosphatasen (z.B. Microzystin und Endothall) und Proteinkinasen (z.B. Tyrphostine) ebenfalls verändern.

Für das gezielte Auffinden von wirksamen CaN-Inhibitoren und der Definition neuer Leitstrukturen werden neben der kombinatorischen Organischen Chemie auch Hochdurchsatz-Testungen von Substanz-Banken herangezogen. Neben der Suche in Substanz-Banken kommen aber auch chemisch-synthetische Verfahren zum Einsatz. So sind z.B. die Tyrphostine vom unphysiologischen Phosphatase-Substrat p-Nitrophenylphosphat (pNPP) abgeleitet. Von diesem ausgehend wurden umfangreiche Substanzbibliotheken synthetisiert. Auf diesem Wege wurden neben Ring- auch Seitenketten-substituierte Tyrosin-Derivate vom Tyrphostin-Typ als neue CaN-Hemmstoffe identifiziert (Martin, 1998). Ebenso wurden Retinoide, die neben ihrer nicht-aromatischen Jonon-Ringstruktur eine konjugierte Seitenkette aufweisen, von SPANNAUS-MARTIN et al. synthetisiert und als CaN-inhibierend beschrieben (Spannaus-Martin et al. 2000).

Die einzigen klinisch angewandten Substanzen, die *in vivo* zu einer CaN-Inhibition führen, sind das Cyclosporin A (CsA) und Tacrolimus (FK506). Eine mögliche Erklärung für das Auftreten von schweren CsA- bzw. FK506-Nebenwirkungen während der Therapie könnte ihre Wirkungsweise sein. Beide Inhibitoren können die katalytische Aktivität der Proteinphosphatase CaN nur im Komplex mit Vertretern der Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerasen (EC 5.2.1.8) in einer als „*gain of function*“ bezeichneten Weise hemmen (Abb. 1.6) (Liu et al., 1991). Die systemische Applikation von CsA oder FK506 erfordert eine strenge Indikationsstellung, da schweren Nebenwirkungen, wie eine Verschlechterung der Kreatinin-Clearance bedingt durch eine meist irreversible Schädigung der Nierentubuli (Berg et al., 1986), Hypertension (Mihatsch et al., 1989), Hepatotoxizität (du Toit und Heydenrych, 1986), Hyperkaliämie (Adu et al., 1983), Myopathien (Larner et al., 1994) und Parästhesien (Caccavo et al., 1997) auftreten können.



Inhibitor	Vorkommen	K <sub>i</sub> bzw. IC <sub>50</sub>	Referenz
DSCR1 und 2	Protein; endogener Inhibitor	70 nM	(Casas et al., 2001)
Cain/Cabin	Protein; endogener Inhibitor	440 nM	(Sun et al., 1998) (Lai et al., 1998)
CHP	Protein; endogener Inhibitor	3 µM	(Lin et al., 1999)
AKAP79	Protein; endogener Inhibitor	4.2 µM	(Coghlan et al., 1995)
autoinhibitorische Domäne des CaN (AA 465-487)	Protein; endogener Inhibitor	10 µM	(Hashimoto et al., 1990)
<hr/>			
FK506/FKBP-Komplexe	Makrolid; Naturstoff aus Pilz/endogenes Protein	50 nM	(Liu et al., 1991)
CsA/Cyp18-Komplexe	Peptid; Naturstoff aus Pilz/endogenes Protein	100 nM	(Liu et al., 1991)
Microcystin LR	Naturstoff aus marinem Dinoflagellat	200 nM	(Honkanen et al., 1990)
A238L	Protein aus afrikanischem Schweinefieber-Virus	500 nM	(Miskin et al., 2000)
Endothall-Derivate	synthetisch; vom Cantharidin abgeleitet	500 nM	(Enz et al., 1997)
PD 144795	synthetisch; Benzothiophen-Derivat	4 µM	(Gualberto et al., 1998)
Tyrphostin-Derivate (A8, A23, A48)	synthetisch; Nitrilozimtsäure-Derivate	21 µM	(Martin, 1998)
Dibefurin	Naturstoff aus Pilz	46 µM	(Brill et al., 1996)
Retinoide	synthetisch; von Retinolsäure abgeleitet	50 µM	(Spannaus-Martin et al., 2000)

Abb. 1.5: **Übersicht über CaN-Inhibitoren.**

In der Tabelle sind im oberen Teil alle bislang bekannten physiologischen Inhibitoren, im unteren Teil natürliche, synthetische und semisynthetische Inhibitoren, geordnet nach ihrer inhibitorischen Potenz, aufgeführt.

Ein erhöhtes Risiko der Entstehung von benignen und malignen Tumoren wird in diesem Zusammenhang ebenfalls diskutiert (Offner et al., 1987; Thomson und Cameron, 1981). Die Ursache dafür scheint ein CsA-induzierter Anstieg der zellulären TGF $\beta$ -Produktion zu sein (Hojó et al., 1999).

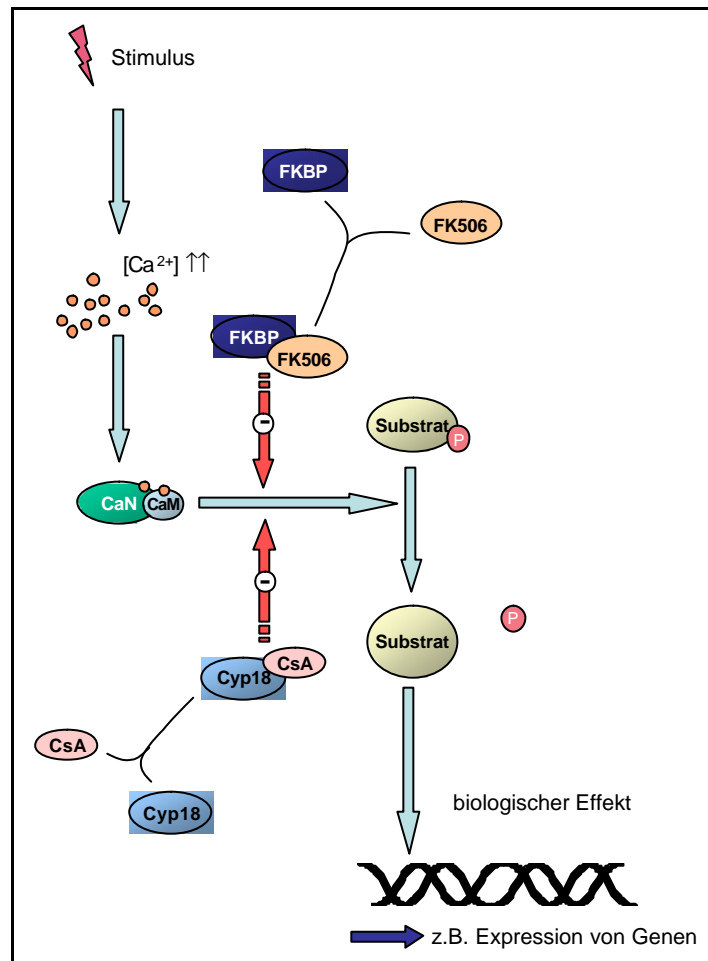


Abb. 1.6: Das „gain of function“-Modell.

Steigende  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen aktivieren die  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-abhängige Proteinkinase CaN, wodurch diese in der Lage ist, Phospho-Serin- und Phospho-Threonin-Reste in Phosphoproteine zu dephosphorylieren. CsA und FK506 sind nur Inhibitoren der Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerase-Aktivität, aber nicht der Phosphatase-Aktivität. CaN kann durch CsA nur im Komplex mit Cyclophilinen bzw. FK506 nur im Komplex mit FK506-bindenden Proteinen inhibiert werden.

Im Moment ist die Immunsuppression das klinische Hauptanwendungsgebiet für diese Substanzen (Calne et al., 1979; Ochiai et al., 1987). So reagiert das Immunsystem eines nicht immunsupprimierten Organempfängers auf ein Allo- oder Xenotransplantat mit einer heftigen und meist lebensbedrohlichen Abstoßungsreaktion (Kirby et al., 1988). Durch die gezielte Gabe von CsA oder FK506 kann die Immunantwort so weit unterdrückt werden, daß keine Abstoßung mehr stattfindet, jedoch der Organismus noch in der Lage ist, Krankheitserreger abzuwehren (anonymous, 1994; Roilides et al., 1994).

Eine zweite Anwendungsmöglichkeit von CaN-Inhibitoren ist der Einsatz bei schweren Autoimmunerkrankungen, wie z.B. systemischem *Lupus erythematosus* oder chronischer Polyarthritits (Caccavo et al., 1997; Isenberg et al., 1981; van Rijthoven et al., 1986; Weinblatt et al., 1987). Bei diesen Erkrankungen werden Antigene auf Körperzellen von selbst-reaktiven Immunzellen erkannt und attackiert. Weitere pathologische Zustände, bei denen die Anwendung von CaN-Inhibitoren sinnvoll erscheint, könnten hyperreaktive Immunreaktionen wie Allergien und Neurodermatiden sein (Bolton et al., 1982; King et al., 1983; Anderson und Groth, 1985; de Prost et al., 1989).

Die ubiquitär - sowohl in prokaryontischen als auch in eukaryontischen Lebewesen - vorkommenden Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerasen (PPlasen) sind Enzyme, welche die *cis/trans*-Isomerisierung der Peptidbindung *N*-terminal von Prolinresten in Oligopeptiden und Proteinen katalysieren können (Fischer und Bang, 1985; Fischer et al., 1984b; Lang et al., 1987). Entsprechend ihrer Sequenzhomologie und Inhibierbarkeit durch CsA oder FK506 werden sie in die Familie der Cyclophiline (Cyp), der FK506-bindenden Proteine (FKBP) und der Parvuline (Par) eingeteilt (Abb. 1.8). Die Proteine der Cyclophilin-Familie, bei deren prototypischem Vertreter Cyp18 FISCHER et al. erstmals eine Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerisierungsaktivität nachweisen konnte, binden das zyklische Undekapeptid CsA mit einer Inhibitionskonstante von 1.5-2.4 nM (Fischer et al., 1989b; Handschumacher et al., 1984). Zur Familie der FKBP gehören ursprünglich Proteine, die das Peptidmakrolid FK506 mit vergleichbar hoher Affinität binden können (Rosen et al., 1990). Im Gegensatz dazu sind Vertreter der Parvuline im Komplex mit ihrem irreversiblen Inhibitor Juglon (Hennig et al., 1998) nicht in der Lage, CaN zu inhibieren. Bislang ist nur für wenige Vertreter der Cyclophilin- bzw. FKBP-Familie im Komplex mit CsA bzw. FK506 eine CaN-Inhibition nachgewiesen worden (Abb. 1.7).

PPlase	Immunsuppressivum	IC <sub>50</sub> bzw. K <sub>i</sub>	Referenz
hCyp18	CsA	100 nM	(Liu et al., 1991)
hCyp21	CsA	21 nM	(Etzkorn et al., 1994)
hCyp23	CsA	37 nM	(Bram et al. 1993)
hCyp40	CsA	320 nM	(Kieffer et al., 1993)
hFKBP12	FK506	50 nM	(Liu et al., 1991)
hFKBP12.6	FK506	20 nM	(Baughman et al. 1995)
hFKBP13	FK506	60 % RA bei 20 µM	(Lam et al. 1995)
hFKBP25	FK506	k.I.	(Lam et al. 1995)
hFKBP51	FK506	4 µM	(Baughman et al. 1997)
hFKBP52	FK506	55 % RA bei 20 µM	(Lam et al. 1995)

RA= Restaktivität; k.I.= keine Inhibition

Abb.1.7: Inhibition von CaN durch verschiedene Cyclophilin/CsA- bzw. FKBP/FK506-Komplexe *in vitro*.

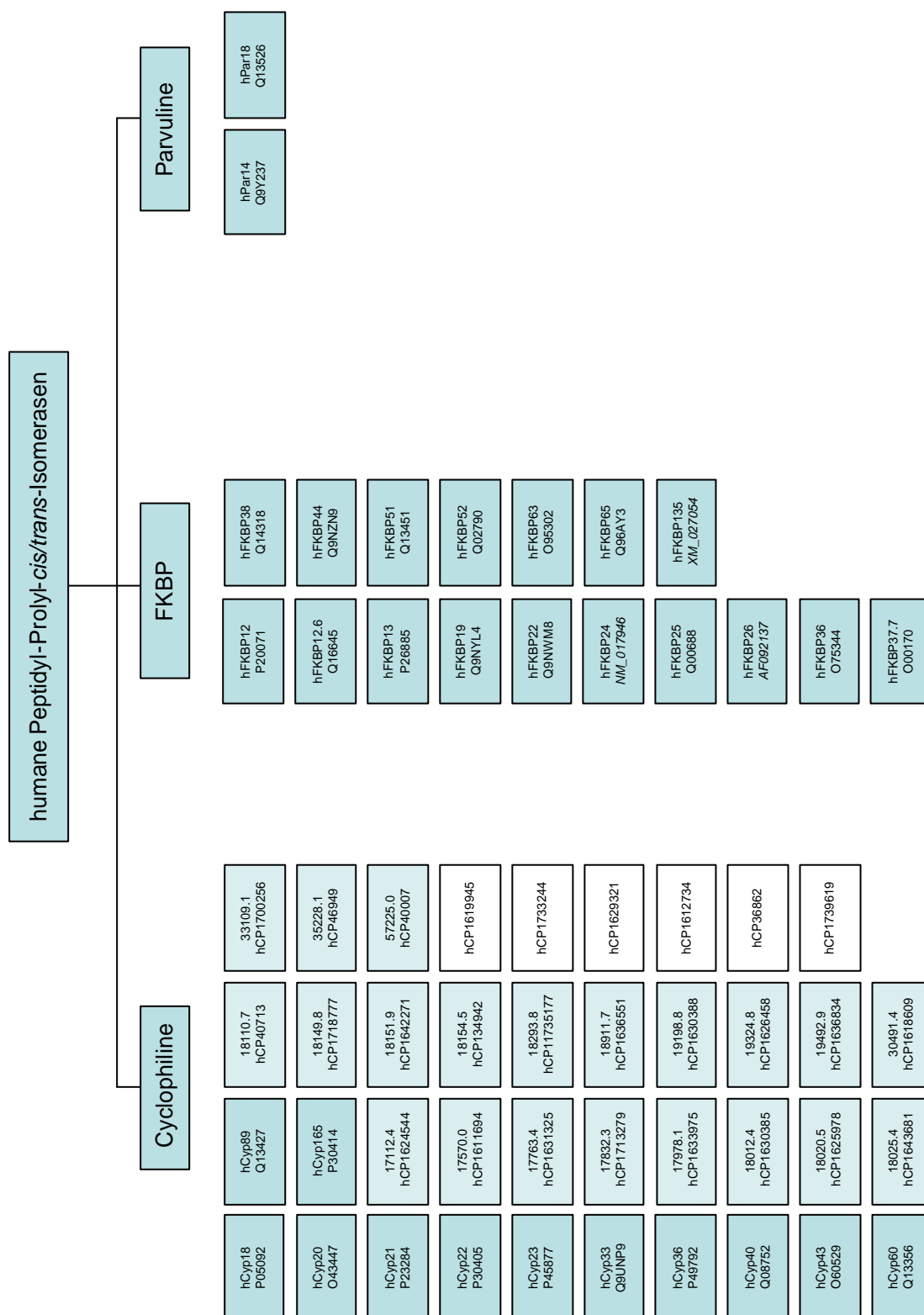


Abb. 1.8 : Unterteilung der humanen Peptidyl-Prolyl-cis/trans-Isomerasen (PPIasen).

Die Peptidyl-Prolyl-cis/trans-Isomerasen (PPIasen) werden entsprechend der Inhibierbarkeit durch CsA, FK506 oder Juglon bzw. Sequenzhomologien in die Familie der Cyclophiline, der FKBP und der Parvuline unterteilt. Alle Vertreter, von denen cDNA oder Protein isoliert wurde, sind  dargestellt (mit Angabe der Swiss-Prot- oder NCBI-Nummern). PPIasen, deren Existenz nur in der Celera-Datenbank vorhergesagt wurde, sind mit  markiert (mit Angabe der Molekulargewicht und Celera-Nummern). Von diesen DNA-Sequenzen, sind alle Vertreter ohne Start-ATG mit  gekennzeichnet (mit Angabe der Molekulargewicht und Celera-Nummern).

Wie detaillierte Beispiele belegen, sind Cyclophiline und FKBP beim Menschen vermutlich auch in viele CaN-unabhängige Prozesse der Signalgenerierung und -weiterleitung einbezogen. So wird durch ein Rezeptor-assoziiertes FKBP12 die Autophosphorylierung des EGF-Rezeptors supprimiert (Lopez-Illasaca et al., 1998).

Aber auch die Bindung von FKBP12 an die Ser/Thr-Kinase-Untereinheit 1 des TGF $\beta$ -Rezeptors ist intensiv untersucht worden und vermutlich auch in die Regulation der Rezeptor-Aktivität involviert (Wang et al., 1994). Durch die Anwesenheit der PPlase kann eine „Fehl-Aktivierung“ durch unterschwellige Signale ausgeschlossen werden. Die negative Kontrolle der Rezeptoraktivität durch FKBP12 kann durch FK506 aufgehoben werden.

Der Ryanodin-Rezeptor (RyR) ist ein weiteres FKBP-Bindeprotein, bei dessen Funktion FKBP eine wichtige Rolle spielt. So ist die in Skelettmuskel-Zellen vorherrschende Isoform 1 des Rezeptors mit FKBP12 (Collins, 1991) und die Isoform 2 in Herzmuskel-Zellen mit FKBP12.6 (Lam et al., 1995) assoziiert. In FKBP12-defizienten Vesikeln haben RyR eine größere Öffnungswahrscheinlichkeit und -dauer, verglichen mit Kontrollvesikeln (Mayrleitner et al., 1994). Der Ryanodin-Rezeptor stellt ebenso wie der FKBP12-assoziierte IP3-Rezeptor einen Calcium-Kanal dar, wodurch die FKBP auch einen Einfluß auf den intrazellulären Calcium-Spiegel ausüben können (Cameron et al., 1995a).

Eine weitere Beobachtung ist die Inhibierung der Progesterin- und Glucocorticoid-induzierten Transkription in der humanen Brustkrebs-Zell-Linie T47d sowohl durch FK506 als auch durch Rapamycin über CaMK II und IV (Lebihan et al., 1998). Obwohl durch beide Substanzen die PPlase-Aktivität gehemmt wird, können Rapamycin/FKBP-Komplexe im Gegensatz zu FK506/FKBP-Komplexen CaN nicht inhibieren (Fruman et al., 1992a). Die Mehrdomänen-PPlasen FKBP51 und FKBP52 sind Bestandteile von nukleären Steroid-Rezeptor-Heterokomplexen. Diese Heterokomplexe stabilisieren den nicht-aktivierten Zustand des Steroid-Rezeptors (Schiene-Fischer und Yu, 2001).

Aber auch Cyclophiline sind in Signalprozesse involviert, wie z.B. die Regulation der Tyrosin-Kinase itk durch Cyp18 in Jurkat-Zellen, bei der die Kinase durch PPlase-Bindung partiell inaktiviert wird (Brazin et al., 2002).

Cyp18 wird aber auch in vaskulären Muskelzellen als Antwort auf oxidativen Stress sekretiert und vermittelt dort die Aktivierung der durch extrazelluläre Signale regulierten Proteinkinase ERK1/2 (Jin et al., 2000).

Eine weitere interessante Beobachtung ist, daß Cyp18 durch den Naturstoff Sanglifehrin 4fach stärker inhibiert wird als durch CsA (Zhang und Liu, 2001). Dabei ist es möglich, daß der entstandene Komplex *in vivo* die IL-2-abhängige T-Zell-Proliferation in der G1-Phase des Zellzyklusses - vermutlich durch eine Hemmung des Cdk2/Cyclin E-Komplexes - blockieren kann (IC<sub>50</sub>= 200 nM). Dabei bleibt die Phosphatase-Aktivität des CaN aber unbeeinflusst (Zhang et al., 2001).

### 1.3.4 Physiologische Bedeutung von Calcineurin

Als CaN erstmals isoliert wurde, nahm man an, daß dieses Protein möglicherweise ein physiologischer Inhibitor der Calmodulin-abhängigen cNMP-Phosphodiesterase sei (Cheung et al., 1981). Durch die in den letzten 20 Jahren durchgeführten Experimente wurde jedoch immer deutlicher, daß CaN das Schlüsselenzym für die meisten Calcium-abhängigen Signalwege darstellt und somit in viele zelluläre Vorgänge involviert ist. CaN ist die einzige  $Ca^{2+}$ -abhängige Proteinphosphatase und somit in der Lage, Substrate in Abhängigkeit von der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration zu dephosphorylieren. Sie stellt somit einen Modulator dar, der ein Calcium-Signal zu einer Änderung des Phosphorylierungsgrades von Proteinen oder Peptiden konvertieren kann (Cameron et al., 1995b; Soncin et al., 2000). Aber es existiert auch die Annahme, daß über CaN eine Verbindung zwischen zellulärer Redox-Homeostase und Apoptose besteht (Namgaladze et al., 2002; Reiter et al., 1999; Wolvetang et al., 1996). Ein Untersuchungsobjekt für die physiologische Bedeutung von CaN stellen CaN-defiziente Mäuse dar. Die Inaktivierung des Gens für die  $\alpha$ -Isoform des CaN führt *in vivo* zu einem Defekt in der antigenspezifischen T-Zell-Antwort und strukturellen Veränderungen im Hippocampus. Bei CaN  $\beta$ -defizienten Mäusen wurde hingegen eine Störung in der Entwicklung einer kardialen Hypertrophie und Defekte in der T-Zell-Entwicklung bzw. Immunantwort beobachtet (Abb. 1.9).

CaN A $\alpha$ -defiziente Maus	CaN A $\beta$ -defiziente Maus
<ul style="list-style-type: none"> <li>• normale Reifung von T- und B-Zellen</li> <li>• Reaktion auf mitogene Stimulation vorhanden</li> <li>• zeigen Defekte in antigenspezifischer <i>in vivo</i> T-Zell-Antwort</li> <li>• sensitiv gegenüber CsA und FK506</li> <li>• Akkumulation von hyperphosphoryliertem Tau-Protein</li> <li>• Veränderungen im Zytoskelett (Hippocampus)</li> <li>• synaptische Depolarisation stark verändert</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• lebensfähig und zeigen normale Entwicklung zur Adoleszenz</li> <li>• fertil</li> <li>• Verminderung der CaN-Aktivität im Herzen um 80 %</li> <li>• Reduktion der Herz-Größe um 12 %</li> <li>• veränderte Reaktion auf verschiedene Hypertrophie-induzierende Stimuli</li> <li>• partieller Defekt im Entwicklungsprogramm für Hypertrophie</li> <li>• Zahl der <math>CD3^+</math> und <math>CD4^+</math> bzw. <math>CD8^+</math> stark vermindert durch Defekte in T-Zell-Entwicklung</li> <li>• Defekte in T-Zell-Proliferation und IL-2-Produktion</li> <li>• permissive Reaktion nach Transplantation von Tumor-Zellen</li> </ul>

Abb. 1.9: **Phänotypische Eigenschaften von CaN  $\alpha$ -defizienten und CaN  $\beta$ -defizienten Mäusen.** CaN  $\alpha$ -defiziente Mäuse zeigen immunologische und neuronale Veränderungen (Kayyali et al., 1997; Zhang et al., 1996). Bei CaN  $\beta$ -defizienten Mäusen wurden kardiale und immunologische Veränderungen beschrieben (Bueno et al., 2002a; Bueno et al. 2002b).

### 1.3.4.1 Rolle von Calcineurin in Nervenzellen

Auf eine wichtige physiologische Funktion könnte der Umstand hinweisen, daß der CaN-Gehalt mit 2-6 µg/mg Gesamtprotein im Gehirn - besonders im Hippocampus und Striatum - 3 bis 10fach höher ist, im Vergleich mit anderen Geweben (Su et al., 1995). Viele neuronale Prozesse, wie z.B. Exzitation, Freisetzung von Neurotransmittern und synaptische Plastizität werden durch Veränderung des Ca<sup>2+</sup>-Spiegels und reversiblen Protein-Phosphorylierungen reguliert (Berridge, 1998; Bito et al., 1996; Greengard et al., 1999).

Besonders gut untersuchte Beispiele, bei denen CaN im Gehirn von Bedeutung ist, sind die Regulation der Adenylatzyklase (Antoni et al., 1995; Antoni et al., 1998) und NO-Synthase (NOS) (Dawson et al., 1993; Snyder und Sabatini, 1995). Die Adenylatzyklase ist ein Enzym, welches die Synthese von cAMP aus ATP katalysiert. Die Regulation der Adenylatzyklase-Aktivität spielt eine große Rolle, da das entstehende cAMP ein *second messenger* ist und andere Signalwege initiieren kann. Sowohl in COS-7 als auch in bovinen Glomerulosa-Zellen konnten BAUKAL et al. zeigen, daß die Adenylatzyklase-Aktivität eng an das Vorhandensein von CaN-Aktivität gekoppelt ist (Baukal et al., 1994). Da gleichzeitig durch die Assoziation von Calmodulin und CaN auch das cAMP-abbauende Enzym cAMP-Phosphodiesterase deaktiviert wird (Cheung et al., 1981), kann auf eine sehr stringente Regulation des intrazellulären cAMP-Spiegels geschlossen werden.

Unter pathologischen Bedingungen, wie z.B. nach einem Schlaganfall, führt die starke Ausschüttung des Neurotransmitters Glutamat zu einem starken Calcium-Influx durch den NMDA-Rezeptor. Durch den erhöhten intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Spiegel bindet Calmodulin an die NOS. Zusätzlich wird das Enzym durch CaN dephosphoryliert, wodurch die katalytische Aktivität steigt. Die NOS wandelt Arginin in Citrullin um, wobei das Radikal Stickstoffmonoxid (NO) entsteht (Mittal und Jadhav, 1994). Diese exzessive NO-Produktion führt neben einer verstärkten Neurotransmitter-Freisetzung zum neuronalen Zelltod und bedingt dadurch die hohe Neurotoxizität dieser Verbindung (Felipo et al., 1998). Wie Versuche von SHARKEY et al. gezeigt haben, kann durch Verminderung der CaN-Aktivität der Anteil an phosphorylierter NOS erhöht werden, was ebenso wie der Einsatz von Inhibitoren der NOS zu einer Neuroprotektion führt (Sharkey und Butcher, 1994).

Sehr gute Ergebnisse konnten nach Applikation von CaN-Inhibitoren bei der Behandlung von neurodegenerativen Zuständen, wie sie nach ischämischen Ereignissen auftreten, erzielt werden. So wurde nach einer Ischämie das Infarktareal nicht nur begrenzt, sondern auch die Remission im Vergleich zu unbehandelten Kontrolltieren signifikant beschleunigt (Sharkey et al., 2000). Eine weitere Erklärung für diese Daten könnte sein, daß CaN durch Interaktion - sowohl mit pro-apoptotischen als auch mit anti-apoptotischen Mitgliedern der bcl-2-Familie - direkt in neuronale Apoptose-Vorgänge eingreifen kann.

Das bcl-2 wird nach Bindung von CaN dephosphoryliert, wodurch ein pro-apoptotischer Einfluß ausgeübt wird (Asai et al., 1999).

CaN scheint auch eine große Rolle bei der neuronalen Entwicklung zu spielen (Tokuda und Hatase, 1998). Axonale Elongation und die Ausbildung der Zellpolarität sind Prozesse, die zu einem gewissen Teil vom Zytoskelett und dem Mikrotubuli-assoziierten Protein Tau abhängig sind (Mata et al., 1997). So kann die während der normalen neuronalen Entwicklung stattfindende Dephosphorylierung dieses Proteins durch CsA partiell blockiert werden (Goto et al., 1985). Bei der ultrastrukturellen Untersuchung wurde festgestellt, daß die CsA-behandelten Neuronen nur kleine axonale Elongationen zeigen (Ferreira et al., 1993).

Zahlreiche Versuchsreihen unterstützen die Vermutung, daß neben CaN auch die PP2A den Phosphorylierungsgrad von Tau vermindert (Ono et al., 1995; Szucs et al., 1994; Gong et al., 1994). Im Gehirn von Alzheimer-Patienten wurde ein abnormal hyperphosphoryliertes Tau-Protein nachgewiesen, das nach einigen Theorien als Ursache dieser Erkrankung anzusehen ist (Harris et al., 1993).

#### **1.3.4.2 Funktion von Calcineurin im Myocard**

Im Myocard wird CaN eine Schlüsselrolle bei der Entstehung einer Hypertrophie zugeschrieben (Izumo und Aoki, 1998; Shimoyama et al., 1999). In Zellkulturen und Tiermodellen ließ sich mehrfach zeigen, daß die durch Streßfaktoren induzierte Hypertrophie des Herzens zu einer Zunahme der intrazellulären Aktivität der Proteinphosphatase CaN in den Kardiomyozyten führen kann (Molkentin et al., 1998; Eto et al., 2000). Als Streßfaktoren kommen dabei physiologische Stimuli, wie z.B. hohe Dauerbelastung (Sportlerherz) oder pathologische Zustände wie Überdehnung durch *pressure-overload* im fortgeschrittenen Alter in Betracht (Hill et al., 2000). Wie zahlreiche Experimente zeigen, ist es möglich, durch Applikation von CsA diesen hypertrophen Effekt zu verhindern (Ding et al., 1999). Die molekularen Wirkmechanismen, die diesem Sachverhalt zugrunde liegen, sind jedoch noch nicht vollständig aufgeklärt (Bueno et al., 2002). Es wird jedoch angenommen, daß die Aktivierung von CaN zu einer Dephosphorylierung des Transkriptionsfaktors NFATc4 (nukleärer Faktor aktivierter T-Zellen) führt, wodurch dieser die Expression Hypertrophie-spezifischer Gene initiiert. NFAT wurden zwar erstmals in Zellkernen stimulierter T-Lymphozyten nachgewiesen, aber in der folgenden Zeit konnten Vertreter dieser Familie auch in vielen anderen Geweben nachgewiesen werden (Masuda et al., 1995; Masuda et al., 1998; Stevenson et al., 2001; Ho et al., 1994).



### 1.3.4.3 Funktion von Calcineurin in Zellen der Skelettmuskulatur

Für die Entstehung einer Hypertrophie der Skelettmuskulatur wird ebenfalls die Beteiligung eines  $\text{Ca}^{2+}$ /CaN-abhängigen Signalweges angenommen (Dunn et al., 1999). Calcium kontrolliert neben der phenotypischen Differenzierung und Zellfusion auch die kontraktile und metabolischen Eigenschaften der Skelettmuskulatur (Berridge et al., 2000; Bigard et al., 2000). Aus der Aktivierung von CaN resultiert eine vermehrte Bildung von sich langsam kontrahierenden Muskelfibrillen. Es kommt dabei zu einer „Umprogrammierung“ der Muskel-Genexpression (Olson und Williams, 2000). Die Transkriptionsfaktoren der NFAT- bzw. MEF2-Familie scheinen dabei die letzten Elemente dieser IGF-initiierten Signalkaskade zu sein (Delling et al., 2000; Musaro et al., 1999). So konnten FRIDAY et al. erstmals experimentell die Annahme bestätigen, daß durch Applikation von CaN-Inhibitoren morphologische Veränderungen sowie die Differenzierung von Muskelzellen in einem frühen Stadium unterbunden werden können. Diese Beweise erhärten den Verdacht, daß CaN essentiell für die Initiation der Myogenese ist (Friday et al., 2000).

### 1.3.4.4 Aufgaben von Calcineurin in Zellen des Immunsystems

Über die Funktionen von CaN in den Zellen des Immunsystems, insbesondere während der Immunantwort, liegen bislang die meisten Informationen vor. Das Immunsystem stellt ein dynamisches Gleichgewicht dar, das durch ein sehr komplexes Zusammenspiel verschiedener zellulärer und humoraler Faktoren aufrechterhalten wird.

Der Kontakt des Immunsystems mit Antigenen in Form von prozessierten Fremdproteinen eine Reaktion aus, bei der das System in Richtung Aktivierung ausgelenkt wird. Nach erfolgreicher Eliminierung der Antigene muß sich der Ausgangszustand wieder einstellen. Nach jetzigem Forschungsstand scheint CaN bei beiden Vorgängen eine wichtige Aufgabe zu erfüllen (Clipstone und Crabtree, 1992; Bonnefoy-Berard et al., 1994). Bei der Aktivierung wird in T-Lymphozyten nach Kontakt mit Antigen/MHC-Komplexen (*Major Histocompatibility Factor*) auf der Oberfläche Antigen-präsentierender Zellen mit dem T-Zellrezeptor CD3 und einem zusätzlichen Zellkontakt über CD28 - als Kostimulus - eine Signalkaskade initiiert, in die zahlreiche Phosphorylierungs-/Dephosphorylierungsschritte und ein schneller Anstieg des intrazellulären Calciums involviert sind (Marie-Cardine und Schraven, 1999; Ohnishi et al., 1995). Aus der Aktivierung dieser Signalwege resultieren eine Zell-Differenzierung und Proliferation bzw. die Sekretion von Zytokinen (Weiss und Littman, 1994; Jain et al., 1995b).

CaN besitzt bei der Aktivierung von T-Zellen vermutlich eine Schlüsselfunktion, obwohl diese Phosphatase auch hier nur ein Bestandteil eines komplizierten Netzwerkes aus sich wechselseitig beeinflussenden Proteinkinasen und Proteinphosphatasen darstellt (Sugiura et al., 2001). Wie Untersuchungen an CsA-behandelten Patienten bestätigen, ist die CaN-Aktivität in der Zelle als limitierender Faktor der Lymphozyten-Aktivierung anzusehen (Clipstone und Crabtree, 1993).

### 1.3.5 Rolle von Calcineurin in intrazellulären Signalprozessen

#### 1.3.5.1 Der NFAT-Signalweg

Wie JAIN et al. beschrieben haben, ist NFATc2 ein Substrat für CaN (Jain et al., 1993). Das NFATc2 stellt nur einen Vertreter einer großen Familie von eukaryontischen Transkriptionsfaktoren dar. Diese wurden erstmals aus den Zellkernen aktivierter T-Lymphozyten mittels DNA-Affinitätschromatographie isoliert, konnten aber mittlerweile auch in anderen Geweben und Zell-Typen nachgewiesen werden (Molkentin et al., 1998; Ho et al., 1994; Hoey et al., 1995). Sie spielen nicht nur eine zentrale Rolle bei der Transkription wichtiger Gene während der Immunantwort (Shaw et al., 1988; Northrop et al., 1994), sondern auch während Differenzierungs- und Entwicklungsvorgängen der Muskulatur und des Herzens (Lim et al., 2000; de la Pompa et al., 1998; Ranger et al., 1998).

Die NFAT wurden als Transkriptionsfaktoren durch Bindung dieser Proteine an das sogenannte ARRE2-Element des IL-2-Promotors und an eine homologe Region innerhalb des HIV LTR identifiziert (Nabel und Baltimore, 1987; Shaw et al., 1988). Mittlerweile sind 5 NFAT bekannt (Abb. 1.10), die jedoch zusätzlich durch differentielles *Splicing* oder alternative Initiation verschiedene Isoformen hervorbringen. Die DNA-bindenden Domänen (DBD) weisen innerhalb der NFAT-Familie eine starke Homologie und zur DNA-bindenden Domäne der Rel-Familie eine moderate Homologie auf (Jain et al., 1995a). Aus diesem Grund können NFAT und NF $\kappa$ B an ähnliche DNA-Sequenzen binden (Sica et al., 1997).

In Kopräzipitations-Experimenten konnten LOH et al. unter Verwendung von T-Zell-Extrakten die Bindung von CaN an den Transkriptionsfaktor NFATc2 nachweisen (Loh et al., 1996a). NFAT liegt im Zytoplasma unstimulierter T-Lymphozyten in einer phosphorylierten Form vor (Abb. 1.11). Nach Aktivierung des CaN durch Calcium und Calmodulin bindet die Proteinphosphatase an NFAT, um dessen anschließende Dephosphorylierung einzuleiten (Ruff und Leach, 1995). Nach dieser findet im Transkriptionsfaktor eine konformationelle Veränderung statt, wodurch eine bis dahin maskierte Kernlokalisationssequenz zugänglich wird (Okamura et al., 2000a).

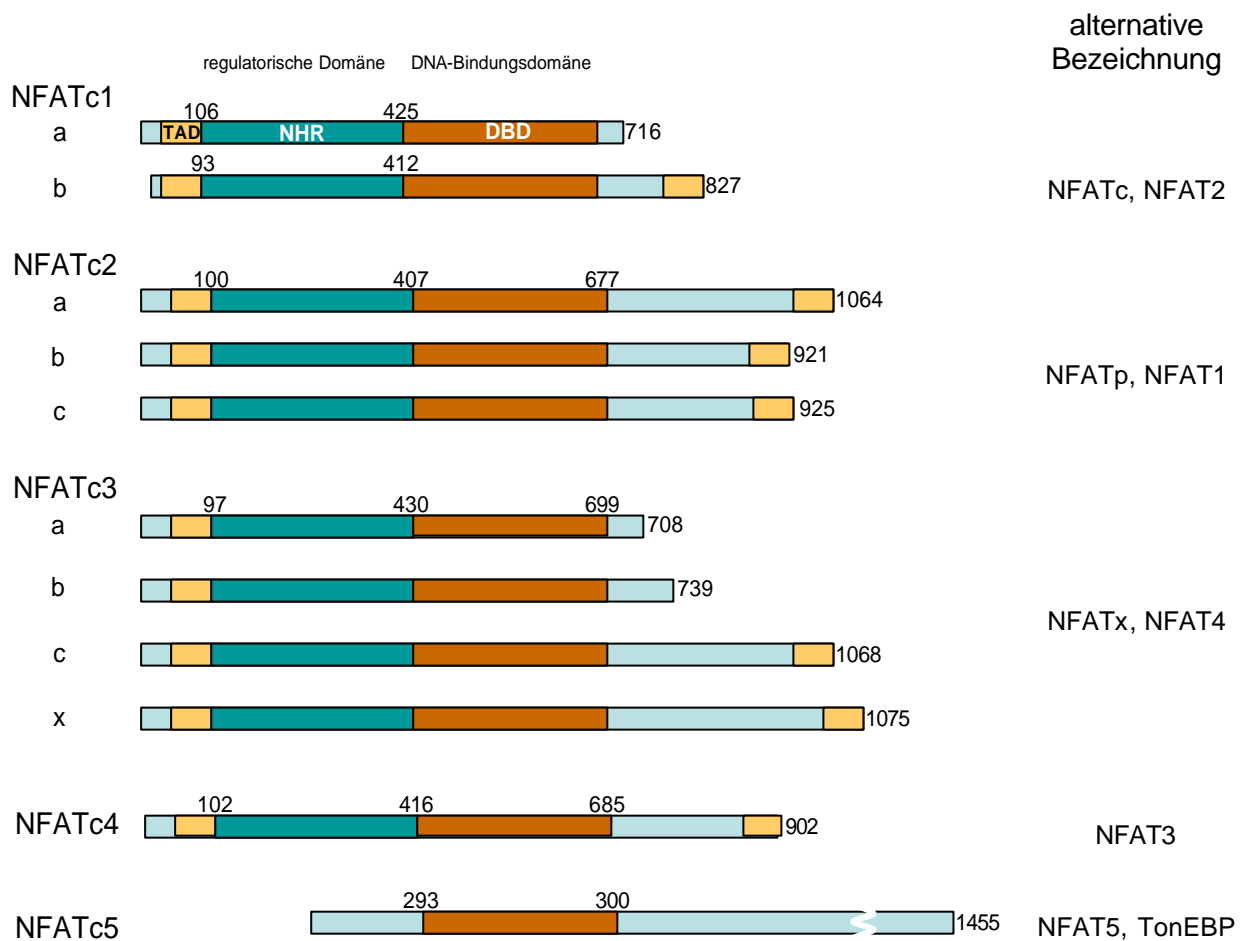


Abb. 1.10: Schematisches Segment-Alignment der NFAT entsprechend ihrer cDNA ( nach (Rao et al., 1997) und (Serfling et al., 2000)) mit alternativen Bezeichnungen.

Die NFAT sind relativ große Proteine, die aus einer regulatorischen Domäne und einer DNA- bzw. AP-1-bindenden Domäne (DBD) aufgebaut sind. Die regulatorischen Domänen sind untereinander homolog (NHR) und weisen drei phosphorylierte Ser-Pro-Regionen auf. Der Cluster aus beiden Domänen ist immer ein-, wenn nicht sogar zweiseitig von einer Transaktivierungsdomäne (TAD) flankiert. Eine Ausnahme bildet dabei nur NFATc5, das nukleär lokalisiert ist und durch  $Ca^{2+}/CaN$  nicht aktiviert werden braucht, da es bereits konstitutiv aktiv ist. Ihm fehlt außerdem die regulatorische Domäne. Die Sequenzen entsprechen denen der humanen NFAT, mit Ausnahme des NFATc2a (*Mus musculus*). In der vorliegenden Arbeit wurde die HUGO-Nomenklatur verwandt, obwohl in der Literatur immer noch andere Synonyme für die NFAT zu finden sind.

NFAT transloziert im Komplex mit CaN in den Nukleus und bindet dort an spezifische DNA-Sequenzen (Shibasaki et al., 1996). Solche NFAT-Bindemotive wurden bereits in zahlreichen regulativen Bereichen, wie z.B. denen der Gene für die Zytokine IL-2, IL-3, IL-4, IL-5,  $TNF\alpha$ , GM-CSF,  $IFN\gamma$ , der Chemokine IL-8, MIP-1 $\alpha$ ; der Transkriptionsfaktoren Egr, Oct2 und sogar Vertretern der NFAT-Familie gefunden (Luo et al., 1996a; Csonga et al., 1998; Campbell et al., 1996; Shannon et al., 1995; Decker et al., 1998). Gleichzeitig wird die Kern-Exportsequenz des NFAT durch CaN maskiert, wodurch das nukleäre Export-Protein Crm1 NFAT nicht in das Zytosol transportieren kann (Zhu und McKeon, 1999).

Nach dem Absinken der intrazellulären Calcium-Konzentration wird das translozierte NFAT durch kernständige Kinasen, wie vermutlich GSK3, JNK, p38 und  $CKI\alpha$ , wieder phosphoryliert, damit es von der DNA abfällt und anschließend in das Zytoplasma ausgeschleust werden kann (Chow et al., 1997; Crabtree und Olson, 2002; Gomez del Arco et al., 2000; Zhu et al., 1998a). Die Kinasen werden aber nicht durch den sinkenden Calcium-Spiegel aktiviert, vielmehr besteht ein dynamisches Gleichgewicht zwischen Phosphorylierung und Dephosphorylierung, das durch Stimulation der CaN-Aktivität weit auf die Seite der Dephosphorylierung verschoben wird (Scott et al., 1997).

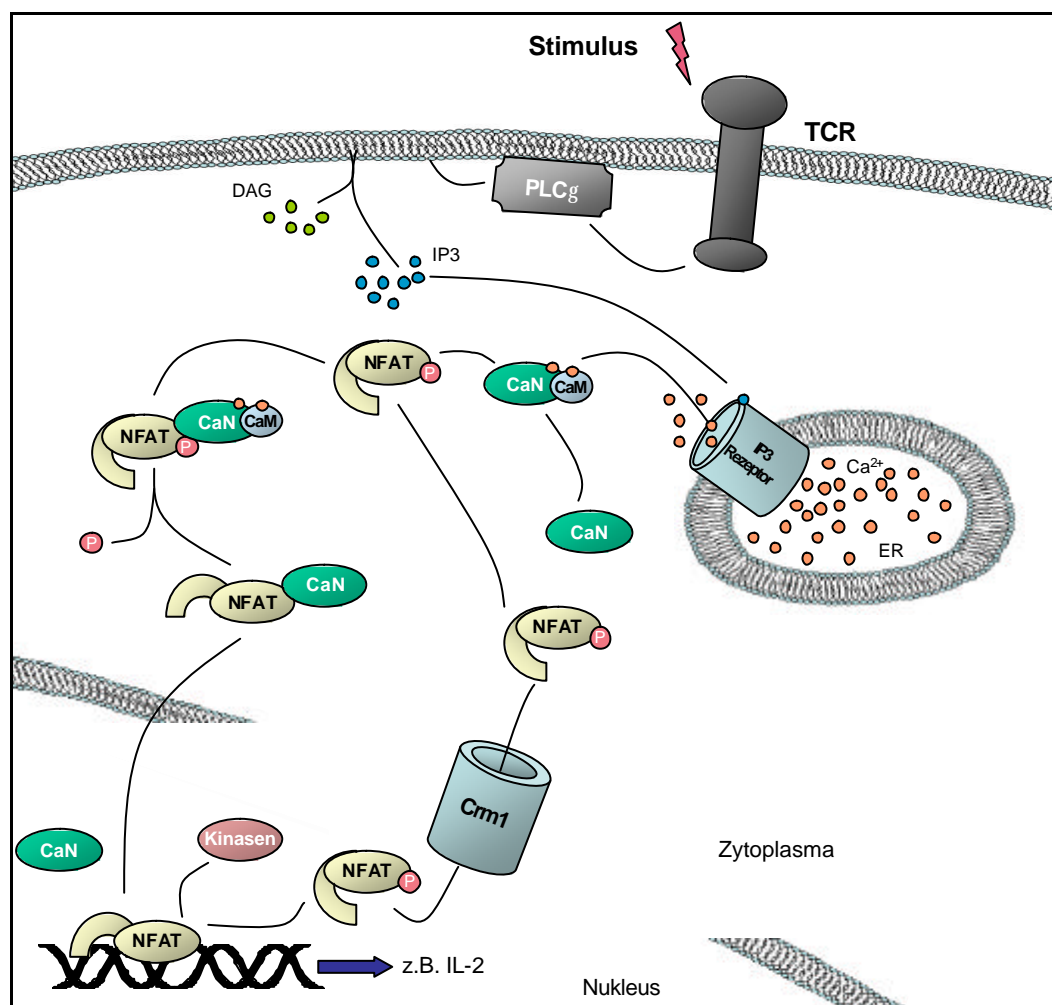


Abb. 1.11: **Aktivierung des NFAT-Signalweges in T-Lymphozyten (modifiziert aus (Rao et al., 1997)).**

Der NFAT-Signalweg wird ausschließlich durch den TCR aktiviert. In der Membran wird durch die membranständige Phospholipase  $C\gamma$  (PLC $\gamma$ ) aus Membran-Lipiden neben Diacylglycerol auch Inositol-(1,4,5)-trisphosphat (IP3) gebildet. IP3 ist ein *second messenger*, welcher an den IP3-Rezeptor bindet und den Calcium-Kanal öffnet. Ca<sup>2+</sup>-Ionen strömen ihrem Konzentrationsgradienten folgend vom ER in das Zytoplasma und binden dort an CaN und Calmodulin. Die Kernlokalisationssequenz des phosphorylierten Transkriptionsfaktors NFAT wird durch die CaN-katalysierte Dephosphorylierung zugänglich und NFAT transloziert in den Zellkern. Im Zellkern bindet NFAT an spezifische DNA-Bereiche und initiiert dort die Transkription von Genen (z.B. IL-2). Kernständige Kinasen rephosphorylieren NFAT, wodurch der Transkriptionsfaktor von der DNA abfällt und durch das Export-Protein Crm1 wieder in das Zytoplasma transportiert wird.

### 1.3.5.2 Der NFκB-Signalweg

Der eukaryontische Transkriptionsfaktor NFκB wurde erstmals von SEN und BALTIMORE als Protein identifiziert, das in reifen B-Lymphozyten und Plasmazellen an die DNA-Sequenz 5'-GGGACTTTCC-3' des intronischen *enhancers* der leichten Kette des Immunglobulin κ bindet (Sen und Baltimore, 1986). Beide Wissenschaftler konnten nachfolgend zeigen, daß auch in anderen Zellen als Reaktion auf exogene Stimuli, wie z.B. Phorbol-Ester, die Menge an DNA-gebundenem NFκB erhöht ist, obwohl die *de novo*-Protein-Syntheserate nicht verändert ist (Sen und Baltimore, 1986). Die Zahl von Genen, in deren Promotoren/*Enhancer* sogenannte κB-Bindungsmotive gefunden werden, nimmt stetig zu. So wurde die Expression folgender Gene als rel/NFκB-abhängig eingestuft: IL-1α und β, IL-2, IL-3, IL-6, IL-8, TNFα und β, G-CSF, IFNβ, C3, C4, c-myc, ras, p53, SV40, HIV-1 und auch rel/NFκB (May und Gosh, 1997).

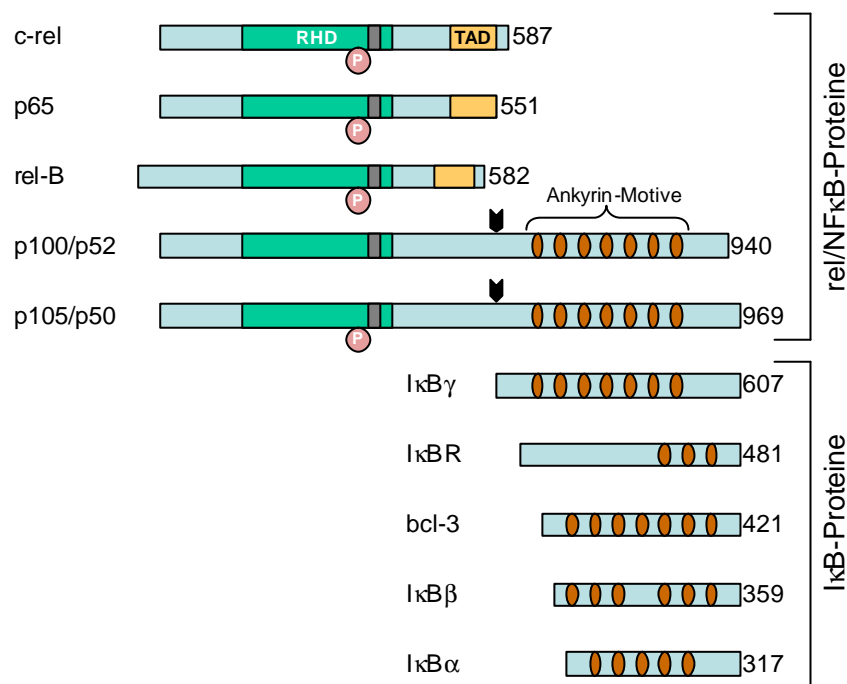


Abb. 1.12: Schematisches Segment-Alignment der rel/NFκB-Proteine und κB-Proteine (aus (May und Gosh, 1997)).

Alle rel/NFκB-Proteine  weisen eine rel-Homologie-Domäne (RHD)  auf, die neben der Kernlokalisationssequenz  auch meist über eine Phosphorylierungsstelle  für PKA verfügt. Durch proteolytische Spaltung ✂ entstehen aus den beiden p100- und p105-Precursorproteinen einige der IκB-Proteine. Ein typisches Strukturmerkmal für diese NFκB-Inhibitoren sind die für eine Bindung essentiellen repetitiven (3-7) Ankyrin-Motive . Am C-Terminus von c-rel, p65 und rel-B schließt sich außerdem noch eine kurze Transaktivierungsdomäne (TAD)  an. RelA=p65

Induktoren der NFκB-Aktivität in Zellen des Immunsystems sind neben den Zytokinen IL-2, TNFα und β, Endo- und Exotoxinen von Bakterien, eine Vielzahl von Viren, aber auch UV- bzw. γ-Strahlung, Ca<sup>2+</sup>-Ionophore, CD28-Aktivierung und Inhibitoren von Phosphatasen, Ca<sup>2+</sup>-ATPasen und der Proteinsynthese (May und Gosh, 1997).

NFκB liegt in der Mehrzahl der Zellen als Homo- oder Heterodimer aus Proteinen vor, die der rel/NFκB-Familie angehören und strukturell verwandte Transkriptionsfaktoren darstellen (Abb. 1.12). Es sind bislang folgende Kombinationen gefunden worden: p50/c-rel, p52/c-rel, p65/c-rel, p65/p65, p50/p50, p52/p52, p50/p52, relB/p50 und relB/p52. Aber nicht alle rel/NFκB-Proteine sind transkriptionell aktiv, da eine Transaktivierungsdomäne (TAD) dafür eine notwendige Voraussetzung ist. Im Gegenteil: Homo- und Heterodimere von p50 und p52 können die κB-abhängige Transkription *in vivo* sogar reprimieren (Kang et al., 1992; Lernbecher et al., 1993; Plaksin et al., 1993), obwohl p50/p50-Dimere die Transkription *in vitro* initiieren können (Lin et al., 1995; Fujita et al., 1992).

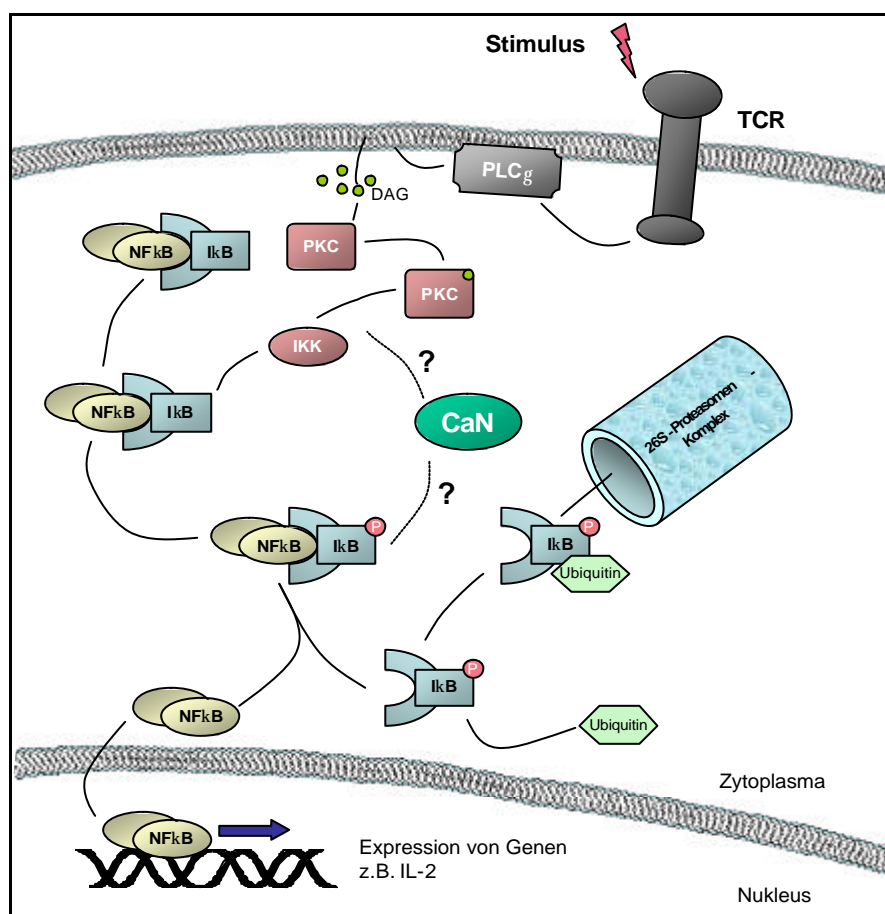


Abb. 1.13 : Aktivierung des NFκB-Signalweges in T-Lymphozyten.

Nach Stimulation des TCR wird die membranständige Phospholipase Cγ (PLCγ) aktiviert, die durch Lipolyse aus der Membran DAG freisetzt. Dieser *second messenger* aktiviert die PKC und diese nachfolgend eine IKK. Durch Phosphorylierung des Inhibitors κB dissoziiert dieser von NFκB ab und der Transkriptionsfaktor kann in den Zellkern translozieren und dort an spezifische DNA-Sequenzen binden. Der phosphorylierte Inhibitor κB wird ubiquitinyliert und dann vom 26S-Proteasomen-Komplex abgebaut. Die Rolle von CaN ist in diesem Signalweg noch nicht eindeutig geklärt.

Interessanterweise kann das  $\kappa$ B-Protein bcl-3 auch die rel-Proteine p50 und p52 binden und so die Transkription auf zwei Wegen aktivieren: (1) Inhibition der DNA-Bindung von p50 und p52, wodurch transkriptionell aktive rel/NF $\kappa$ B-Proteine binden können und (2) Bildung eines Ternärkomplexes aus p50/p50/bcl-3 oder p52/p52/bcl-3, der selber eine Transaktivierung vermitteln kann. Die rel-Homologie-Domäne (RHD) ist nicht nur für die DNA-Bindung wichtig, sondern auch für die Dimerisierung (May und Ghosh, 1997). Das Motiv der RHD ist weit verbreitet und nicht nur bei Säugern, sondern auch im viralen Onkoprotein v-rel und im Protein *Dorsal* von *Drosophila melanogaster* anzutreffen (Ryseck et al., 1992; Bull et al., 1990; Schmitz et al., 1995). Die Transkriptionsaktivität der rel/NF $\kappa$ B-Proteine wird durch Interaktion mit regulatorischen Proteinen - den  $\kappa$ B - beeinflusst. Es stellte sich aber heraus, daß bestimmte  $\kappa$ B-Moleküle bevorzugt distinkte rel/NF $\kappa$ B-Proteine inhibieren (Baeuerle und Baltimore, 1989; Thompson et al., 1995; Beg et al., 1992).

So liegen NF $\kappa$ B-Komplexe im Zytoplasma unstimulierter Zellen durch Assoziation der RHD mit Ankyrin-Motiven des  $\kappa$ B-Monomers in einer inaktiven Form vor (Abb. 1.13). Als Folge dieser Interaktion wird die Kernlokalisationssequenz maskiert (Henkel et al., 1992; Zabel et al., 1993). Signale, die zu einer Induktion der NF $\kappa$ B-Aktivität führen, verursachen primär meist eine Phosphorylierung des  $\kappa$ Bs durch eine hochspezifische und vermutlich durch MEKK1 induzierbare Serin-Kinase. Dadurch dissoziiert der Inhibitor vom Transkriptionsfaktor ab, wodurch dieser aktiviert wird. Das phosphorylierte  $\kappa$ B-Protein wird ubiquitinyliert und durch den 26S-Proteasomen-Komplex degradiert (Duckett et al., 1993).

In manchen Zell-Typen, wie z.B. reifen B-Zellen, Monozyten, Neuronen, kornealen Keratinozyten und vaskulären Myozyten wird NF $\kappa$ B jedoch als konstitutiv aktiver Transkriptionsfaktor angetroffen (Grilli et al., 1996; Kopp und Ghosh, 1995). Ein weiterer Regulationsmechanismus für rel/NF $\kappa$ B-Proteine ist die Phosphorylierung von Serin-Resten durch PKA (Abb.1.9), die zu einer Verstärkung der transaktivierenden Aktivität des DNA-gebundenen NF $\kappa$ B-Komplexes führt. Wie Pons et al. zeigen konnten, besteht auch hier eine Verbindung zum Ca<sup>2+</sup>/CaN-Signalweg. In Astrozyten wird das Inhibitor-Protein  $\kappa$ B $\alpha$  nach IGF-1-Stimulation durch CaN dephosphoryliert, was zu einer Inhibition der nukleären Translokation von p65 - sogar nach TNF $\alpha$ -Zugabe - führt (Pons und Torres-Aleman, 2000). Aber Ca<sup>2+</sup>/CaN ist vermutlich auch an der Aktivierung von NF $\kappa$ B beteiligt, da in Jurkat-Zellen nach Stimulation des T-Zell-Rezeptors (TCR) mittels anti-CD3-Antikörper und vorheriger Applikation von Calcium-Kanalblockern die NF $\kappa$ B-Aktivierung vermindert wird. Die gleichzeitige Kotransfektion mit einem konstitutiv aktiven CaN konnte diesen Effekt jedoch aufheben (Kanno und Siebenlist, 1996). Diese Tatsachen zeigen, daß Ca<sup>2+</sup>/CaN unabhängig von der Art des Stimulus oder der Zelle auf den NF $\kappa$ B-Signalweg einwirken kann.

Es gibt auch Hinweise darauf, daß CaN für eine Aktivierung des I $\kappa$ B $\alpha$ -Kinase-Komplexes (IKK) mit der PKC  $\delta$  synergistisch zusammenwirken muß. Wenn ein Signalweg von beiden blockiert wird, so wird *in vivo* die Aktivierung des IKK $\beta$  und dadurch auch die Phosphorylierung des I $\kappa$ B $\alpha$  vermindert (Trushin et al., 1999).

### 1.3.5.3 Der AP-1-Signalweg

Der Transkriptionsfaktor Aktivator-Protein 1 (AP-1) wurde erstmals definiert als DNA-bindende Aktivität, die spezifisch für das positiv regulierte Element des frühen SV40-Promotors ist und als Reaktion auf Stimulation mit Phorbol-Estern auftrat (Lee et al., 1987).

AP-1 ist jedoch kein einzelner Transkriptionsfaktor, es ist vielmehr ein Komplex aus Proteinen der c-jun- und c-fos-Familie und liegt als jun/jun-Homo- oder als jun/fos-Heterodimer vor. C-jun und c-fos sind die zellulären Vertreter der viralen Onkogene v-jun und vfos aus dem murinen Finkel-Biskis-Jinkins-Sarkoma-Virus und dem avianen Sarkoma-Virus 17 (Steff et al., 1997). AP-1-Komplexe binden an spezielle palindromische DNA-Sequenzen der Form 5'-TGA<sup>G</sup>/cTCA-3', auch bekannt als TRE (*T*PA *r*esponse *e*lement) (Moll et al., 2002; Sitlani und Crothers, 1996). Es wurden jedoch auch Wechselwirkungen zwischen jun/fos und CRE (*c*AMP *r*esponse *e*lement) (Pestell et al., 1994; Bisotto et al., 1996), Elementen des Glucocorticoid-Rezeptors (Breslin und Vedeckis, 1996) und dem SRE (*S*erum *r*esponse *e*lement) (Bushel et al., 1995) beobachtet. Des Weiteren wirkt AP-1 in T-Zellen nicht nur synergistisch mit NFAT, es ist auch oft Bestandteil des aktiven NFAT-Transkriptionskomplexes (Castigli et al., 1993). NFAT und AP-1 bilden stabile Binärkomplexe um die Expression einer Vielzahl verschiedener induzierbarer Gene zu regulieren. So sind z.B. im IL-2-Promotor NFAT-Bindemotive meist direkt neben AP-1-Bindemotiven angeordnet (Abb. 1.14) (Macian et al., 2001).

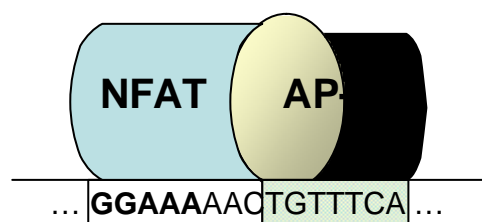


Abb. 1.14: **Zusammengesetztes NFAT/AP-1-Bindemotiv (ARRE2) im humanen IL-2-Promotor.** NFAT bindet im Komplex mit AP-1 an regulatorische Bereiche des humanen IL-2-Promotors. Die Nukleotide, die hauptsächlich zur NFAT-Bindung beitragen, sind dick hervorgehoben.



Eine starke Induktion der Transkriptionsaktivität in T-Lymphozyten erfordert somit die konzertierte Aktivierung von zwei unterschiedlichen Signalwegen: zum einen von  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaN}$  für die Dephosphorylierung von NFAT und der damit verbundenen Translokation in den Nukleus und zum anderen von PKC/ras für die Synthese, Phosphorylierung und Aktivierung von Mitgliedern der jun- bzw. fos-Familie. Das könnte einen „Sicherheitsmechanismus“ darstellen, der einer fatalen „Fehlaktivierung“ der Zellen entgegenwirken kann. Die funktionelle Bedeutung der NFAT/AP-1-Interaktion in anderen Zell-Typen ist aber bislang noch ungeklärt.

Der fos-Familie werden vier Proteine zugeordnet: c-fos, FosB (inklusive Splicevarianten), Fra-1 und Fra-2 (Abb. 1.15). Während es nach Stimulation der Zellen zu einer schnellen Expression von c-fos kommt, wird FosB relativ spät exprimiert. Erst als Reaktion auf wiederholte oder lang andauernde Stimulation werden Fra-1 und Fra-2 gebildet. Dafür haben sie aber auch mit 28 bzw. 208 h eine viel längere Halbwertszeit (HWZ) verglichen mit den 2h des c-fos-Proteins (Kovacs, 1998).

fos-Protein	HWZ	Induktion
c-fos	2 h	schnell nach akuter Stimulation
FosB	9.5 h	verzögert nach akuter Stimulation
Fra-1	28 h	nur nach wiederholter oder länger andauernder Stimulation
Fra-2	208 h	

Abb. 1.15: Einteilung der fos-Proteine (aus (Kovacs, 1998)).

Die vier fos-Proteine weisen nicht nur Unterschiede in der Induktion, sondern auch in der HWZ auf.

Von den jun-Proteinen sind drei Vertreter bekannt: c-jun, junB und junD. Sie sind in hohem Maße konserviert, so daß zwischen humanem und murinem junD 77 % und bei c-jun bzw. junB 95-98 % Sequenzhomologie zu finden sind. Die Expression von c-jun wird über einen negativen Rückkopplungsmechanismus reguliert, da in seinem Promotor ebenfalls AP-1-Erkennungssequenzen vorhanden sind. Fos-Proteine werden durch eine fos-regulierende Kinase (FRK) (Kovacs, 1998) und jun-Proteine durch die cjun-N-terminale Kinase (JNK) (Kallunki et al., 1994) posttranslational phosphoryliert, wodurch sich die DNA-bindenden Eigenschaften ändern (Xu et al., 1997). Die C-terminale Phosphorylierung von c-fos durch die ribosomale S6-Kinase (RSK) oder MAP-Kinasen führt zu einer Verstärkung der Transkription (Chen et al., 1996b). Einen weiteren Regulationsmechanismus für AP-1 stellt die Zusammensetzung der Komplexe dar. Wie STEINMÜLLER et al. berichten, ist die Zusammensetzung der AP-1-Komplexe maßgeblich für ihre transkriptionelle Aktivität (Steinmüller et al., 2001).

So wirken z.B. c-jun/c-fos-Komplexe stimulierend und JunB/c-fos-Komplexe meist supprimierend auf die Transkription (Schutte et al., 1989; Sheng und Greenberg, 1990). CaN beeinflusst über JNK die Phosphorylierung von jun-Proteinen und somit die Transkriptionsaktivität von AP-1 (Werlen et al., 1998). CHEN et al. beobachteten, daß CaN in Jurkat-Zellen die Expression von c-fos und c-jun negativ reguliert, wodurch die IL-2-Produktion vermindert wird (Chen et al., 1996a). Da viele AP-1-Sequenzen in Promotoren/*Enhancer* in enger Nachbarschaft zu NFAT-Sequenzen lokalisiert sind (Abb. 1.11), können sich beide Transkriptionsfaktoren wechselseitig beeinflussen (Castigli et al., 1993; Chen et al., 1999; Kel et al., 1999).

#### 1.3.5.4 Der MAP-Kinase-Signalweg

Der MAP-Kinase-Signalweg ist kein funktionell isolierter Signalweg, es ist vielmehr eine Signalkaskade in einem hierarchisch aufgebauten Signalnetzwerk, in das auch akzessorische Proteinphosphatasen mit eingebunden sind.

Unter einer Mitogen-aktivierten-Proteinkinase (MAPK) versteht man im Allgemeinen eine bei Eukaryonten ubiquitär vorkommende Prolin-gerichtete Ser/Thr-Proteinkinase, die durch spezielle Proteinkinasen als Antwort auf exogene Stimuli aktiviert wird. Dabei ist trotz einer distinkten Regulation der MAP-Kinasen, eine gewisse Redundanz bezüglich ihrer Substrat-Spezifität zu beobachten (Lewis et al., 1998; Waskiewicz et al., 1997; Fukunaga und Hunter, 1997).

MAPK-Signalwege sind Hauptbestandteile von zellulären Regulationsmechanismen, die für die Kontrolle der Embryogenese und der Proliferation, Differenzierung und Apoptose von Zellen wichtig sind. Sie werden aktiviert, wenn die Zellen einem Stress ausgesetzt sind (Kishi et al., 2001), wie z.B. UV-Strahlung (Luo et al., 2001), Nahrungsentzug (Dean und Cartee, 2000), Wachstumsfaktoren (Douville und Downward, 1997) und Zytokinen (Raingeaud et al., 1995b; McCubrey et al., 2000).

Es sind mehrere Familien von MAPK-Kaskaden bekannt, die als MAPK-Module bezeichnet werden (Pearson et al., 2001). Dabei sind mindestens drei Proteinkinasen seriell verknüpft (Lewis et al., 1998; Errede et al., 1995; Gustin et al., 1998). Aber es können auch weitere Kinasen den MAPK-Modulen vor- oder nachgeschaltet sein. Die den MAPK vorgeschalteten MAPK-Kinasen (MKK) sind meist dualspezifisch, d.h. sie können Hydroxyl-Gruppen von Ser/Thr- und von Tyr-Seitenketten phosphorylieren (Seger et al., 1992; Crews et al., 1992; Kosako et al., 1992).

Ein Beispiel dafür ist die Phosphorylierung der MAP-Kinase ERK2 durch die MEK1/2 an den Resten Thr183 und Tyr185 (Abb. 1.1) (Ellingerziegelbauer et al., 1997). Für die Aktivierung der MKKs ist es notwendig, daß in ihrem Aktivierungsloop zwei Reste (Ser oder Thr) durch MAPK-Kinase-Kinasen (MKKK) phosphoryliert werden (Alessi et al., 1994; Zheng und Guan, 1994). Über zusätzliche Phosphorylierungsstellen in einigen MKKs, welche von Kinasen aus anderen Signalwegen erkannt werden, sind die MAPK-Signalketten auch in diese kointegriert (Abb. 1.17, 1.18 und 1.19) (Frost et al., 1997; Mansour et al., 1994; Rossomando et al., 1994).

Neben den drei klassischen Haupt-MAPK-Modulen ERK1/2, p38 und JNK existieren in Säugetieren auch noch andere eigenständige Module, wie z.B. ERK3/4 oder ERK5 (Abb 1.16). Es kommen aber ständig neue Vertreter hinzu, wie in den letzten Jahren die Isolierung einer ERK7 und ERK8 zeigten (Abe et al., 1999; Abe et al., 2002).

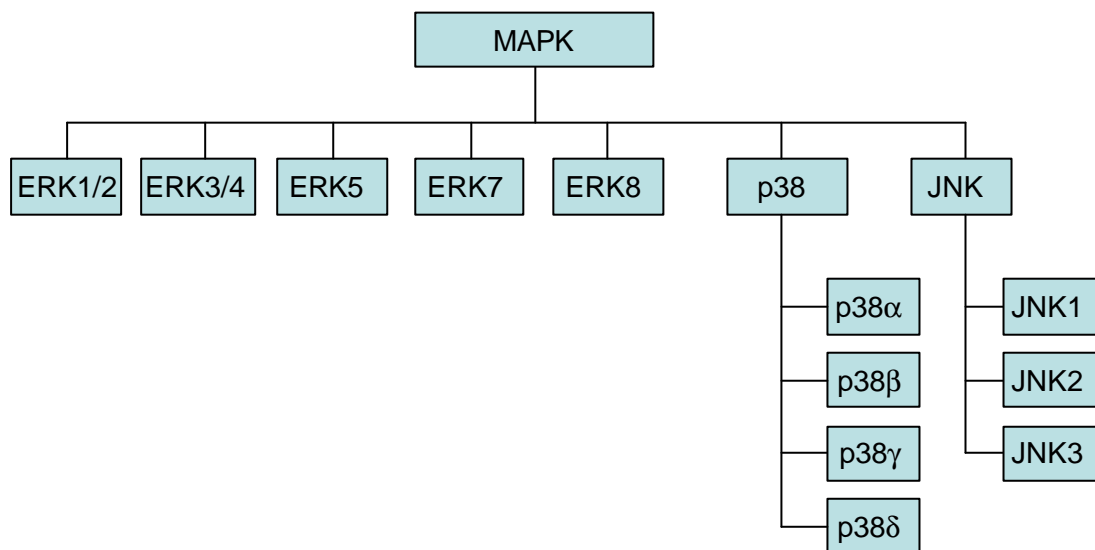


Abb. 1.16: **Einteilung der MAPK(modifiziert nach (Pearson et al., 2001)).**

Die p38 $\gamma$  wird in der Literatur synonym auch als ERK6 bezeichnet, stellt aber kein distinktes MAP-Kinase-Modul dar.

ERK1 und ERK2 sind Proteine von 44 bzw. 42 kD die untereinander 85 % Sequenzhomologie aufweisen (Boulton und Cobb, 1991; Chatani et al., 1992). Durch Phosphorylierung des Threonin- und des Tyrosin-Restes einer Thr-Glu-Tyr-Sequenz im Aktivierungsloop wird die ERK1/2 aktiviert (Payne et al., 1991; Canagarajah et al., 1997). Obwohl beide Kinasen ubiquitär in fast allen Geweben vorkommen, ist ERK2 in vielen Zellen des Immunsystems vermehrt anzutreffen (Atherfold et al., 1999; Lewis et al., 1998).

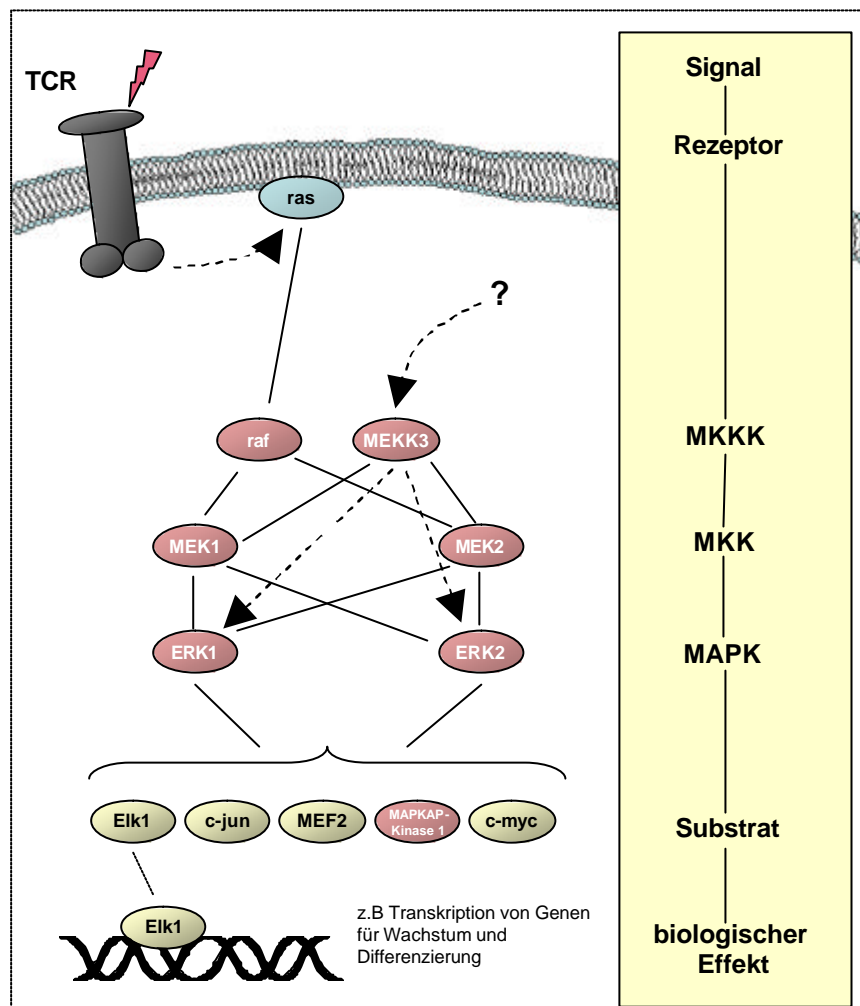


Abb. 1.17: **Aktivierung des ERK1/2-Signalweges in T-Lymphozyten.**

Nach Stimulation des TCR wird das G-Protein ras über mehrere Zwischenstufen aktiviert. Die Signalweiterleitung erfolgt über die Ser/Thr-Kinase raf zur MEK1/2. Diese phosphorylieren die MAPK ERK1/2 und diese ihre Substrate. Es existiert aber auch ein alternativer Weg der Aktivierung über die MEKK3. Auf der rechten Seite der Grafik ist der Informationsfluß vom Stimulus über die MAPK-Kaskade zum Substrat - welches den biologischen Effekt vermittelt - gezeigt.

Die ERK1/2-Kaskade kann unter anderem durch Serum, Wachstumsfaktoren, Zytokine, diversen Stress, Liganden von GPCR (*G-protein-coupled receptor*), transformierende Agenzien und über membranständige Rezeptoren initiiert werden (Adi et al., 2002; Arditi et al., 1995; Chatterjee et al., 1997). Bei der TCR-vermittelten Aktivierung des ERK1/2-Signalweges (Abb. 1.17) wird die Rezeptoraktivierung an das G-Protein ras weitergegeben, welches die Kinase raf und diese wiederum die MEK1/2 aktiviert (Ellingerziegelbauer et al., 1997). ERK1/2 wird anschließend durch MEK1/2 phosphoryliert.

Alternativ kann die MEK1/2 und vielleicht auch direkt die ERK1/2 durch die MEKK3 aktiviert werden. Typische Substrate der ERK1/2 sind c-jun, junD, c-fos, Elk1, MEF2, c-myc und die MAPK-aktivierte Proteinkinase 1 (MAPKAP-Kinase 1) (Stocco et al., 2002).

Enzyme der p38-Familie wurden zum ersten Mal in Zellen gefunden, die zuvor mit inflammatorischen Zytokinen behandelt wurden (Raingeaud et al., 1995a). Vertreter dieser Familie wurden auch als Angriffspunkt für Pyridinyl-Imidazole identifiziert, wobei diese Substanzen als Medikament *in vivo* die Produktion von TNF $\alpha$  blockieren können (Badger et al., 1996).

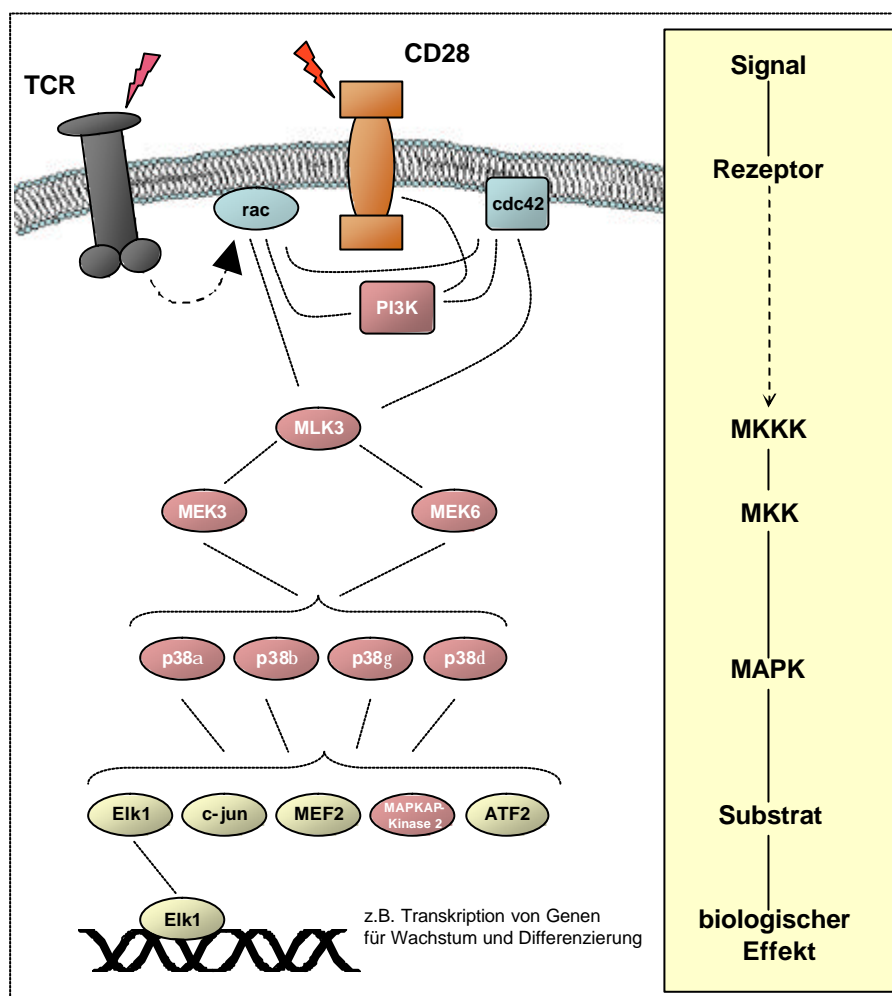


Abb. 1.18: **Aktivierung des p38-Signalweges in T-Lymphozyten.**

Nach Stimulation von TCR und CD28 wird das G-Protein rac aktiviert. Die Signalweiterleitung erfolgt von dort über die MLK3 zu den MKK MEK3 und MEK6. Diese können alle vier p38-Kinasen phosphorylieren und diese wiederum ihre Substrate. Auf der rechten Seite der Grafik ist der Informationsfluß vom Stimulus über die MAPK-Kaskade zum Substrat gezeigt.

Alle p38-Kinasen werden durch Phosphorylierung von Thr- und Tyr-Resten in der Sequenz Thr-Gly-Tyr- aktiviert. Von ihnen sind folgende Isoformen bekannt: p38 $\alpha$ , p38 $\beta$ , p38 $\beta$ 2, p38 $\gamma$  und p38 $\delta$  (Han et al., 1995; Keesler et al., 1998). Eine Vielzahl von Faktoren kann den p38-Signalweg aktivieren, wie z.B. Zytokine, Hormone, Agonisten von GPCR, osmotischer Schock, Hitzeschock und andere Stressoren (Clerk et al., 1999; Kishi et al., 2001; Schiaffonati et al., 2001).

Die zwei Mitglieder der MEK-Familie MEK3 und MEK6 weisen eine hohe Aktivität gegenüber p38-MAP-Kinasen auf, wobei die MEK3 die p38 $\alpha$ - und p38 $\beta$ -Isoformen präferiert, die MEK6 aber keine Bevorzugung zeigt (Enslin et al., 1998). Die physiologische Bedeutung dieser Tatsache ist aber bis zum jetzigen Zeitpunkt noch unklar (Pearson et al., 2001).

Ähnlich wie auch der ERK1/2-Signalweg wird p38 in T-Zellen über den TCR aktiviert (Abb. 1.18). Zusätzlich wird aber noch eine, durch den CD28-Rezeptor vermittelte, Kostimulation mit in die Signalkette integriert. Das G-Protein rac stellt den Treffpunkt beider Signalwege dar. Obwohl man annimmt, daß MEK3 und MEK6 neben der MLK3 auch durch die MEKK 4 phosphoryliert werden kann, steht für Letztere ein eindeutiger Beweis noch aus (Gerwins et al., 1997). Die MLK3 scheint aber das Verbindungsglied signalaufwärts zu rac zu sein. Typische Substrate der p38-Kinasen sind c-jun, ATF-2, Elk1, MEF2 und die MAPKAP-Kinase 2 (Bernal-Mizrachi et al., 2001; Ben-Levy et al., 1998). Beide MKK phosphorylieren *in vitro* aber auch JNK-Isoformen, was für eine breitere Substratspezifität gegenüber den anderen MKK spricht.

Aus Leber-Extrakten wurde ein Protein isoliert, das in der Lage war, MBP zu phosphorylieren. Es konnte aber keiner bis dahin bekannten Kinase-Familie zugeordnet werden. Weiterführende Untersuchungen zeigten, daß es einen Vertreter einer neuen Kinase-Familie - den JNK - darstellt (Kyriakis und Avruch, 1990). Die Familie der c-jun-N-terminalen Kinasen (JNK) umfaßt nur drei Mitglieder: JNK1, JNK2 und JNK3. Diese werden auch als SAPK $\gamma$ , SAPK $\alpha$  und SAPK $\beta$  (Stress-aktivierete Proteinkinasen) bezeichnet und bilden durch differentielles *Splicing* noch zahlreiche Isoformen. Auch diese MAPK benötigen zu ihrer Aktivierung eine duale Phosphorylierung, wobei sich das Motiv -Thr-Pro-Tyr- von den Aktivierungssequenzen der ERK1/2 und p38 unterscheidet (Kyriakis et al., 1994; Derijard et al., 1994; Gupta et al., 1996).

Die JNK-Signalkaskade wird aktiviert durch Zytokine, Liganden von GPCR, Serum, Wachstumsfaktoren, transformierende Agenzien, viele Arten von Stress und Reagenzien, welche die DNA oder Proteinbiosynthese beeinflussen (Zhu et al., 1998b; Derijard et al., 1994; Adler et al., 1995). Die Aktivierung der JNK/SAPK-Signalkaskade (Abb. 1.19) erfolgt in T-Lymphozyten ebenfalls über den TCR und die ras/raf-Kaskade. Der JNK-Signalweg wird zusätzlich über CD28 und nachfolgend über rac/cdc42 kostimuliert (Avraham et al., 1998). Die Signalweiterleitung wird durch die MEKK1 vermittelt. Es gibt aber in letzter Zeit vermehrt Hinweise darauf, daß die Signaleinkopplung auch über die MEKK2 bzw. MEKK3 und MEKK4 oder die MLK erfolgen kann (Su et al., 2001; Cheng et al., 2000; Xia et al., 1998; Wang, Xhsn et al., 1998).

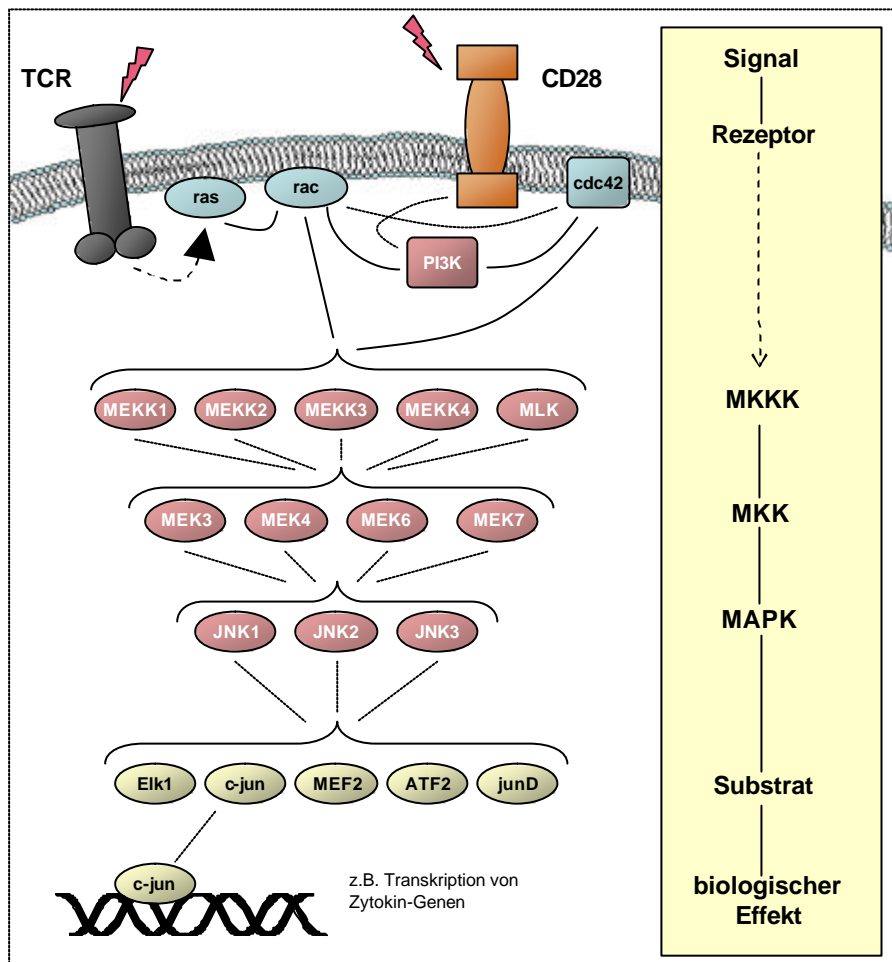


Abb. 1.19: **Aktivierung des JNK/SAPK-Signalweges in T-Lymphozyten.**

Nach Stimulation des TCR wird das G-Protein ras aktiviert. Die Signalweiterleitung erfolgt über die Ser/Thr-Kinase raf zur MEKK1, die MEK4 und MEK7 aktiviert. Es sind aber auch zahlreiche andere MKKK und MKK beschrieben, die den JNK/SAPK-Signalweg genauso aktivieren können. Die dadurch aktivierten JNK/SAPK-MAPK sind dann in der Lage ihre Substrate zu phosphorylieren. Auf der rechten Seite der Grafik ist der Informationsfluß vom Stimulus über die MAPK-Kaskade zum Substrat dargestellt.

Ob die letztgenannten MKKK ebenso wie die MEKK1, nachfolgend die MEK4 und MEK7 phosphorylieren können, ist noch unklar. Das Proto-Onkogen c-jun und junD, aber auch Elk1, MEF2 und ATF2 sind die typischen Substrate der JNK/SAPK-Kinasen (Choe und McGinty, 2000; Morooka et al., 1995).

Die MAPK-Signalwege sind mit den, in den vorherigen Abschnitten bereits erläuterten Signalwegen, auf vielen Ebenen verbunden. So ist das Protein CIKS bekannt, das vermutlich ein Verbindungsglied zwischen der NFκB-inhibierenden Kinase IKK (IκB-Kinase) und dem JNK-Signalweg darstellt, wodurch dieser die NFκB-Aktivierung beeinflussen könnte (Leonardi et al., 2000). Außerdem wurde beobachtet, daß die Überexpression von ERK1 in Jurkat-Zellen zu einer 2- bis 4fachen Verstärkung der DNA-Bindung der Transkriptionsfaktoren AP-1, NFAT und NFκB führt (Park und Levitt, 1993). Für JNK1 ist mehrfach die Mit-

wirkung bei dem Export von NFATc3 aus dem Nukleus beschrieben worden (Chow et al., 1997). So kann JNK außerdem Reste der CaN-Kontaktregion der NFAT phosphorylieren, so daß der Transkriptionsfaktor nicht mehr gebunden und dephosphoryliert werden kann (Chow et al., 2000). Eine andere MAPK - die p38 - kann, wie GOMEZ DEL ARCO et al. in Hela-Zellen zeigen konnten, NFATc2 *in vivo* binden und *in vitro* phosphorylieren (Gomez del Arco et al., 2000). Aber CaN ist als Proteinphosphatase auch in der Lage, die Aktivierung von MAPK-Signalwegen, wie JNK und p38 in Kardiomyozyten, zu beeinflussen (De Windt et al., 2000) oder direkt den Phosphorylierungsgrad von p38, durch die Erhöhung der Expression einer MAPK-Phosphatase, zu senken (Lim et al., 2001b). CaN wirkt außerdem mit der PKC  $\delta$  synergistisch bei der Aktivierung des JNK-Signalweges und der IL-2-Expression in T-Zellen. Dabei scheint dieser negativ regulatorische Effekt spezifisch für Lymphozyten zu sein, da er in Hela-Zellen nicht nachgewiesen werden konnte (Werlen et al., 1998). Es werden aber nicht nur die MAPK-Kaskaden, sondern auch die Substrate der MAPK durch CaN beeinflusst. So wird der reziprok regulierte und durch Mitglieder aller drei MAPK-Familien phosphorylierte Transkriptionsfaktor Elk1 durch CaN dephosphoryliert, was zu einer Verminderung seiner transkriptionellen Aktivität führt (Tian und Karin, 1999).

### 1.3.5.5 Regulation des Immunstatus

Wie aktiv einzelne Signalwege zu bestimmten Zeitpunkten für eine (supprimierte) Immunantwort und Anergie sein müssen, ist bislang noch nicht detailliert geklärt. Unter Anergie versteht man einen Zustand von Zellen des Immunsystems, der durch eine reversible Hyposensitivität gegenüber physiologischen Stimuli gekennzeichnet ist. Wie bereits beschrieben, ist der  $\text{Ca}^{2+}$ /CaN-Signalweg direkt oder indirekt in zahlreiche lymphozytäre Signalkaskaden eingebunden. Da intrazellulär der Calcium-Spiegel die Phosphatase-Aktivität des CaN triggert, wurden Versuche unternommen, die Aktivität von Kinasen und Transkriptionsfaktoren mit der Calcium-Konzentration zu korrelieren. Dabei stellte sich heraus, daß schon eine geringfügige Erhöhung der intrazellulären Calcium-Konzentration ausreicht, um eine vollständige Aktivierung von NFAT zu bewirken, während  $\text{NF}\kappa\text{B}$  und die JNK erst bei höheren Calcium-Konzentrationen aktiviert werden. Neben der Amplitude ist auch die Dauer der  $\text{Ca}^{2+}$ -Oszillationen entscheidend, wie aktiv ein Signalweg zu einem bestimmten Zeitpunkt ist (Noble et al., 2000). Neuere Untersuchungen geben Anlaß zu der Vermutung, daß CaN in T-Zellen als molekularer Schalter zwischen den drei immunologischen Zuständen: Aktivierung, Toleranz und Immunsuppression fungieren kann (Glynne et al., 2000). Somit beeinflussen CaN-inhibierende Substanzen verschiedene Signalwege, wodurch der Immunstatus moduliert werden kann.



## 2 Zielstellung der Arbeit

Die Zahl der Krankheitsfälle, bei denen pathologische Veränderungen des Immunsystems, wie z.B. Allergien oder Autoimmunerkrankungen diagnostiziert werden, steigt stetig an. Aber auch die Transplantationsmedizin ist trotz großer technischer Fortschritte auf eine medikamentös induzierte Immunsuppression angewiesen. Deshalb ist es sehr wichtig, daß Medikamente zur Verfügung stehen, die sehr effizient und nebenwirkungsarm in die Immunantwort eingreifen können. Seit den 80er Jahren des letzten Jahrhunderts wird der Naturstoff CsA und später auch FK506 klinisch eingesetzt, um Transplantat-Abstoßungsreaktionen erfolgreich zu verhindern. Jedoch treten bei einer Langzeitmedikation zahlreiche schwere Nebenwirkungen auf, die auf das Vorhandensein multipler Targets für CsA und FK506 zurückzuführen sind. Deshalb wurden in den letzten Jahren intensive Anstrengungen unternommen, neue Leitstrukturen für Immunsuppressiva zu definieren. Mit besonders großem Aufwand wurde die Entwicklung neuer CaN-Inhibitoren vorangetrieben.

In dieser Arbeit sollten CaN-Inhibitoren entwickelt und geprüft werden, die monospezifisch für CaN sind und die PPLase-Aktivität von Cyclophilinen und FKBP nicht tangieren.

In einer Substanz-Bank wurden 2000 Substanzen auf eine mögliche CaN-Inhibition untersucht. Der Naturstoff Gossypol wurde dabei als eine CaN-inhibierende Substanz identifiziert. Im Rahmen dieser Arbeit sollte das Gossypol weiterführend enzymkinetisch charakterisiert werden. Neben den *in vitro*-Untersuchungen sollte geprüft werden, ob diese Verbindung auch *in vivo* die CaN-Aktivität verändern kann.

Zusätzlich sollten auf rationaler Grundlage modifizierte Cyclosporin-Derivate enzymkinetisch und zellbiologisch untersucht werden. In diesem Zusammenhang sollte außerdem getestet werden, ob die verwendeten Substanzen die Aktivierung der für Proliferation und Differenzierung wichtigen Transkriptionsfaktoren NFAT, NF $\kappa$ B und AP-1 bzw. der MAP-Kinase-Signalwege in humanen T-Lymphozyten unterschiedlich beeinflussen können.

Mit diesen Substanzen sollte zudem der Versuch unternommen werden, biologische Effekte abzugrenzen, die durch CaN-Inhibitoren hervorgerufen werden, aber ausschließlich auf einer Inhibition der PPLase-Aktivität von Cyclophilinen beruhen.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Laborchemikalien

Alle verwendeten Laborchemikalien hatten den Reinheitsgrad „*pro analysi*“ (p.a.) und wurden, soweit nicht anders angegeben, von der Firma Merck (Darmstadt, Deutschland) bezogen.

<u>Chemikalie</u>	<u>Firma</u>
Affigel-10	Bio-Rad
Agar	AppliChem
Agarose	GIBCO BRL
Ammoniummolybdat	Sigma
Ampizillin	Sigma
Biotin-X-NHS	Calbiochem
Borsäure	Fluka
Bromphenolblau	Serva
Complete™ -Proteaseinhibitor-Mix	Roche
Coomassie Brilliant Blue G 250	Serva
Coomassie Brilliant Blue R 250	Serva
dNTP	Biomol
DTT	Sigma
EDTA	Sigma
EGTA	Sigma
Ethanol	Fluka
Ethidiumbromid	Roth
Ficoll-Paque Plus	Amersham Pharmacia Biotech
FK506	Fujisawa
Hefeextrakt	GIBCO BRL
Kanamycin	Sigma
Magermilch-Pulver	Milbona
Mangan(II)-chlorid	Sigma
MTT	Sigma

---

NP-40	Fluka
Nukleofektionslösung	Amaxa
oNPG	Sigma
Pepton	GIBCO BRL
pNPP	Sigma
Poly[dl/dC]	Roche
Ponceau S	Sigma
RNase A	Sigma
Rotiphorese 30	Roth
Rubidiumchlorid	Sigma
SDS	AppliChem
$\beta$ -Mercaptoethanol	Serva
TCA	Fluka
TCEP	Fluka
Tween 20	Sigma

### 3.1.2 Radiochemikalien

ATP $\gamma$ - <sup>33</sup> P (3000 Ci/mmol, 10 mCi/ml, stabil.)	ICN
ATP $\gamma$ - <sup>32</sup> P (4500 Ci/mmol, 10 mCi/ml, stabil.)	ICN

### 3.1.3 Calcineurin-Inhibitoren

#### 3.1.3.1 Gossypol und -Derivate

( $\pm$ ) Gossypol	Sigma
( $\pm$ ) Gossypolon	Sigma
( $\pm$ ) Apogossypol hexaazetat	Sigma

#### 3.1.3.2 Cyclosporin und -Derivate

Cyclosporin A und alle Cyclosporin A- und Cyclosporin H-Derivate wurden mir von Dr. Y. Zhang (MPG, Halle) zur Verfügung gestellt.

### 3.1.4 Enzyme und Substrate

$\alpha$ -Chymotrypsin	Merck
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs / Roche

---

DeepVent™ DNA-Polymerase	New England Biolabs
T4-Ligase	New England Biolabs
T4-Polynukleotid-Kinase	New England Biolabs
Alkalische Phosphatase (Kälberdarm)	Roche
PP1	Calbiochem
PP2C	Biomol
Phosphorylase b	Sigma
Phosphorylase-Kinase	Sigma
PKA	New England Biolabs

Die PPIasen hCyp18, hFKBP12 und hPar18 wurden mir von den folgenden Mitarbeitern unserer Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt: J. Fanghänel, Dr. J. Rahfeld und Dr. B. Hernandez-Alvarez. Ebenso überließ mir Dr. A. Werner die porcine PP2A der Zusammensetzung  $C_{\alpha}/C_{\beta}A_{\alpha}B_{\alpha}$ .

### 3.1.5 Antikörper

anti-IgG Kaninchen Antikörper (Peroxidase-Konjugat)	Sigma
anti-IgG Maus Antikörper (Peroxidase-Konjugat)	Sigma
anti-NFATc1	Santa Cruz
anti-phospho-ERK1/2	Santa Cruz
anti-phospho-p38	New England Biolabs
anti-phospho-JNK	Santa Cruz
humanes IgG	Behring Werke
anti-CD4-MicroBeads (multisort)	Miltenyi Biotech
anti-CD8-MicroBeads (multisort)	Miltenyi Biotech

Ein polyklonaler anti-CaN-Antikörper wurde - ebenso wie ein anti-Cyp18-Antikörper - nach subkutaner Applikation des HPLC-gereinigten Proteins als Antigen in Kaninchen durch die Firma pab production (Hebertshausen, Deutschland) hergestellt.

### 3.1.6 Standards

1 kb-DNA-Standard	New England Biolabs
Blot-Marker (gefärbt)	Invitrogen
Protein-Mixtur 4+5	Serva

### 3.1.7 Plasmide und Oligonukleotide

#### 3.1.7.1 Plasmide

pEGFP-C1	Clontech
pGEX-5T1	Amersham Pharmacia Biotech
hCaNA $\alpha$ B in pET15b	J.O. Liu (Universität, Baltimore)
hCyp18 in pUC18	T. Tradler (MPG, Halle)

#### 3.1.7.2 Oligonukleotide

Die Synthese der HPLC-gereinigten Oligodesoxyribonukleotide erfolgte durch die Firma MWG Biotech.

##### 3.1.7.2.1 DNA-Sequenzen für PCR

###### hCyp18 in pGEX-5T1:

PCR-Primer A1	5'-GATCGAGGATCCTGGTCAACCCACCGTGTTTC-3'
PCR-Primer A2	5'-TCGATCCTCGAGTTATTCGAGTTGTCCACAGTCAG-3'

##### 3.1.7.2.2 DNA-Sequenzen für EMSA

###### NFAT:

Oligonukleotid C1:	5'-GGAGGAAAACTGTTTCATACAGAAGGCGTT-3'
Oligonukleotid C2:	5'-AACGCCTTCTGTATGAAACAGTTTTTCCTCC-3'

###### AP-1:

Oligonukleotid D1:	5'-GGTTGCTGACTAATTGAGATG-3'
Oligonukleotid D2:	5'-CATCTCAATTAGTCAGCAACC-3'

###### NF $\kappa$ B p65:

Oligonukleotid E1:	5'-AGCTTGGGGTATTTCCAGCCG-3'
Oligonukleotid E2:	5'-CGGCTGGAAATACCCCAAGCT-3'

### 3.1.8 Bakterienstämme

DH5 $\alpha$	supE44 DlacU169 (f80 lacZDM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi relA1 (Hanahan, 1983)
BL21(DE3)	hsdS <sub>B</sub> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) gal dcm ( $\lambda$ clts857 ind1 Sam7 nin5 lacUV5-T7 gene1) (Studier und Moffatt, 1986)
JM110	F' traD36 lac <sup>f</sup> $\Delta$ (lacZ)M15 proA <sup>+</sup> B <sup>+</sup> /rpsL (Str <sup>r</sup> ) thr leu thi lacY galK galT ara fhuA dam dcm glnV44 $\Delta$ (lac-proAB) (Yanisch-Perron et al., 1985)

### 3.1.9 Medien für Kultivierung von *Escherichia coli*

<u>LB-Medium:</u>	10 g/l Pepton	<u>2YT-Medium:</u>	16 g/l Pepton
(pH 7.5)	5 g/l Hefeextrakt	(pH 7.5)	10 g/l Hefeextrakt
	5 g/l NaCl		5 g/l NaCl

Für Kulturplatten wurden dem LB-Medium 15 g/l Agar zugesetzt. Antibiotika, als sterilfiltrierte Lösungen, wurden dem auf 50°C abgekühlten Medium nach Bedarf, bis zu einer Endkonzentration von 100  $\mu$ g Ampizillin/ml bzw. 25  $\mu$ g Kanamycin/ml zugesetzt.

### 3.1.10 Biologisches Material und Zellkultur

#### 3.1.10.1 Primärzellen

Das für die Präparation von PBMC verwendete Blut wurde gesunden Personen entnommen und uns vom Institut für Transfusionsmedizin (Universität Halle) nach Abtrennung eines großen Teils der Erythrozyten als „buffy coat“ zu experimentellen Zwecken überlassen. Die Aufarbeitung der „buffy coat“-Schichten erfolgte stets am Tag der Blutabnahme.

#### 3.1.10.2 Chemikalien/Medien für Zellkultur

RPMI 1640	GIBCO BRL
Penizillin/Streptomycin	GIBCO BRL
Kälberserum (foetal)	Biochrom
Glutamax <sup>TM</sup>	GIBCO BRL
Dulbecco's PBS	Biochrom
Ficoll-Paque <sup>®</sup> plus	Amersham Pharmacia Biotech

### 3.1.11 Kits

ECL western blotting analysis system	Amersham
Pathdetect <i>cis</i> -reporting system NFAT	Stratagene
Pathdetect <i>cis</i> -reporting system NF $\kappa$ B	Stratagene
Pathdetect <i>cis</i> -reporting system AP-1	Stratagene
Luciferase Assay System	Promega
QIAquick spin Nukleotide-Removal Kit	Qiagen
QIAquick PCR-Purification Kit	Qiagen
QIAprep spin Plasmid Mini-Kit	Qiagen
EndoFree <sup>®</sup> Plasmid Maxi-Kit	Qiagen
QIAEX II-Gelextraktionskit	Qiagen
pSTBlue-1 Cloning Kit	Novagen

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Enzymkinetische und Proteinchemische Methoden

#### 3.2.1.1 Reinigung von Calcineurin

Die Reinigung des humanen heterodimeren CaN-Komplexes erfolgte nach Überexpression in BL21(DE3) nach einer unmodifizierten Präparationsvorschrift von LIU et al. (Mondragon et al., 1997). Mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung wurde die Aufreinigung des Proteins verfolgt und die CaN-Banden im Gel mit einem anti-CaN-Antikörper im Western Blot eindeutig zugeordnet. Simultan dazu wurde die Phosphatase-Aktivität der einzelnen Fraktionen im pNPP- und RII-Phosphopeptid-Assay gemessen.

#### 3.2.1.2 SDS-Gelelektrophorese

Die Durchführung der SDS-PAGE erfolgte nach LAEMMLI bei einer Stromstärke von 15 mA (Sammelgel) bzw. 30 mA (Trenngel) (Laemmli, 1970). Es wurden 12.5 bis 17.5 %ige Polyacrylamid-Gele verwendet. Zur Ermittlung des Molekulargewichts der aufgetrennten Proteine wurde ein Gemisch aus folgenden Markerproteinen verwendet:

---

Trypsin-Inhibitor aus Rinderlunge	6.5 kDa
Cytochrom C	12.5 kDa
Trypsin-Inhibitor aus Soja-Bohne	21.0 kDa
Carboanhydrase	29.0 kDa
Albumin aus Hühnerei	45.0 kDa
Rinderserumalbumin	67.0 kDa
Phosphorylase $\beta$	92.5 kDa

Die SDS-Gelelektrophorese wurde so lange fortgesetzt, bis die Farbstoff-Front vollständig aus der Gel-Matrix migriert war.

### 3.2.1.3 Coomassie-Färbung

Das jeweilige Polyacrylamid-Gel wurde über Nacht in einer Färbelösung folgender Zusammensetzung geschüttelt:

2,0 g	Coomassie Brilliant Blue R 250
0.5 g	Coomassie Brilliant Blue G 250
425 ml	Ethanol
50 ml	Methanol
100 ml	Essigsäure
425 ml	H <sub>2</sub> O

Nach der Färbung wurde das Gel zunächst noch zweimal mit bidest. Wasser gewaschen und anschließend in einer Lösung aus 45 % Ethanol, 10 % Essigsäure und 45 % bidest. Wasser bis zur Sichtbarkeit der Banden entfärbt.

### 3.2.1.4 Proteinbestimmung nach BRADFORD

Die Proteinbestimmung nach BRADFORD erfolgte mit bovinem Serumalbumin als Proteinstandard (Bradford, 1976). Nach 5 min Inkubation wurde der entstandene blaue Farbkomplex bei 595 nm spektrophotometrisch detektiert. Dabei kam ein Mikrotiterplatten-Spektrometer MR7000 (Dynatech, Chantilly, USA) zum Einsatz. Es wurde stets sichergestellt, daß die Proben frei von Detergenzien waren, da diese die Messung stören können.





Im Folgenden wurde der spezifische 1. Antikörper (Titer 1:200 bis 1:1000) hinzugefügt und für 1-16 h bei 4°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der Blot-Membran mit TBT für je 5 min wurde diese mit dem 2. Antikörper (Titer 1:1000 bis 1:5000) für 1 h bei 22°C inkubiert und nachfolgend wieder sorgfältig mit TBT-Puffer gewaschen (3 x 5 min). Für die Detektion der Protein-Banden wurde das Chemilumineszenz-Kit (ECL) der Firma Amersham Pharmacia Biotech in Verbindung mit lichtempfindlichem Film-Material verwendet.

### 3.2.1.7 Messung der PPlase-Aktivität

Der Chymotrypsin-gekoppelte PPlase-Test nach FISCHER et al. (1984) basiert auf der isomerspezifischen Proteolyse eines Oligopeptid-Substrats (Fischer et al., 1984a; Fischer et al., 1984b). Dabei kann die *cis*®*trans*-Isomerisierung der X<sub>aa</sub>-Pro-Bindung im Substrat über die Abspaltung des chromophoren p-Nitroanilins verfolgt werden. Die Isomerisierung wird geschwindigkeitsbestimmend, wenn die Geschwindigkeit der Hydrolyse durch einen Überschuß an Chymotrypsin sehr viel höher ist, als die der *cis*®*trans*-Isomerisierung. Die meisten Messungen erfolgten bei 10°C in einem Microtiterplattenreader der Firma Dynatech (Chantilly, USA) vom Typ MR7000. Bei 390 nm konnte die Abspaltung des gelben p-Nitroanilins aus dem Substrat spektrophotometrisch verfolgt werden. Eine Messung umfaßte 70 Meßpunkte, die in einem Abstand von 3 s aufgenommen wurden. Nach der Anpassung der erhaltenen Kurven an eine Reaktion 1.Ordnung mit Hilfe eines Programmes von Dr. G. Küllertz (MPG Halle) erfolgte die Auswertung.

<u>Typischer Meßansatz pro Kavität:</u>	17.5 µg	Suc-Ala-Phe-Pro-Phe-pNA
	20 µl	Probe (bzw. Probenverdünnung)
	50 µl	35 mM HEPES (pH 7.8) mit 0.1 % (w/v) BSA
Start mit	80 µl	α-Chymotrypsin-Lösung (1 mg/ml in 35 mM HEPES pH 7.8)

Die Konzentration an PPlase wurde so gewählt, daß  $k_{\text{obs}}$  der *cis*®*trans*-Isomerisierung nicht größer als  $0.01 \text{ s}^{-1}$  war und sich damit noch im „Meßfenster“ des Assays befand. Der Chymotrypsin-gekoppelte PPlase- Test nach FISCHER et al. wurde auch in der Küvette durchgeführt. Dann wurde stets bei 10°C in einem UV/VIS-Spektrophotometer des Typs HP 8452A mit temperierbarem Küvettenhalter gemessen. Neben 390 nm wurde auch die Absorption bei 510 nm (Referenzwellenlänge) detektiert. Absolut notwendig war die Verwendung eines Rührers, um Mischungsartefakte zu eliminieren.

Die Differenz beider Wellenlängen wurde zur Auswertung der Progressionskurven herangezogen. Zur Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten wurde ein Programm von Dr. S. Panzner ( MPG Halle, 1991) verwendet.

<u>Typischer Meßansatz:</u>	3 µl	α-Chymotrypsin-Lösung (1 mg/ml in 35 mM HEPES pH 7.8)
	3 µl	Probe (bzw. Probenverdünnung)
	1200 µl	35 mM HEPES (pH 7.8 )
Start mit	3.5 µl	Suc-Ala-Phe-Pro-Phe-pNA (5 mg/ml DMSO)

### 3.2.1.8 Präparation des RII-Phosphopeptids

Ein *N*-terminal biotinyliertes und unbiotinyliertes 19mer-Peptid, dessen Sequenz identisch ist mit einem Fragment der RII-Untereinheit der bovinen PKA (DLDVPIIPGRFDRRVSVAAE-OH), wurde entsprechend einem modifizierten Protokoll von ENZ et al. phosphoryliert (Enz et al., 1994). Der Reaktionsansatz enthielt folgende Komponenten:

<u>RII-Peptid-Phosphorylierungsansatz:</u>	700 µM	Peptid
	50 mM	Tris/HCl (pH 7.5)
	10 mM	MgCl <sub>2</sub>
	200 µM	ATP
	100 µCi	ATP γ- <sup>33</sup> P
	12.5 kU	PKA

und wurde 2 h bei 30°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Das Peptid wurde von der nicht-inkorporierten Radioaktivität in einem chromatografischen Schritt abgetrennt. Dabei wurde eine RP-C2 clean-up Extraktionssäule (Amchro, Sulzbach, Deutschland) verwendet, die vorher sequentiell mit Methanol, 70 % (v/v) Acetonitril und Wasser gespült worden war. Nach dem Waschen der Säule mit 5 Säulenvolumina Wasser erfolgte die Elution des gebundenen Peptids mit 500 µl 70 % (v/v) Acetonitril in Wasser. Das Eluat wurde in 5 Teile aliquotiert und das Lösungsmittel/Wasser-Gemisch im Vakuum entfernt. Zur Resolubilisierung des lyophilisierten Peptids wurden 100 µl des RII-Phosphopeptid-Assay-Puffers hinzugefügt:

---

<u>RII-Phosphopeptid-Assay-Puffer:</u>	40 mM	Tris/HCl (pH 7.5)
	100 mM	NaCl
	6 mM	MgCl <sub>2</sub>
	1 mM	CaCl <sub>2</sub>
	500 µM	TCEP
	100 µg/ml	BSA

Der Phosphorylierungsgrad des Peptids betrug durchschnittlich 24 %, wobei die Biotinylierung keinen Einfluß auf die Phosphorylierung oder Dephosphorylierung des Substrates hatte.

### 3.2.1.9 Phosphatase-Aktivitätsmessung mit pNPP-Substrat

Zur Bestimmung der Phosphatase-Aktivität einer Probe wurden zu 1 µl bis 20 µl Probe 100 µl der folgenden pNPP-Reagenz-Lösung zugefügt und dadurch die Dephosphorylierung gestartet.

<u>pNPP-Reagenz-Lösung:</u>	50 mM	Tris/HCl (pH 7.5)
	1 mM	CaCl <sub>2</sub>
	10 mM	MgCl <sub>2</sub>
	10 mM	pNPP als Na-Salz
	1 mM	DTT
	100 µg/ml	BSA
	500 µM	TCEP

Durch die Phosphatase-katalysierte Abspaltung des Phosphat-Restes von pNPP entsteht das chromophore p-Nitrophenolat-Ion. Die Akkumulation des Reaktionsproduktes p-Nitrophenol im Reaktionsansatz kann aufgrund seiner intensiven gelben Färbung bei 390 nm spektrophotometrisch detektiert werden. Da die Reaktion in einer Mikrotiterplatte ablief, wurde als Meßgerät ein MR7000 der Firma Dynatec verwendet. Die Anfangsanstiege der Reaktionen bei RT wurden mit Hilfe eines Programmes von Dr. G. Küllertz (MPG, Halle) mittels linearer Regression bestimmt.

### 3.2.1.10 Phosphatase-Aktivitätsmessung mit Peptid-Substrat

Um die Phosphatase-Aktivität gegenüber dem RII-Phosphopeptid zu messen, wurden 1.3 nM bis 2 nM CaN oder ein entsprechendes Probenvolumen und 50 nM Calmodulin in Assay-Puffer mit 10 pmol des radioaktiv markierten RII-Phosphopeptids in einem Reaktionsvolumen von 100 µl für 30 min bei 30°C inkubiert. Die Isolierung des biotinylierten Substrates aus dem Reaktionsgemisch erfolgte über die hochaffine Biotin/Streptavidin-Wechselwirkung. Dazu wurden 90 µl des Ansatzes in eine Streptavidin-beschichtete 96 well-Szintillationsmikrotiterplatte (Costar, Bodenheim, Deutschland) überführt und erneut für 20 min bei 22°C inkubiert.

Das Szintillationsprinzip wurde bereits von SULLIVAN et al. und NAKAYAMA et al. angewandt, um CaN-Aktivitäten zu bestimmen (Sullivan et al., 1997; Nakayama et al., 1998). Die nach Dephosphorylierung noch im RII-Phosphopeptid inkorporierte Radioaktivität wurde mit einem MicroBeta Top-Counter der Firma Wallac (Wallac, Turku, Finnland) quantifiziert.

Für die Bestimmung des Hemmtyps und des  $K_i$ -Wertes nach DIXON wurde ein Gemisch aus biotinyliertem und [ $^{33}\text{P}$ ]-markiertem RII-Phosphopeptid und nicht-biotinyliertem RII-Phosphopeptid in einem molaren Verhältnis von 1:200 eingesetzt. Der Meßansatz enthielt neben 0.66 nM CaN das RII-Phosphopeptid in einer absoluten Konzentration von 5 bis 15 µM, wie auch [DAT-Sar] $^3\text{CsA}$ -Konzentrationen von 0.25 bis 1.5 µM bzw. 5 bis 20 µM Gossypol. Das Enzym wurde stets 20 bis 30 min bei 22°C mit den Inhibitoren vorinkubiert.

### 3.2.1.11 Präparation der radioaktiv markierten Phosphoproteine

Für die Präparation von [ $^{33}\text{P}$ ]-markierter Phosphorylase a wurde ein Protokoll von KREBS et al. (Krebs et al., 1958) bzw. für Phospho-Casein von KHANDLWAL et al. (Khandelwal et al., 1976) verwendet. Demnach wurde die Phosphorylase b mit Phosphorylase-Kinase und das Casein mit PKA phosphoryliert. Alternativ dazu wurden die Proteine durch Biotinylierung mit äquimolaren Mengen des  $\text{NH}_2$ -reaktiven Biotin-X-NHS mit einem Biotin-Rest versehen, um die Bindung des Proteins an eine Streptavidin-Matrix zu ermöglichen. Die Reaktionsbedingungen dieser kovalenten Modifizierung waren 100 pmol Protein und 100 pmol Biotin-X-NHS in 150 µl 100 mM Natriumcarbonat pH 8.3 für 3 h bei 22°C. Das Abstoppen der Reaktion erfolgte durch Zugabe von 50 µl 1M Tris/HCl pH 7.5.

### 3.2.1.12 Phosphatase-Aktivitätsmessung gegenüber Protein-Substrat

Die Messung der Phosphatase-Aktivität erfolgte für die PP1 mit Phosphorylase a nach PELECH und COHEN (Pelech und Cohen, 1985) und für PP2A, PP2B (CaN) und PP2C mit Phospho-Casein nach WAELKENS et al. (Waelkens et al., 1984). Die Menge des abgespaltenen [<sup>33</sup>P]-markierten Phosphates wurde dabei nach Präzipitation des Gesamtproteins durch Zugabe von TCA bis zu einer Endkonzentration von 50 % TCA (m/v) durch Szintillationsmessung des Überstandes ermittelt.

### 3.2.1.13 Bestimmung der Luciferase-Aktivität

Nach Stimulation der Zellen wurden diese abzentrifugiert und das Pellet mit dem 5fachen Volumen Reporter-Gen-Assay-Puffer versetzt. Um die T-Zellen quantitativ zu lysieren, wurden zusätzlich Ultraschall-Impulse (3 x 5 s, 20 W) eingesetzt. Das Lysat wurde durch Zentrifugation (30 min, 16 000 g, 4°C) geklärt. Für die Messung der Luciferase-Aktivität wurden zu 20 µl des Lysates 100 µl Luciferase-Reagenz (Promega, Mannheim, Deutschland) hinzugefügt und unmittelbar danach in einem MicroBeta Top-Counter der Firma Wallac (Wallac, Turku, Finnland) für 10 s gemessen.

### 3.2.1.14 Bestimmung der β-Galaktosidase-Aktivität

In dem präparierten Lysat konnte neben der Luciferase-Aktivität auch β-Galaktosidase-Aktivität gemessen werden, da die Zellen zur Kontrolle mit einem konstitutiv β-Galaktosidase exprimierenden Plasmid kotransfiziert wurden (Edlund et al., 1985). Die Messung wurde gestartet, indem zu 5 bis 20 µl Zell-Lysat 100 µl der folgenden Lösung hinzugefügt wurde:

Reagenz:            290 µl oNPG-Lösung (4 mg/ml in 100 mM Natriumphosphat pH 7.5)  
                          10 µl Mg/SH-Lösung (100 mM MgCl<sub>2</sub>, 4.5 M β-Mercaptoethanol in H<sub>2</sub>O)  
                          100 mM Natriumphosphat pH 7.5 ad 1 ml

Die Hydrolyse des o-Nitrophenyl-β-galactopyranosids (oNPG) wurde als Zunahme der Extinktion bei 390 nm mit Hilfe des Mikrotiterplatten-Spektrophotometers MR7000 verfolgt und die Anfangsanstiege durch lineare Regression ermittelt.

### 3.2.1.15 Kopräzipitation von Calcineurin durch CsA und [DAT-Sar]<sup>3</sup>CsA

Für die Kopräzipitation von CaN in Anwesenheit von CsA und [DAT-Sar]<sup>3</sup>CsA wurden 25 µM GST-Cyp18 mit DMSO, 250 µM CsA oder 250 µM [DAT-Sar]<sup>3</sup>CsA für 30 min bei 22°C inkubiert. GST-Cyp18 und alle daran gebundenen Proteine wurden durch Zugabe von 50 µl Glutathion-Suspension präzipitiert. Nach 3fachem Waschen der Partikel mit RIPA-Puffer wurden diese durch Kochen in SDS-Probenpuffer eluiert. Die Eluate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine Nitrozellulose-Membran geblottet und mit anti-CaN- bzw. anti-Cyp18-Antikörpern analysiert.

### 3.2.1.16 Simultane Inhibition von Calcineurin durch mehrere Inhibitoren

Um zu prüfen, ob Gossypol an die gleiche Region des CaN bindet wie der CsA/Cyp18-Komplex, wurden mehrere kinetische Messungen durchgeführt. Ein vorinkubiertes Gemisch aus 1.3 nM CaN und 12 µM Gossypol wurde im Standard-Phosphatase-Test mit RII-Phosphopeptid unter Zusatz steigender Konzentrationen an Cyclophilin analysiert. Parallel dazu wurde ein Ansatz, der zusätzlich 10 µM CsA und ein weiterer Ansatz, der CsA, aber kein Gossypol enthielt, gemessen. Die Enzym-Aktivitäten wurden auf eine Kontrolle ohne Inhibitor berechnet. Ein analoges Vorgehen wurde auch bei der Bestimmung der Bindungsstelle von [DAT-Sar]<sup>3</sup>CsA an CaN eingesetzt, nur mit folgenden Veränderungen: 0.75 µM [DAT-Sar]<sup>3</sup>CsA, 1 µM FK506 und steigenden Konzentrationen an FKBP12 (0.5 bis 250 nM). Die theoretischen Kurven für verschiedene bzw. identische Bindungsstellen wurden nach einem Modell von KELETI simuliert (Keleti, 1986).

Für die Simulation einer Inhibitor-Bindung an zwei unterschiedliche Stellen (Abb. 3.1 B) am Protein wurde folgender Lösungsansatz verwendet:

$$[I_{Ges.}] = [I_1] + \frac{K_{i1}}{K_{i2}} \cdot [I_2] \quad \text{wobei } [I_2] = konst.$$

Im Diagramm wurde die  $[I_1]$  gegen die CaN-Restaktivität aufgetragen, wobei  $I_1$  der Inhibitor mit dem kleineren  $K_i$  darstellt. Die aufgetragene CaN-Restaktivität entsprach dabei nicht der Aktivität bei  $[I_1]$ , sondern bei  $[I_{Ges.}]$ . Die simulierte Kurve war im Vergleich zu den

Meßwerten um den Faktor  $\frac{K_{i1}}{K_{i2}} \cdot [I_2]$  auf der Abszisse verschoben.

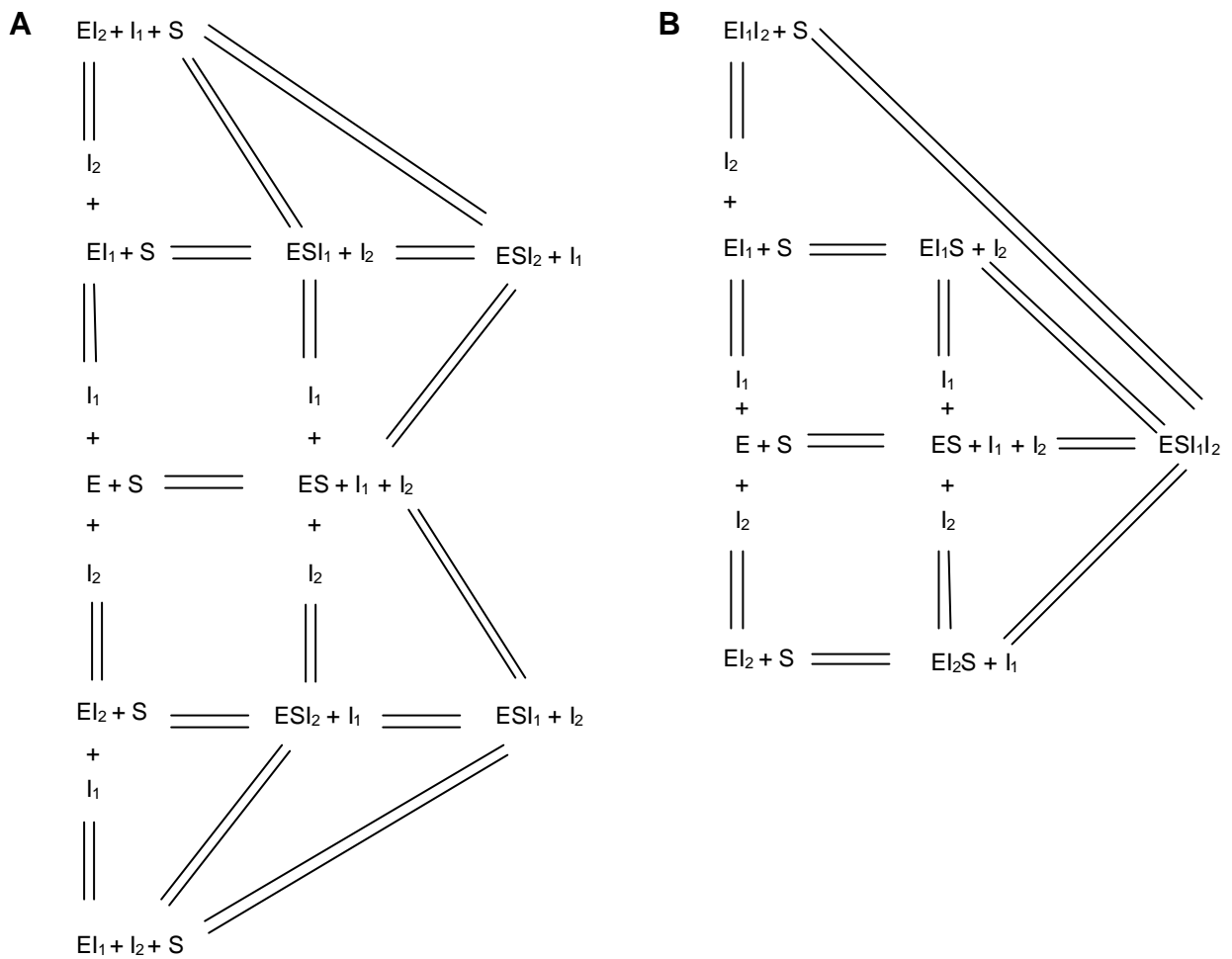


Abb. 3.1: **Simultane Inhibition eines Enzyms durch zwei reversible nicht-kompetitive Inhibitoren.** Schematische Darstellung einer simultanen Inhibition durch zwei Inhibitoren, wenn diese an eine identische Bindungsstelle (A) oder an unterschiedliche Bindungsstellen (B) des Enzyms binden.

Für die Simulation einer Inhibitor-Bindung an die gleiche Stelle am Protein (Abb. 3.1 A) wurde folgender vereinfachter Ansatz verwendet:

$$v_i = \frac{v}{\left[ 1 + \frac{K_m}{[S]} \cdot \left( 1 + \frac{[I_1]}{K_{EI_1}} + \frac{[I_2]}{K_{EI_2}} + \frac{[I_1][I_2]}{aK_{EI_2}K_{EI_1}} \right) \right]}$$

Graphische Auftragung von  $\frac{1}{v}$  gegen  $[I_1]$  bei verschiedenen  $[I_2]$

$$\frac{1}{v_i} = \frac{1}{v} + \left( \frac{K_m}{[S]v} \right) \cdot \left( 1 + \frac{[I_2]}{K_{EI_2}} \right) + \left( \frac{K_m}{[S]vK_{EI_1}} \right) \left( 1 + \frac{[I_2]}{aK_{EI_2}} \right) [I_1]$$



Wenn kein  $E_1 I_2$  gebildet wird, dann wird  $\alpha = \infty$  und der letzte Term fällt weg.

Dadurch wird der Anstieg der Geraden unabhängig von  $[I_2]$  und kann durch  $\left( \frac{K_m}{[S]vK_{E_1}} \right)$  ausgedrückt werden. Es entsteht eine Parallelschar, bei der die resultierende Gerade auf der Ordinate verschoben ist. Diese Verschiebung wird durch das Verhältnis  $\frac{[I_2]}{K_{E_2}}$  bestimmt.

Für die resultierende Gerade kann eine neue Geradengleichung aufgestellt werden. Durch Bildung des Kehrwertes der reziproken Reaktionsgeschwindigkeiten kann man einen Kurvenverlauf simulieren, der einer Bindung von zwei Inhibitoren an der selben Stelle im Protein entspricht.

### 3.2.1.17 Reversibilität der Calcineurin-Inhibition

Ein vorinkubiertes Gemisch aus 30  $\mu\text{M}$  Gossypol und 37.4 nM CaN in 300  $\mu\text{l}$  Assay-Puffer wurden in einer Nanosep10K-Dialyse-Zelle (PALL Filtron, Karlstein, Deutschland) gegen 7 x 300  $\mu\text{l}$  Assay-Puffer dialysiert. Zusätzlich wurde eine Probe ohne Inhibitor mitgeführt. Aus den Retentaten wurden je 10  $\mu\text{l}$  entnommen und unter Zusatz von 50 nM Calmodulin im Standard-Phosphatase-Test mit RII-Phosphopeptid auf Enzym-Aktivität untersucht. Analog dazu wurden 50  $\mu\text{M}$  [DAT-Sar]<sup>3</sup>CsA mit 13.2 nM CaN und 50 nM Calmodulin in Assay-Puffer vorinkubiert. Nach Dialyse in einer Nanosep 3K-Dialyse-Zelle wurden die CaN-Aktivitäten, sowohl der [DAT-Sar]<sup>3</sup>CsA-haltigen Probe als auch der gleich behandelten Kontrolle (ohne [DAT-Sar]<sup>3</sup>CsA), im Standard-Phosphatase-Test mit RII-Phosphopeptid bestimmt.

### 3.2.1.18 Konkurrenz von [DAT-Sar]<sup>3</sup>CsA durch Cyclophilin

Um zu zeigen, daß Cyclophilin mit CaN um die Bindung von [DAT-Sar]<sup>3</sup>CsA kompetitiert, wurden 1.32 nM CaN mit 10  $\mu\text{M}$  [DAT-Sar]<sup>3</sup>CsA für 20 min bei 22°C vorinkubiert. Nach Zugabe von steigenden Konzentrationen an Cyp18 (10 nM bis 10  $\mu\text{M}$ ) wurde die Phosphatase-Aktivität im Reaktionsansatz gegenüber RII-Phosphopeptid gemessen.

### 3.2.1.19 **Kompetition von Calcineurin durch Gossypol**

Für die Präparation einer CsA/Cyp18-Affinitätsmatrix wurden 500 µg Cyp18 kovalent auf 250 mg Affi-Gel 10 (Biorad, München, Deutschland) nach Angaben des Herstellers immobilisiert. Noch verbleibende reaktive Gruppen wurden mit 1M Tris/HCl pH. 7.5 blockiert. Anschließend wurde die Säule mit 300 nmol CsA für 1h inkubiert, um einen CsA/Cyp18-Komplex zu formieren. Vor und nach der Bindung von 400 pmol CaN wurde die Matrix mit 5 x 10 Säulenvolumen an PBS gewaschen. Es wurde versucht, das im ternären Komplex gebundene CaN durch 10-minütige Inkubation mit 100 µM Apogossypol hexaazetat, 100 µM Gossypol und 15 µM CsA/Cyp18-Komplex (äquimolare Teile) zu eluieren. Die Eluate wurden mittels Western Blot und einem anti-CaN-Ab in Verbindung mit einem sekundären Antikörper analysiert.

## 3.2.2 Molekularbiologische Methoden

### 3.2.2.1 Herstellung chemisch-kompetenter *E. coli*

<u>Medium A:</u>	20 g/l Pepton	<u>Lösung B:</u>	100 mM RbCl <sub>2</sub>
(pH 7.6)	5 g/l Hefeextrakt	(pH 5.8)	50 mM MnCl <sub>2</sub>
	30 mM MgSO <sub>4</sub>		30 mM Kaliumazetat
	10 mM KCl		10 mM CaCl <sub>2</sub>
 <u>Lösung C :</u>	75 mM CaCl <sub>2</sub>		
(pH 7.0)	10 mM RbCl <sub>2</sub>		
	15 % (v/v) Glycerin		

30 ml Medium A wurden mit 1.5 ml einer Übernachtskultur des entsprechenden *E. coli*-Bakterienstammes angeimpft und bis zu einer Bakteriendichte von OD<sub>600 nm</sub> = 0.5 wachsen gelassen. Nach einer 15-minütigen Inkubation auf Eis wurden die Zellen durch Zentrifugation (5 min, 2100 x g, 4°C) sedimentiert.

Einer weiteren 2-stündigen Inkubation auf Eis folgte die Resuspendierung des Pellets in Lösung B. Anschließend wurden die Bakterienzellen erneut abzentrifugiert und in 1 ml Lösung C aufgenommen. Aliquots von je 100 µl wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

### 3.2.2.2 Transformation von *E. coli*

Zur Transformation wurden nach dem Auftauen der chemisch-kompetenten Bakterien-Zellen auf Eis 100-800 ng Plasmid-DNA zugegeben. Einer einstündigen Inkubation bei 0°C schloß sich eine Hitzeschock-Behandlung (42°C für 50 s) an. Nach einer 1-minütigen Inkubation auf Eis und anschließender Zugabe von Medium A wurden die Zellen für 45 bis 60 min bei 37°C geschüttelt und nachfolgend auf selektivem Medium ausplattiert.

### 3.2.2.3 Maxipräparation von Plasmiden

Für die Transfektion von eukaryontischen Zellen wurden große Mengen an Endotoxin-freier Plasmid-DNA benötigt. Diese konnten mit einem EndoFree<sup>®</sup> Plasmid Maxi-Kit von Qiagen isoliert werden. Um dafür eine hohe Anzahl von Bakterien zu erhalten, wurde 1l 2YT-Medium mit 20 ml einer Vorkultur inokuliert und bis zu einer  $OD_{600\text{ nm}} = 0.8$  wachsen gelassen. Die Präparation der Plasmid-DNA erfolgte dann nach Angaben des Herstellers.

### 3.2.2.4 Quantifizierung von Nukleinsäuren

Die DNA-Lösungen wurden so verdünnt, daß die  $0.2 < OD_{260\text{ nm}} < 1.0$  war. Bei den Wellenlängen 260 nm und 280 nm wurde die Absorption der Probe in einer Quarz-Küvette mit Hilfe eines UV/VIS-Spektrophotometers gemessen. Eine  $OD_{260\text{ nm}} = 1.0$  entspricht dabei 50 µg/ml doppelsträngiger DNA bzw. 40 µg/ml Desoxyribonukleotid. Das Verhältnis  $OD_{260\text{ nm}}/OD_{280\text{ nm}}$  gibt Aufschluß über die Reinheit der präparierten DNA, wobei proteinfreie Lösungen einen Wert von 1.8 bis 2.0 haben.

### 3.2.2.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe der PCR ist es möglich, definierte DNA-Fragmente zu amplifizieren und durch Nutzung spezifischer Primer neue Restriktionsschnittstellen an den 5'- bzw. 3'-Enden einzuführen (Mullis und Faloona, 1987; Saiki et al., 1988). Ebenso ist es möglich, Bakterien auf das Vorhandensein einer bestimmten DNA-Sequenz zu untersuchen, wie bei der sogenannten „Kolonie-PCR“. Vorteil dieser Methode ist, daß sie auf eine große Anzahl von Proben mit minimalem DNA-Gehalt angewendet werden kann (z.B. Identifizierung positiver Klone nach Transformation, wenn nur Einzelkolonien verfügbar sind).

Ein Reaktionsansatz der PCR hatte folgende Zusammensetzung:

- 1  $\mu$ l ds Template-DNA (50 bis 100 ng)
- 0.5  $\mu$ l dNTP-Mix (je 10 mM)
- 1  $\mu$ l Oligodesoxyribonukleotid 1 (100 nmol/ml)
- 1  $\mu$ l Oligodesoxyribonukleotid 2 (100 nmol/ml)
- 2  $\mu$ l Deep Vent<sup>TM</sup>-DNA-Polymerasepuffer
- 0.5  $\mu$ l Deep Vent<sup>TM</sup>-DNA-Polymerase (1 U)
- 14  $\mu$ l H<sub>2</sub>O

Nach der PCR wurde die neu synthetisierte DNA mit Hilfe des PCR-Purification Kits von Qiagen aus dem Ansatz isoliert. Für eine Kolonie-PCR wurde eine ähnliche Zusammensetzung verwendet, in dem aber die Deep Vent<sup>TM</sup>-DNA-Polymerase durch die billigere Taq-DNA-Polymerase ersetzt wurde. Ein Überschichten mit Mineralöl war nicht notwendig, da Thermocycler mit beheiztem Deckel (Biometra oder Perkin Elmer) verwendet wurden. Die Reaktion lief nach folgendem Programm ab:

Schritt	Temperatur	Dauer	Zweck
1	94°C	2 min	initiale Denaturierung der DNA
2	50-65°C	2 min	initiales Annealing der Primer
3	72°C	5 min	initiale Elongation
4	94°C	1 min	Denaturierung der DNA
5	50-65°C	1 min	Annealing der Primer
6	72°C	2 min	Elongation
7	72°C	5 min	Vervollständigung der Elongation
8	4°C	Pause	Schutz vor Degradation

Die gewählte Annealingtemperatur lag 5 bis 10 K unter der Schmelztemperatur der Primer. Zwischen den Schritten 4 und 6 wurde eine Programm-Schleife mit einem Zeitinkrement von 1 s pro Zyklus programmiert, wobei sich die Schleife 34 mal wiederholte.

### 3.2.2.6 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Spaltung von Plasmid-DNA mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen wurden in der Regel nach den Empfehlungen des Herstellers der Enzyme unter Verwendung des mitgelieferten Puffersystems durchgeführt.

Die DNA (0.5 bis 10 µg) wurde dabei mit 0.5 bis 10 U Restriktionsenzym in 1x Reaktionspuffer für 3 h bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte das „Ausheizen“ des Restriktionsenzym nach Angaben des Herstellers und die Auftrennung der Spalt-Produkte in einem Agarose-Gel.

### 3.2.2.7 Ligation von DNA-Fragmenten in Vektor-DNA

Zur Insertion eines DNA-Fragments in einen zuvor mit Restriktionsenzymen geschnittenen Vektors wurden 50-200 ng Plasmid mit einem 5- bis 10fachen molaren Überschuß des jeweiligen Fragments in 1x Ligationspuffer mit 400 U T4-Ligase gemischt (Endvolumen 20 µl) und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Ein Teil des Ligationsansatzes wurde dann zur Transformation von *E. coli*-Zellen (meist DH5α) eingesetzt.

### 3.2.2.8 Radioaktive Markierung von Oligonukleotiden

Für Gelshift-Experimente war es notwendig, Oligonukleotide mit [<sup>32</sup>P] radioaktiv zu markieren. Die Anlagerung der beiden Oligonukleotid-Einzelstränge erfolgte durch Mischung äquimolarer Mengen des sense- und anti-sense-Stranges mit nachfolgendem Erhitzen auf 95°C für 5 min und einer langsamen Abkühlungsphase (0.6°C/min) auf 20°C. Ein Reaktionsansatz für die Markierung hatte folgende Zusammensetzung:

<u>Markierungsansatz:</u>	200 pmol	Oligonukleotid (ds)
	4 µl	T4-PNK-Puffer (10 x)
	4 µl	ATP γ- <sup>32</sup> P
	1 µl	T4-PNK (= 10 U)
		H <sub>2</sub> O ad 40 µl

Die gewählten Reaktionsbedingungen erlauben ausschließlich die *Forward*-Reaktion der T4-Polynukleotid-Kinase. Da der größte Teil des [<sup>32</sup>P] nicht in das Oligonukleotid eingebaut wird, muß die uninkorporierte Radioaktivität mit Hilfe des Nukleotid Removal-Kits von Qiagen entfernt werden, um ein hohes Signal/Rausch-Verhältnis zu gewährleisten. Mit Hilfe von Szintillationsmessungen wurde eine spezifische Radioaktivität von 50000 bis 65000 cpm/pmol Oligonukleotid ermittelt.

### 3.2.2.9 Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung der DNA im Gel erfolgt entsprechend ihrer Größe. Sowohl für analytische als auch für präparative Zwecke wurden 1 %ige Agarose-Gele (w/v) mit einem Ethidiumbromid-Zusatz (0.5 µg/ml) im TAE-Puffersystem verwendet. Die Proben wurden vor dem Lauf mit Probenauftragspuffer versetzt. Nach dem Auftragen der Proben und des Standards wurde die Auftrennung bei 5 bis 10 V/cm gestartet. Die Elektrophorese wurde beendet, als die Bromphenolblau-Front  $\frac{2}{3}$  des Geles passiert hatte. Mit UV-Licht von 312 nm wurden die DNA-Banden visualisiert und fotografisch dokumentiert.

### 3.2.2.10 Minipräparation von Plasmiden

#### 3.2.2.10.1 Plasmid-Minipräparation mittels Qiagen-Kit

Da die DNA für eine automatische DNA-Sequenzierung eine hohe Reinheit haben muß, wurden für diesen Zweck kleine Mengen an Plasmid-DNA mit Hilfe des Miniprep-Kits von Qiagen nach Angaben des Herstellers isoliert.

#### 3.2.2.10.2 Alkalische Lyse

<u>Lösung 1:</u>	25 mM Tris/HCl (pH 8.0)	<u>Lösung 2 :</u>	200 mM NaOH
	10 mM EDTA		1 % SDS (w/v)
	100 µg RNase A (DNase-frei)		
<u>Lösung 3:</u>	3 M Natriumazetat (pH 4.8)		

Für die Suche nach positiven Klonen wurden die Plasmide nach einer modifizierten Methode von BIRNBOIM und DOLY präpariert (Birnboim und Doly, 1979). Dazu wurden Zellen aus 1.5 ml einer Übernachtskultur (2YT-Medium) 5 min bei 6000 x g abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 150 µl Lösung 1 resuspendiert und 10 min bei RT inkubiert. Zum Start der alkalischen Lyse wurden 200 µl Lösung 2 zugesetzt und der Ansatz für weitere 10 min auf Eis inkubiert. Durch Zugabe von 150 µl Lösung 3 wurde die Lyse abgestoppt und in einem sich anschließenden 10-minütigen Inkubationsschritt auf Eis die genomische DNA und zelluläre Proteine ausgefällt. Nach Zentrifugation (10 min bei 13000 x g) wurde der klare Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und das 0.7fache Volumen an 100 % Isopropanol (v/v) zugegeben und für 10 min bei RT inkubiert.

Dadurch wurde die Plasmid-DNA gefällt und konnte nachfolgend durch 20-minütige Zentrifugation (10 min bei 13000 x g) sedimentiert werden. Das Pellet wurde einmal mit 400 µl eiskaltem 70 % Ethanol (v/v) gewaschen, um überschüssige Salze zu entfernen. Im Stickstoff-Strom wurde das Pellet nach Abnahme des Überstandes vorsichtig getrocknet und in sterilem destilliertem Wasser gelöst.

### 3.2.2.11 Kultivierung und Lagerung von *E. coli*

Die Kultivierung der Bakterien erfolgte stets in sterilen Medien bei einer Inkubationstemperatur von 37°C. Flüssigmedien wurden kontinuierlich mit 210 rpm geschüttelt. Für die Herstellung von Glycerin-Kulturen wurden 800 µl einer Übernachtskultur in LB-Medium mit 200 µl Glycerin versetzt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

## 3.2.3 Zellbiologische Methoden

### 3.2.3.1 Gelshift-Assay (EMSA)

Um die spezifische Wechselwirkung zwischen Proteinen und DNA-Fragmenten zu untersuchen, kann man den Effekt ausnutzen, daß proteingebundene DNA gegenüber freier DNA eine Verschiebung der elektrophoretischen Mobilität aufweist. Um ein solches Experiment durchzuführen, wurde folgender Reaktionsansatz verwendet:

#### Ansatz für EMSA:

2-10 µg Kernprotein  
1 pmol ds Oligonukleotid (radioaktiv markiert)  
1 µg Poly[dl/dC]  
2 µl Gelshift-Puffer (10 x)  
H<sub>2</sub>O ad 20 µl

#### Gelshift-Puffer (1 x):

10 mM Tris/HCl (pH 7.5)  
50 mM NaCl  
0.5 mM DTT  
0.5 mM EDTA  
1 mM MgCl<sub>2</sub>  
4 % Glycerin

Die Einzelkomponenten wurden entsprechend der aufgeführten Reihenfolge gemischt und für 30 min bei 25°C inkubiert. In einem 6 %igen TBE-Gel erfolgte die Separation der Protein/DNA-Komplexe. Die Gele wurden nicht getrocknet, sondern für 3-48 h direkt auf einer Fuji *Imaging plate* exponiert. Die densitometrische Auswertung erfolgte mit der gerätespezifischen Software Aida v2.3 (raytest, Straubenhardt, Deutschland).

### 3.2.3.2 Herstellung zytosolischer Extrakte

Zur Präparation von zytosolischen Extrakten wurden  $1 \times 10^6$  T-Lymphozyten in 400  $\mu$ l des folgenden hypotonen Puffers mit einer gelben Pipetten-Spitze resuspendiert:

<u>hypotoner Lysis-Puffer:</u>	10 mM	HEPES/NaOH (pH 7.5)
	2 mM	MgCl <sub>2</sub>
	0.1 mM	EDTA
	0.1 mM	EGTA
	10 mM	KCl
	1 mM	DTT
	5 mM	Ammoniummolybdat
		Protease-Inhibitor-Mix

und für 15 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 25  $\mu$ l 10 % NP-40 wurde der Ansatz erneut für 5 min auf Eis inkubiert und 2 x 10 s mit maximal möglicher Stärke „gevortext“. Die Abtrennung der Zellkerne erfolgte mittels Zentrifugation bei 2500 x g für 5 min. Der Überstand enthielt überwiegend die zytosolischen Proteine.

### 3.2.3.3 Herstellung von Kernextrakten

Das bei der Präparation von zytosolischen Extrakten zurückbleibende Pellet bestand vorwiegend aus Zellkernen. Dieses wurde mit dem 5fachen Volumen an Lysis-Puffer gewaschen und nach Zentrifugation (5 min, 2500 x g, 4°C) in dem 4fachen Volumen des Kernextraktionspuffers resuspendiert.



---

<u>Kernextraktionspuffer:</u>	25 mM	HEPES/NaOH (pH 7.5)
	500 mM	NaCl
	1 mM	EDTA
	1 mM	EGTA
	10 mM	KCl
	1 mM	DTT
	5 mM	Ammoniummolybdat
	10 % (v/v)	Glycerin
	0.1 % (v/v)	NP-40
		Protease-Inhibitor-Mix

Durch kontinuierliches Schütteln des Ansatzes für 30 min bei 4°C erfolgte die Extraktion der Kernproteine. Die Proteine im Überstand wurden durch Zentrifugation (30 min, 16000 x g, 4°C) von den unlöslichen Bestandteilen abgetrennt und der Protein-Gehalt im Überstand bestimmt.

#### 3.2.3.4 MTT-Zytotoxizitätstest

Um zu prüfen, ob ein *in vitro* wirksamer CaN-Inhibitor ein zytotoxisches Potential besitzt, wurde standardmäßig der MTT-Zytotoxizitätstest angewandt (Mosmann, 1983). Dieser beruht darauf, daß die in intakten Mitochondrien vorhandene Succinatdehydrogenase das farblose MTT in ein violette MTT-Formazan umwandelt. Dazu werden für eine 96-well-Platte 2.4 mg MTT in 12 ml des jeweiligen Mediums bei 30°C gelöst. Die Zellen müssen unter sterilen Bedingungen in einer 96-well-Platte wachsen, so daß eine Zelldichte von 10<sup>4</sup> Zellen pro Kavität vorliegt. Bei adherenten Zellen wird das Medium durch Abgießen entfernt, während bei Suspensions-Zellen ein Zentrifugationsschritt und vorsichtiges Absaugen mit einer Kanüle notwendig ist. Das wasserunlösliche Formazan kann nun mit 200 µl Dimethylsulfoxid aus den Zellen herausgelöst werden und wird anschließend spektrophotometrisch bei 570 nm (600 nm als Referenz) in einem Mikrotiterplatten-Lesegerät (Dynatech MR 7000) detektiert.

Wenn die Zelle durch Inkubation mit einer zytotoxischen Verbindung geschädigt wurde, so verliert sie unter anderem die Membranintegrität ihrer Kompartimente und die mitochondrial lokalisierte Dehydrogenase kann unter diesen Bedingungen nicht mehr arbeiten. Es wird wenig oder kein Formazan gebildet.

### 3.2.3.5 Isolierung von PBMC aus Blut

Zur Isolierung von PBMC wurden frische „buffy coat“-Schichten verwendet. Dazu wurde das biologische Material in 50 ml Greiner-Röhrchen gefüllt und für 20 min bei 2000 x g (4°C, ohne Bremse) zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt und die oberste Schicht des Pellets in 10 ml Dulbecco's PBS in einem neuen Greiner-Röhrchen resuspendiert. Vor einer weiteren Zentrifugation (20 min, 2000 x g, 4°C, ohne Bremse) wurde die Lösung mit Ficoll (20°C) vorsichtig unterschichtet. Durch diese Schritte wurden die PBMC von den Erythrozyten abgetrennt und sind in der Interphase zwischen Ficoll und dem Serum-Überstand angereichert. Nachfolgend wird der Überstand bis kurz über der PBMC-Schicht abgesaugt und die Zellen der Interphase erneut mit einer Pipette in 10 ml Dulbecco's PBS resuspendiert. Die Lösung wurde mit Dulbecco's PBS auf 50 ml aufgefüllt und für 10 min bei 1000 x g zentrifugiert. Der letzte Schritt wiederholte sich zweimal, bevor die Zellen in Medium aufgenommen wurden bzw. sich die Präparation von T-Zellen anschloß.

### 3.2.3.6 Isolierung von T-Zellen aus PBMC

Für die Selektion von humanen CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten und CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten wurden magnetische Partikel eingesetzt, deren Oberfläche mit anti-CD4-Antikörpern bzw. anti-CD8-Antikörpern beschichtet war.

PBMC aus einer „buffy coat“-Schicht (ca. 10<sup>8</sup> Zellen) wurden nach Protokoll präpariert und anschließend in 500 µl eiskaltem PBS resuspendiert. Nach Zugabe von je 70 µl anti-CD4- und anti-CD8-Microbeads erfolgte ein Inkubationsschritt für 30 min bei 4°C. Zuvor wurde aber noch pro Ansatz 1 mg humanes IgG hinzugefügt, um unspezifische Bindungen über den F<sub>c</sub>-Teil des Antikörper-Moleküls zu verhindern. Eine LS-Säule (Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Deutschland) wurde in ein starkes magnetisches Feld eingebracht und mit 5 ml PBS äquilibriert. Anschließend passierte die vorinkubierte Probe per Schwerkraft-Fluß die Säule. Durch Waschen des Säulenmaterials mit 5 ml PBS wurden nicht-gebundene Zellen entfernt, so daß im nächsten Schritt die Elution erfolgen konnte. Dazu wurde das magnetische Feld entfernt und die Säule mit 6 ml eiskaltem PBS eluiert. Um eine möglichst hohe Ausbeute zu erreichen, wurde der Durchlauf erneut mittels der ferromagnetischen Säule in einem Magnetfeld von T-Zellen depletiert. Beide Eluate wurden nachfolgend vereinigt und 5 min bei 1012 x g abzentrifugiert.

### **3.2.3.7 Kultivierung von PBMC bzw. T-Zellen**

Die Kultivierung von PBMC bzw. T-Zellen erfolgte in RPMI 1640-Medium mit einem Zusatz von 10 % FCS (v/v), 100 U/ml Penizillin/Streptomycin und 2 mM Glutamax™. Dabei wurden die Zellen bei 37°C und 5% Kohlendioxid in einem wasserdampfgesättigten Inkubator bei Zelldichten von  $10^5$  bis  $10^7$  Zellen/ml über Nacht inkubiert, bevor sie für Experimente eingesetzt wurden.

### **3.2.3.8 Bestimmung des Aktivierungsgrades von MAP-Kinasen**

Um den Aktivierungsgrad der MAP-Kinasen in T-Lymphozyten zu bestimmen, wurden die Zellen isoliert und für 16 h bei 37°C in einem Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurden die T-Zellen nach Inkubation mit den Substanzen und nachfolgender Stimulation durch die Zugabe von SDS-Probenpuffer und 5-minütigem Erhitzen auf 95°C lysiert. Die Lysate wurden mittels einer SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und durch Western Blot auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert. Anschließend wurde die Membran mit spezifischen Antikörpern inkubiert, welche nur die phosphorylierte, und damit aktivierte Form der MAP-Kinase erkennen. Dieses Vorgehen wurde sowohl für die ERK1/2, als auch für JNK und p38 angewandt. Der Entwicklung der Filme schloß sich eine Digitalisierung und densitometrische Auswertung an.

### **3.2.3.9 Nonvirale Transfektion von primären T-Zellen**

Um DNA-Konstrukte in eukaryontische Zellen einzuführen, stehen verschiedene Methoden zur Auswahl. Neben der viralen Transfektion und der Lipofektion kommt auch die Elektroporation für einen Gen-Transfer in Betracht. Bei den meisten Zell-Linien verläuft die Transfektion mit diesem Verfahren auch erfolgreich. Die Transfektion von primären Zellen ist oft ungleich schwieriger und sehr oft nur mit viralen Methoden möglich. Eine neue Technologie, die Nukleofektion genannt wird, und prinzipiell eine Elektroporation darstellt, erlaubt aber auch die Transfektion von Primärzellen. Dazu werden die Zellen ( $1 \times 10^7$ ) in 80 µl einer speziellen Nukleofektionslösung (Amaxa, Köln, Deutschland) resuspendiert und mit 5-10 µg Plasmid-DNA gemischt. Dieser Ansatz wird in eine Elektroporationsküvette (2 mm Spaltbreite) transferiert und in das Nukleofektor-Gerät (Amaxa, Köln, Deutschland) eingesetzt. Für T-Zellen wurde das Transfektionsprogramm „U-14“ gewählt. Nach der Nukleofektion wurden die Zellen durch Zugabe von 500 µl vorgewärmtem RPMI 1640-Medium aus der Küvette herausgespült bei 37°C für 10 min ruhen gelassen. Anschließend wurden die Zellen auf das jeweilige Endvolumen aufgefüllt und in eine 6- oder 24-well-Platte zur Inkubation bei 37°C für 16 h überführt.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Calcineurin-Inhibition durch Gossypol

Es wurden 2000 Substanzen einer Substanz-Sammlung des Hans-Knöll-Instituts Jena in einem Hochdurchsatz-Testverfahren auf eine mögliche CaN-Inhibition untersucht. In der Sammlung waren neben Naturstoffen auch semi- und vollsynthetische Verbindungen vertreten. Bei diesem Test wurde in unserer Arbeitsgruppe der Naturstoff Gossypol als CaN-Inhibitor identifiziert. Das polyphenolische Aldehyd Gossypol ist eine Substanz, die in Baumwollsamensamen vorkommt. Für die weiterführenden Experimente wurde käufliches racemisches Gossypol verwendet. Um Struktur-Wirkungsbeziehungen aufzustellen, wurden die ebenfalls käuflichen Gossypol-Derivate Gossypolon und Apogossypol hexaazetat eingesetzt, da die Derivatisierungsschemie sehr komplex - und damit eine gezielte Modifizierung des Gossypol-Moleküls schwierig ist (Abb. 4.1).

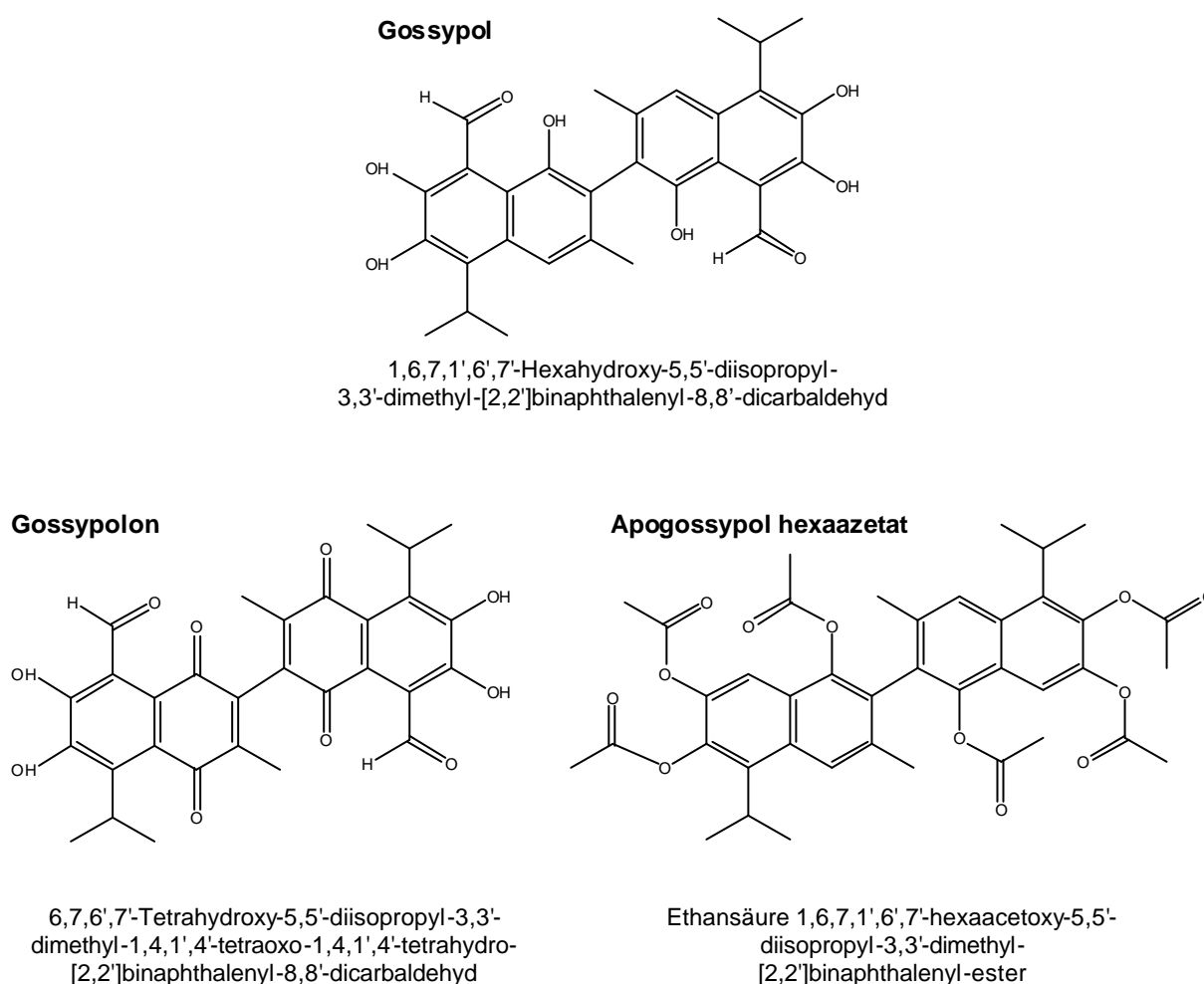


Abb. 4.1: Strukturformeln von Gossypol, Gossypolon und Apogossypol hexaazetat mit systematischen Namen entsprechend der IUPAC-Nomenklatur.

### 4.1.1 Inhibition von Calcineurin durch Gossypol und -Derivate

Zur Bestimmung der Inhibitor-Konzentration, bei der 50 % der Phosphatase-Aktivität des CaN gehemmt werden ( $IC_{50}$ -Wert), wurden verschiedene Konzentrationen der Substanzen mit CaN/Calmodulin in Meßpuffer inkubiert. Als Substrat wurde ein biotinyliertes und [ $^{33}P$ ]-markiertes Peptidfragment der cAMP-abhängigen Kinase (RII-Untereinheit) verwendet, dessen Sequenz vermutlich auch *in vivo* Substrat-Eigenschaften für CaN vermittelt. Das Meßprinzip beruht auf einer Phosphatase-katalysierten [ $^{33}P$ ]-Abspaltung vom RII-Phosphopeptid und einer anschließenden Szintillationsmessung zur Bestimmung des noch verbliebenen radioaktiven Phosphats im Peptid. Dieser Test, den erstmals SULLIVAN et al. beschrieben haben (Sullivan et al., 1997), beruht auf dem Prinzip, daß das biotinylierte Peptidsubstrat über eine Biotin/Streptavidin-Wechselwirkung aus dem Reaktionsansatz isoliert werden kann. In der Praxis geschieht dies durch Streptavidin-beschichtete Szintillationsmikrotiterplatten. Erst nach Optimierung der Meßbedingungen wurden Hochdurchsatz-Testungen möglich, die sich durch geringen Substanzverbrauch, hohe Sensitivität und exzellente Reproduzierbarkeit aufgrund eines geringen Meßfehlers auszeichnen.

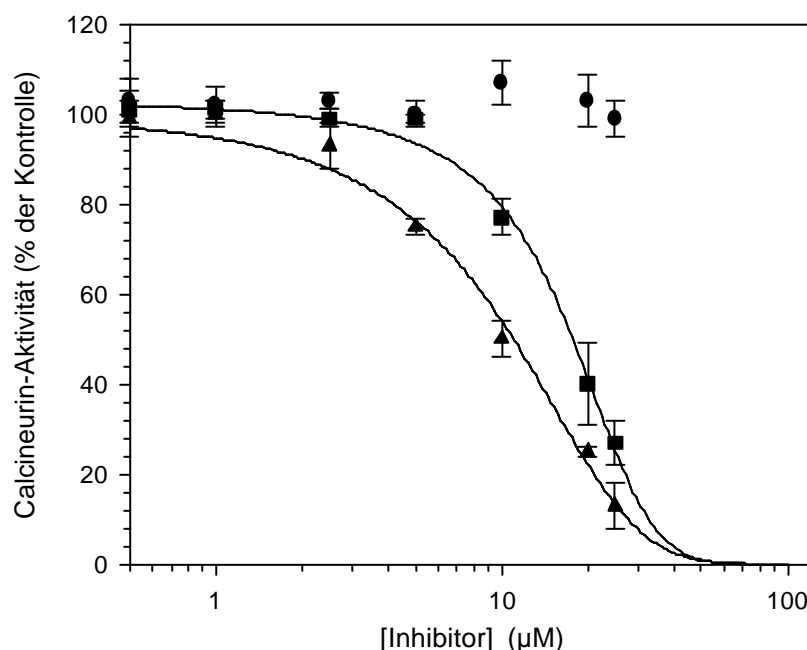


Abb. 4.2: Inhibition der Phosphatase-Aktivität von CaN gegenüber RII-Phosphopeptid.

Gossypol (■), Gossypolon (▲) und Apogossypol hexaazetat (●) wurden mit 1.32 nM CaN und 50 nM Calmodulin in Meßpuffer für 30 min bei 22°C vorinkubiert. Für die Messung wurde RII-Phosphopeptid als Substrat eingesetzt (siehe Material und Methoden). Die  $IC_{50}$ -Werte wurden aus den Mittelwerten ( $\pm$  SD) von drei unabhängigen Versuchen ermittelt.

Für Gossypol wurde ein  $IC_{50}$ -Wert von  $17 \pm 1 \mu\text{M}$  und für Gossypolon ein  $IC_{50}$ -Wert  $9 \pm 1 \mu\text{M}$  im RII-Phosphopeptid-Assay (Abb. 4.2) bestimmt. Apogossypol hexaazetat hingegen zeigte nur eine geringfügige CaN-Inhibition ( $IC_{50} \gg 100 \mu\text{M}$ ). Das Gossypol-Derivat Gossypolon inhibiert CaN wirksamer als Gossypol. Dies ist auf die Entstehung eines 1,4 bzw. eines 1',4' naphtochinoiden Systems durch eine Substitution der Hydroxyl-Gruppen in Position 1 und 1' durch Keto-Gruppen und der Einführung zusätzlicher Keto-Gruppen in Position 4 und 4' zurückzuführen (Abb. 4.1). Da - im Vergleich zum Gossypol - dem Apogossypol hexaazetat die Formyl-Gruppen in Position 8 und 8' fehlen und alle Hydroxyl-Gruppen in Position 1,6,7 und 1',6',7' mit Essigsäure verestert sind (Abb. 4.1), kann bei diesem Derivat nur eine minimale CaN-Inhibition beobachtet werden (Abb. 4.2). Für eine eindeutige Bestimmung von Struktur-Wirkungsbeziehungen ist es jedoch am besten, Derivate zu verwenden, die nur in einer Position verändert sind. Leider standen mit Gossypolon und Apogossypol hexaazetat nur mehrfach modifizierte Substanzen zur Verfügung. Es läßt sich aber trotzdem feststellen, daß durch Modifizierung der Positionen 1,4,6,7,8 und 1',4',6',7',8' des Gossypols die Eigenschaft der CaN-Inhibition maßgeblich beeinflusst werden kann.

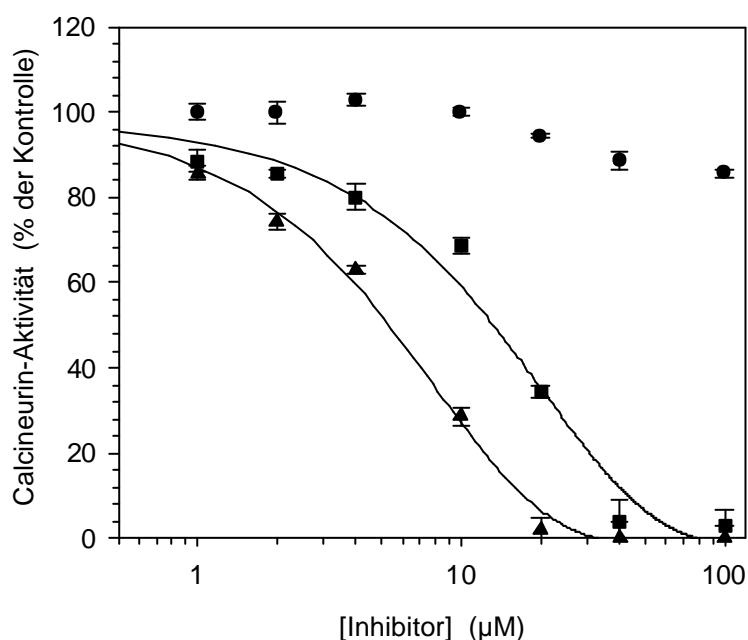


Abb. 4.3: **Inhibition der Phosphatase-Aktivität von CaN gegenüber pNPP.**

Gossypol (■), Gossypolon (▲) und Apogossypol hexaazetat (●) wurden mit 1.32 nM CaN und 50 nM Calmodulin in Meßpuffer für 30 min bei 22°C vorinkubiert. Für die Messung wurden 10 mM pNPP als Substrat eingesetzt (siehe Material und Methoden). Die  $IC_{50}$ -Werte wurden aus den Mittelwerten ( $\pm$  SD) von drei unabhängigen Versuchen ermittelt.

In einem weiteren Experiment wurde die Phosphatase-Aktivität von CaN gegenüber dem kleinen unphysiologischen Substrat p-Nitrophenyl phosphat (pNPP) nach Vorinkubation des Enzyms mit Gossypol und -Derivaten bestimmt (Abb. 4.3). Die dabei ermittelten  $IC_{50}$ -Werte unterschieden sich nur geringfügig von denen, die mit RII-Phosphopeptid gemessen wurden: Gossypol  $14 \pm 1 \mu\text{M}$  und für Gossypolon  $6 \pm 1 \mu\text{M}$ . Auch bei diesen Messungen zeigte Apogossypol hexaazetat nur eine geringe CaN-Inhibition ( $IC_{50} \gg 100 \mu\text{M}$ ). Um einen eventuellen Anhaltspunkt bezüglich des Hemmtyps zu bekommen, wurde die Inhibition durch Gossypol bei drei verschiedenen pNPP-Konzentrationen gemessen (Abb. 4.4).

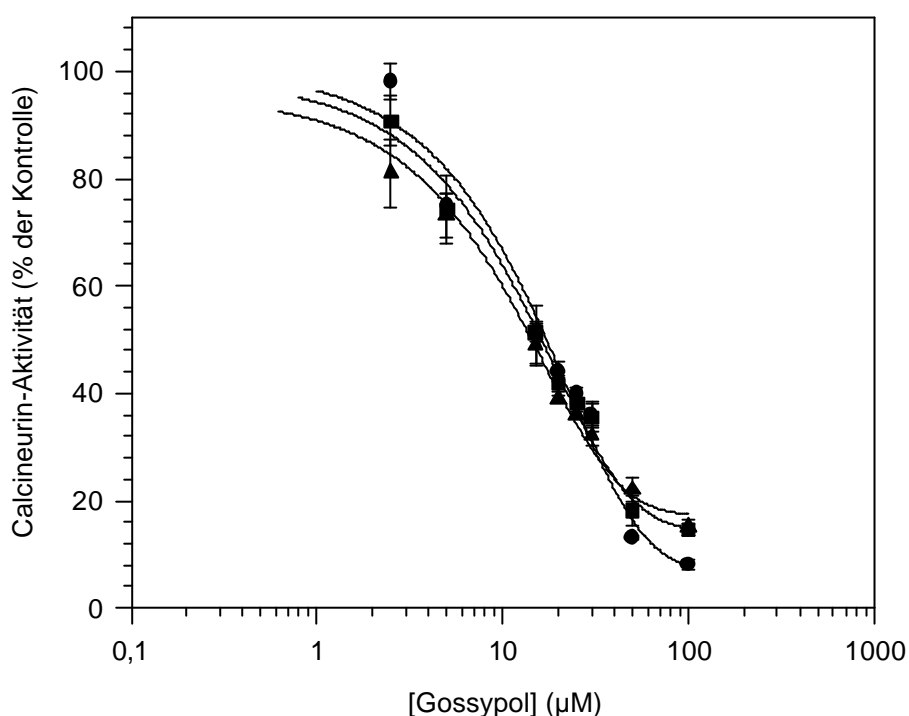


Abb. 4.4: Inhibition von CaN durch Gossypol in Abhängigkeit von der pNPP-Konzentration.

CaN und Calmodulin wurden in Meßpuffer für 30 min bei 22°C mit Gossypol vorinkubiert. Anschließend wurde die Phosphatase-Aktivität des CaN gegenüber folgenden pNPP-Konzentrationen bestimmt: 1 mM (●), 5 mM (■) und 25 mM (▲). Die  $IC_{50}$ -Werte wurden aus den Mittelwerten ( $\pm$  SD) von drei unabhängigen Versuchen ermittelt.

Es zeigte sich, daß die Substrat-Konzentration keinen Einfluß auf den  $IC_{50}$ -Wert hatte. Dies könnte als Hinweis auf einen nicht-kompetitiven Hemmtyp gewertet werden, da bei einem kompetitiven Hemmtyp der  $IC_{50}$ -Wert in der graphischen Darstellung bei steigenden Substrat-Konzentrationen in Richtung höherer Inhibitor-Konzentrationen verschoben wird. Um aber den Hemmtyp exakt zu bestimmen, wurde die reziproke Phosphatase-Aktivität von CaN in Abhängigkeit von der Gossypol- und Substratkonzentration gemessen und die Meßwerte in einem Dixon-Plot gegeneinander aufgetragen (Abb. 4.5).

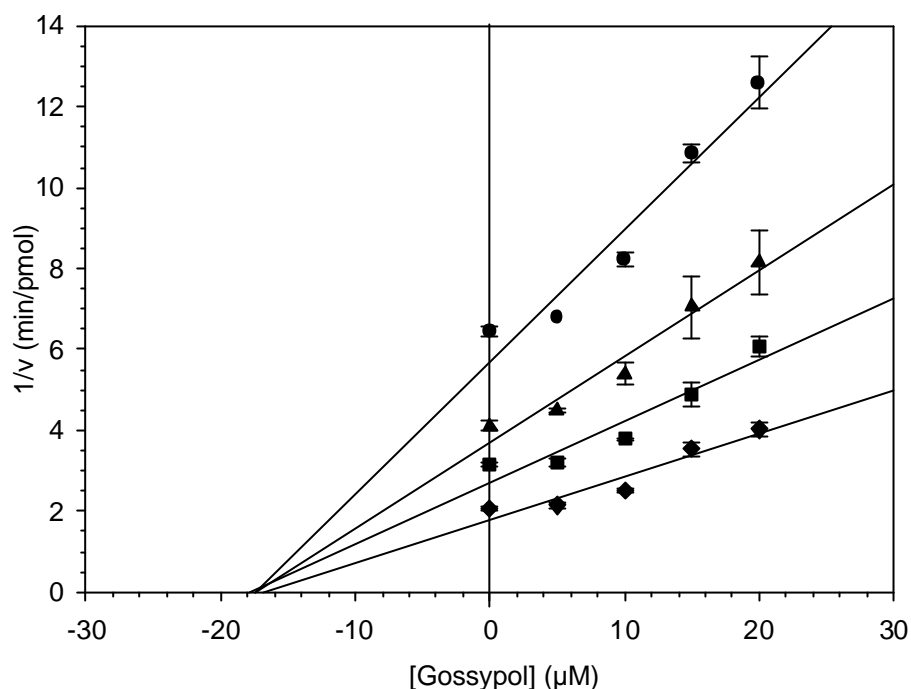


Abb. 4.5: **Dixon-Plot der CaN-Inhibition durch Gossypol.**

Die Inhibition von CaN durch Gossypol wurde bei verschiedenen Substratkonzentrationen gemessen: 5 µM (●), 6 µM (▲), 8 µM (■) und 10 µM (◆). CaN wurde in einer Konzentration von 0.66 nM und das RII-Phosphopeptid als Mischung aus biotinyliertem und unbiotinyliertem Peptid im molaren Verhältnis von 1:200 eingesetzt. Jedem Graph liegen vier unabhängige Experimente zugrunde. Als Daten wurden die Mittelwerte ( $\pm$  SD) verwendet und mittels linearer Regression angepaßt.

Die nach Abb. 4.4 vermutete nicht-kompetitive Inhibition von CaN durch Gossypol konnte durch einen Dixon-Plot bestätigt werden (Abb. 4.5). Dabei weichen die Meßdaten aufgrund der Komplexität des Reaktionsansatzes von der theoretisch zu erwartenden strengen Linearität ab, wobei die ermittelten Meßwerte ohne Gossypol-Zusatz am stärksten davon betroffen sind. Aus der Dixon-Auftragung kann der  $K_i$ -Wert einer nicht-kompetitiven Inhibition als gemeinsamer Schnittpunkt des Strahlenbündels mit der x-Achse abgelesen werden. Der ermittelte  $K_i$ -Wert von 17 µM ist nahezu identisch mit den bereits bestimmten  $IC_{50}$ -Werten von 17 µM bzw. 14 µM (Abb. 4.2 und 4.3) im CaN-Aktivitätstest mit RII-Phosphopeptid bzw. pNPP. In Vorversuchen stellte sich heraus, daß sich durch eine Biotinylierung des RII-Phosphopeptids die Affinität des Substrates zum Enzym nicht signifikant ändert. Für die Mischung aus biotinyliertem und unbiotinyliertem RII-Phosphopeptid wurde durch Lineweaver-Burk-Auftragung von  $1/v$  gegen  $1/[S]$  ein  $K_m$ -Wert von  $20 \pm 3$  µM ermittelt (persönliche Mitteilung von Dr. R. Baumgraß). Dieser Wert korreliert sehr gut mit denen in der Literatur angegebenen  $K_m$ -Werten von 23 µM (Chan et al., 1986) und 25 µM (Enz et al., 1997).



### 4.1.2 Reversibilität der Calcineurin-Inhibition durch Gossypol

Für den Nachweis der Reversibilität der CaN-Inhibition durch Gossypol können mehrere experimentelle Ansätze verfolgt werden, wie z.B. Gelfiltration, Verdünnungsreihen oder Dialyse. Bei diesen Verfahren wird ausgenutzt, daß sich das chemische Gleichgewicht neu einstellt, nachdem der Inhibitor partiell aus dem Enzym/Inhibitor-Komplex entfernt wurde und dadurch die Menge des freien Enzyms zunimmt. Neben dem aufgeführten Dialyseexperiment wurde die Reversibilität der Inhibition auch in einem Verdünnungs-experiment mit einem ähnlichen Ergebnis nachgewiesen (Daten nicht gezeigt).

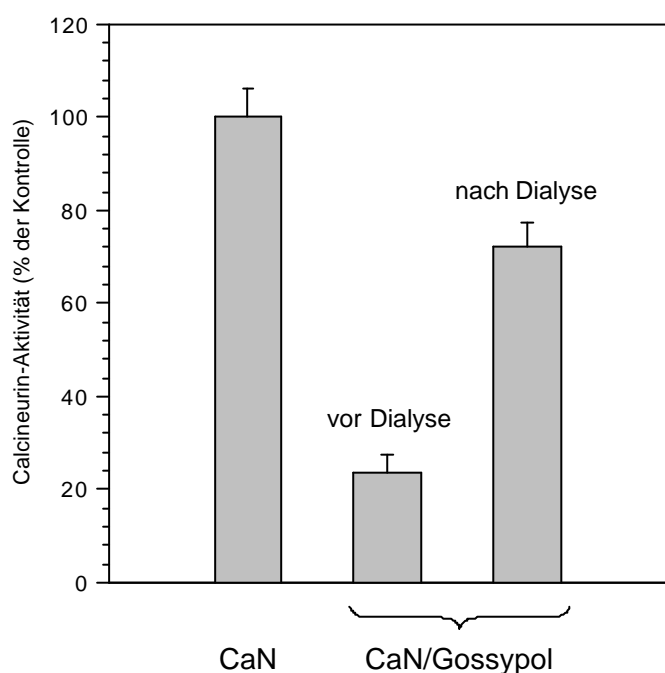


Abb. 4.6: **Nachweis einer reversiblen Inhibition von CaN durch den polyphenolischen Aldehyd Gossypol.**

CaN wurde mit 30  $\mu$ M Gossypol für 30 min bei 22°C vorinkubiert. Anschließend wurde der Reaktionsansatz in eine Dialysezelle (10 kDa) überführt und das Retentat mehrmals mit CaN-Assay-Puffer gewaschen. Die Messung der CaN-Aktivität vor und nach Dialyse erfolgte mit RII-Phosphopeptid als Phosphatase-Substrat. Es wurde außerdem eine separate Kontrolle ohne Inhibitor mitgeführt und gleich behandelt, da zeitabhängig immer eine geringe Abnahme der Phosphatase-Aktivität des CaN beobachtet werden kann. Die gezeigte Höhe der Balken stellt den Mittelwert ( $\pm$  SD) von drei unabhängigen Experimenten dar.

Dazu wurde CaN mit Gossypol vorinkubiert und die Restaktivität des Gemisches bestimmt (Abb. 4.6). Diese betrug nur 21 % der Aktivität ohne Inhibitor. Anschließend wurde der Reaktionsansatz in eine Dialysezelle überführt. Da die Membranporen eine Ausschlußgröße von 10 kDa hatten, konnte Gossypol (MW: 518.6 g/mol) die Membran ungehindert passieren und war im Dialysat zu finden. CaN verblieb aufgrund seiner Größe (MW: ca. 75 kDa) im Retentat. Nach zahlreichen Wasch-Schritten wurde die CaN-Aktivität sowohl im Dialysat als auch im Retentat bestimmt. Erwartungsgemäß wurde im Dialysat keine Phosphatase-Aktivität detektiert. Dagegen konnte im Retentat eine CaN-Aktivität gemessen werden, die 72 % der Aktivität einer gleich behandelten Probe ohne Inhibitor entsprach. Somit konnte durch Dialyse die Enzym-Aktivität eines CaN/Gossypol-Gemisches um 51 % erhöht werden.

Trotzdem ist ein Aktivitätsdefizit von 28 % im Vergleich zur Kontrolle zu verzeichnen. Ursache dafür könnte z.B. eine Nebenreaktion sein, in der Gossypol CaN kovalent modifiziert. Durch Variation der Präinkubationszeit sollte es möglich sein, eine irreversible Veränderung des Enzyms zu detektieren (Abb. 4.7).

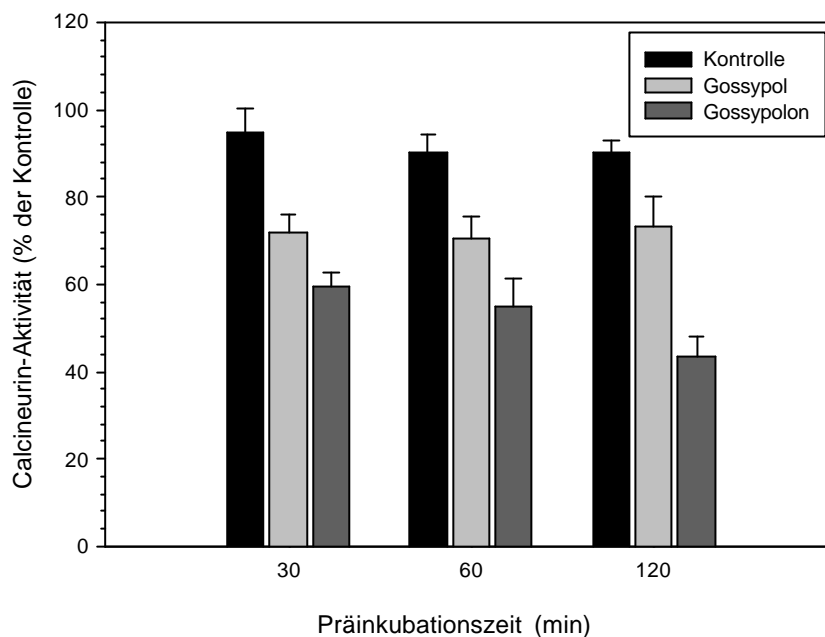


Abb. 4.7: **Bestimmung eines putativ irreversiblen Anteils der CaN-Inhibition durch Gossypol und das Gossypol-Derivat Gossypolon.**

CaN wurde mit 30  $\mu$ M Gossypol oder Gossypolon für unterschiedliche Zeiten präinkubiert. Im Folgenden wurden die Enzym-Aktivitäten der CaN/Inhibitor-Gemische nach Dialyse gegenüber RII-Phosphopeptid bestimmt. Für die verschiedenen Inkubationszeiten wurde immer eine separate Kontrolle ohne Inhibitor mitgeführt, da zeitabhängig immer eine geringe Abnahme der Phosphatase-Aktivität des CaN beobachtet werden kann. Die gezeigte Höhe der Balken stellt den Mittelwert ( $\pm$  SD) von drei unabhängigen Experimenten dar.

Wie in Abb. 4.7 zu sehen ist, kann - analog zu Abb. 4.6 - ein Teil der Phosphatase-Aktivität des CaN/Gossypol-Gemisches durch Dialyse zurückgewonnen werden. Da die Enzym-Aktivitäten nach Dialyse nicht mit fortschreitender Inkubationszeit abnehmen, kann eine irreversible Veränderung von CaN durch Gossypol weitgehend ausgeschlossen werden. Im Gegensatz dazu verringert sich die Enzym-Aktivität eines dialysierten CaN/Gossypolon-Gemisches mit zunehmender Inkubationszeit. Nachdem der Inhibitor Gossypolon 2 h mit dem Enzym inkubiert wurde, kam es zu einem irreversiblen Verlust der Enzym-Aktivität von 15 %. Vermutlich sind für dieses unterschiedliche Verhalten der beiden CaN-Inhibitoren die Keto-Gruppen des Gossypolons in Position 1,4 bzw. 1',4' verantwortlich, da sie eine höhere Reaktivität aufweisen als die 1- und 1'-ständigen Hydroxyl-Gruppen des Gossypols (Abb. 4.1).

### 4.1.3 Einfluß von Zusätzen auf die Inhibition des Calcineurins

Für die Aktivierung von CaN ist sowohl *in vivo* als auch *in vitro* das Zusammenspiel mehrerer Faktoren, wie z.B. Calcium und Calmodulin erforderlich (Klee et al., 1979). Theoretisch wäre es somit möglich, daß die gemessene CaN-Inhibition durch Gossypol auf eine Beeinflussung von Calmodulin zurückzuführen ist. Neben einer Interaktion von Gossypol mit der CaN-bindenden Region des Calmodulins könnte auch - durch sterische oder allosterische Effekte - eine veränderte Calcium-Bindung dieses Proteins in Betracht kommen. Um einen Einfluß von Gossypol auf Calmodulin auszuschließen, wurde die CaN-Inhibition bei unterschiedlichen Calmodulin-Konzentrationen gemessen. Wenn Calmodulin den Angriffspunkt von Gossypol darstellt, so sollte sich der  $IC_{50}$ -Wert der CaN-Inhibition mit steigenden Calmodulin-Konzentrationen in Richtung höherer Gossypol-Konzentrationen verschieben und umgekehrt. Nach Durchführung des Experimentes stellte sich heraus, daß der  $IC_{50}$ -Wert der Inhibition durch Gossypol unverändert bleibt, obwohl eine deutliche Aktivierung der Phosphatase-Aktivität von CaN durch Erhöhung der Calmodulin-Konzentration zu erkennen ist (Abb. 4.8).

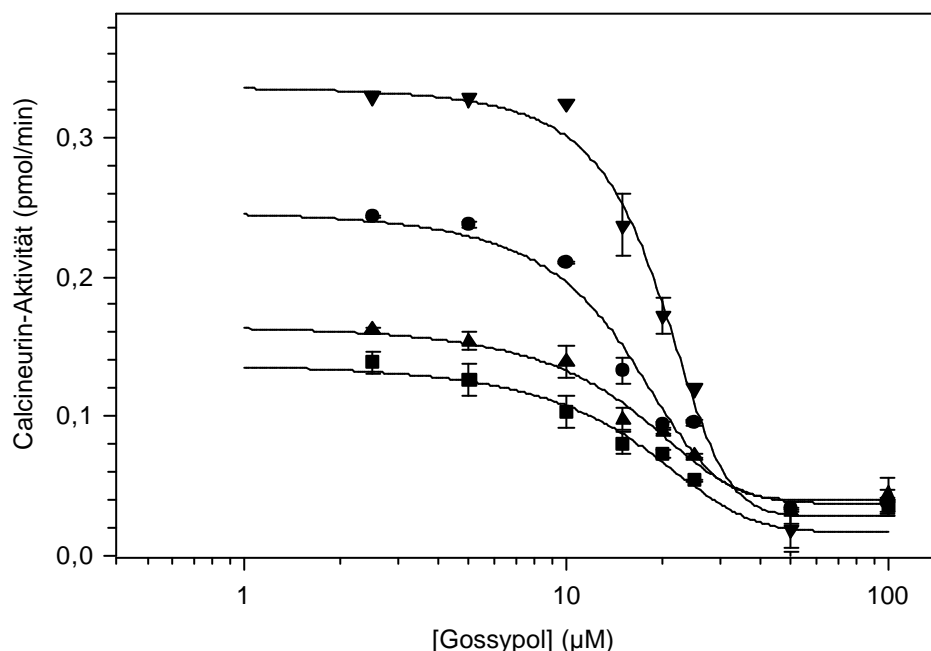


Abb. 4.8: **Einfluß der Calmodulin-Konzentration auf die CaN-Inhibition durch Gossypol.**

CaN wurde mit steigenden Konzentrationen von Gossypol vorinkubiert und mit RII-Phosphopeptid in Gegenwart von 25 nM (■), 37.5 nM (▲), 50 nM (●) und 150 nM (▼) Calmodulin gemessen. Die Restaktivitäten wurden gegen die Gossypol-Konzentration aufgetragen. Alle Meßwerte entsprechen den Mittelwerten ( $\pm$  SD) aus drei unabhängigen Experimenten.

Calcium ist in einer Konzentration von 1 mM im Meßpuffer enthalten und sollte selbst im Falle einer Komplexierung durch Gossypol immer noch in einem molaren Überschuß vorliegen. Als weiterer Punkt mußte eine Komplexierung von Eisen ausgeschlossen werden, da CaN eine binukleare Metallo-Phosphatase mit einem Zink und einem vermutlich zweiwertigen Eisen-Ion im aktiven Zentrum ist (Wang et al., 1996). Gossypol wurde im asiatischen Raum experimentell als Kontrazeptivum angewandt, wobei der antifertile Effekt auf einer Komplexierung des Adenylatzyklase-gebundenen Eisens in den Spermatozyten beruhen soll (Olgiati et al., 1984; Pearce et al., 1986). Deshalb wurden 500 µM Ammoniumeisen(II)-sulfat mit CaN für 5 min vorinkubiert und anschließend mit 20 µM Gossypol versetzt. Der Grad der Gossypol-vermittelten CaN-Inhibition blieb jedoch unverändert, wie eine Kontrolle ohne Ammoniumeisen(II)-sulfat zeigte. Da das vermutlich zweiwertige Eisen-Ion im aktiven Zentrum sehr sensitiv gegenüber oxidativen Prozessen ist (Wang et al., 1996; Yu et al., 1997b), aber durch reduzierende Agenzien wie  $\text{Fe}^{2+}$  (Wang et al., 1996), DTT oder Thioredoxin (Bogumil et al., 2000) regeneriert werden kann, wurde die erneute Inhibition von CaN durch Gossypol in Gegenwart von 5mM DTT gemessen. Aber auch durch diesen Zusatz ließ sich die Hemmung der Phosphatase-Aktivität nicht verhindern. Das deutet auf einen Inhibitionsmechanismus hin, bei dem eine Modifikation von Cystein-Resten oder eine Änderung der Redox-Stufe des Eisens ausgeschlossen werden kann.

#### 4.1.4 Identifizierung der Gossypol-Bindungsstelle am Calcineurin

Um zu prüfen, ob Gossypol und der CsA/Cyp18-Komplex sich an die gleiche Bindungsstelle anlagern, wurde CaN mit 12 µM Gossypol und verschiedenen CsA/Cyp18-Konzentrationen inkubiert und anschließend die Rest-Phosphatase-Aktivität gegenüber RII-Phosphopeptid gemessen. Dabei ist die Konzentration des CsA/Cyp18-Komplexes identisch mit der Cyp18-Konzentration, wenn die CsA-Konzentration mit 10 µM in einem molaren Überschuß gegenüber Cyp18 im Meßansatz vorliegt. Begründet werden kann dieser Umstand damit, daß CsA ein *tight binding*-Inhibitor ist, der mit hoher Affinität an Cyp18 binden und die PPlase-Aktivität inhibieren kann ( $K_i = 2.6 \text{ nM}$ ) (Fischer et al., 1989b). Wie in Abb. 4.9 dargestellt ist, wird die Inhibition von CaN durch Gossypol durch steigende Mengen an Cyp18 erwartungsgemäß nicht verändert. Im Gegensatz dazu wird die Phosphatase-Aktivität von CaN durch Cyp18 konzentrationsabhängig gehemmt, wenn die Proben mit CsA vorinkubiert wurden.

Als CsA und Gossypol zusammen mit Cyp18 inkubiert wurden, nahm die CaN-Aktivität stärker ab, als bei der Inkubation mit dem CsA/Cyp18-Komplex. Nach Auftragung der Meßwerte im CaN-Aktivität/[Cyp18]-Diagramm entstand eine Kurvenform, die einem Bindungsmodell entsprach, bei dem sich beide Inhibitoren eine Bindungsstelle teilen. Die Modelle, die der Kurvensimulation zugrunde liegen, sind in Abschnitt 3.2.1.16 näher erläutert.

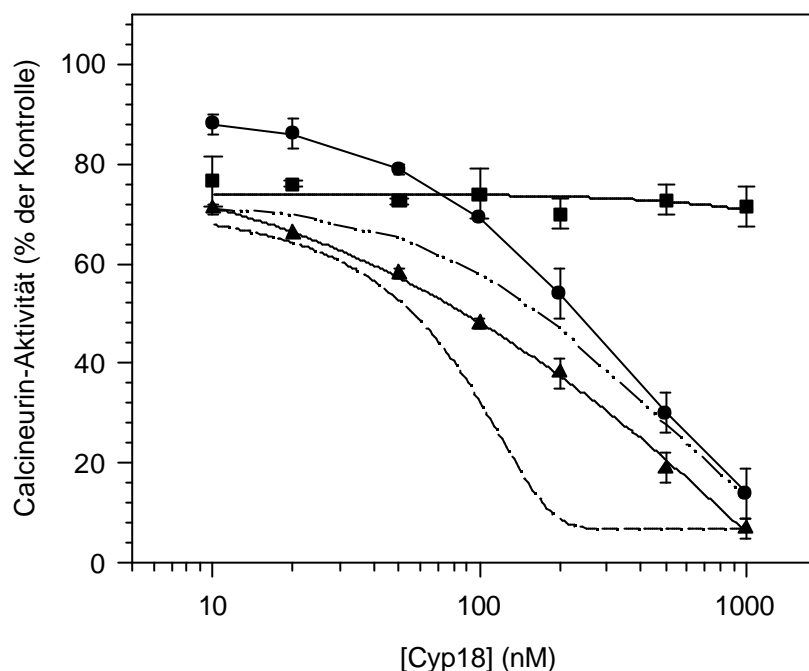


Abb. 4.9: **Simultane Inhibition von CaN durch Gossypol und/oder den CsA/Cyp18-Komplex.**

In dieser Abbildung ist die CaN-Inhibition durch 12  $\mu\text{M}$  Gossypol (■), 10  $\mu\text{M}$  CsA (●) oder einer Mischung, die 12  $\mu\text{M}$  Gossypol und 10  $\mu\text{M}$  CsA enthielt (▲), in Abhängigkeit von der Cyp18-Konzentration im Meßansatz dargestellt. Alle Proben wurden 30 min bei 22°C vorinkubiert. Anschließend wurde die Restaktivität von CaN gegenüber RII-Phosphopeptid gemessen und auf die Phosphatase-Aktivität eines Ansatzes ohne Inhibitor berechnet. Die dargestellten Meßwerte entsprechen dem Mittelwert ( $\pm$  SD) aus drei unabhängigen Experimenten. Durch Simulation einer Inhibition, bei der beide Inhibitoren dieselbe Bindungsstelle beanspruchen, wurde die Kurve (—•—) generiert. Eine Inhibition, bei der sich die Inhibitoren an zwei unterschiedlichen Stellen anlagern, würde eine sigmoide Kurvenform (— —) zeigen.

Um die Annahme einer gleichen Bindungsstelle zu verifizieren, wurde ein Kompetitions-experiment durchgeführt. Dabei wurde rekombinantes Cyp18 kovalent auf einer NHS-aktivierten Matrix über eine Peptidbindung immobilisiert. Anschließend wurde CsA im molaren Überschuß hinzugefügt und mit der Matrix inkubiert. Es bildete sich ein CsA/Cyp18-Binärkomplex. Die Matrix wurde mehrmals mit PBS gewaschen, um überschüssiges CsA zu entfernen. Nachfolgend wurde die Matrix mit CaN inkubiert, so daß sich ein CaN/CsA/Cyp18-Ternärkomplex ausbilden konnte. Dieser Matrix-gebundene Ternärkomplex wurde ebenfalls mit PBS gewaschen, so daß eventuell noch frei vorliegendes CaN entfernt wurde.

Im Elutionsversuch wurde Apogossypol hexaazetat als Kontrolle verwendet, da anzunehmen war, daß diese strukturähnliche Substanz nicht in der Lage ist, an CaN zu binden. Im Anschluß an die 10 minütige Inkubation mit Apogossypol hexaazetat wurde die Matrix für weitere 10 min mit Gossypol inkubiert. Zum Abschluß des Experimentes wurde die Säulen-Matrix mit einer vorinkubierten Mixtur aus CsA und Cyp18 im molaren Verhältnis von 1:1 inkubiert, um nachzuweisen, daß immer noch Teile des Ternärkomplexes vorhanden sind. Wenn CaN noch auf der Säule gebunden ist, dann sollte der CsA/Cyp18-Komplex in der Lösung mit dem immobilisierten CsA/Cyp18-Komplex um die CaN-Bindung konkurrieren und CaN partiell ablösen können. Die entstandenen Eluate wurden eingengt und nach SDS-PAGE und nachfolgendem Western Blot mit einem spezifischen anti-CaN-Antikörper analysiert (Abb. 4.10). Eine Detektion mittels Coomassie-Färbung konnte nicht durchgeführt werden, da die Protein-Mengen unter der Nachweisgrenze lagen. Eine Silberfärbung wäre als Nachweis möglich gewesen, jedoch wurde einem Western Blot der Vorzug gegeben, da mit dieser Methode CaN selektiv detektiert werden kann.

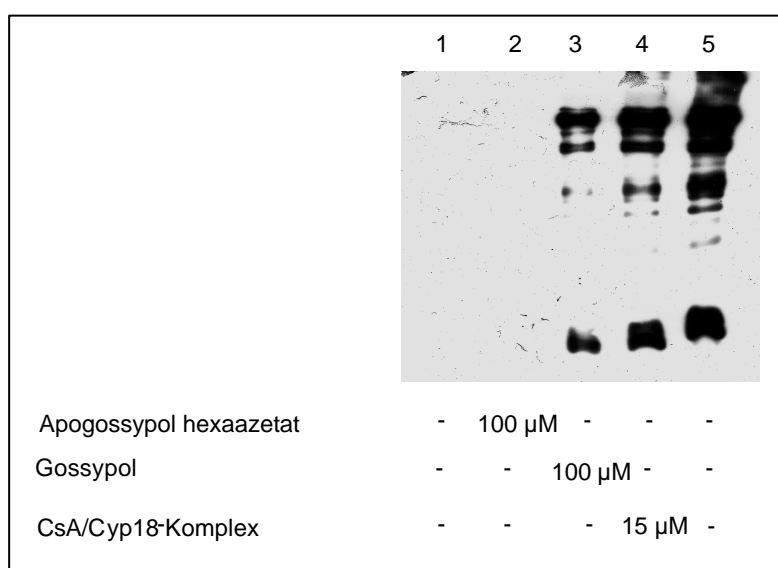


Abb. 4.10: **Elution von CaN von einer CsA/Cyp18-Matrix durch Gossypol.**

Eine CsA/Cyp18-Matrix wurde mit 30 µg CaN für 1 h bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde die Säule mehrmals mit PBS gewaschen (Spur 1: letzter Waschschrift). In Folge wurde die Affinitätssäule mit 100 µM Apogossypol hexaazetat (Spur 2), 100 µM Gossypol (Spur 3) und 15 µM CsA/Cyp18 (Spur 4) inkubiert. Spur 5 enthielt CaN als Referenz für den Western Blot. Die eingengten Eluate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und geblottet. Das CaN wurde mit Hilfe eines anti-CaN-Antikörpers detektiert.

Durch Verdrängung von CaN aus einem CaN/CsA/Cyp18-Ternärkomplex durch Gossypol konnte nachgewiesen werden, daß Gossypol dieselbe Bindungsstelle am CaN beansprucht wie der CsA/Cyp18-Komplex oder zumindest mit ihr überlappt. Apogossypol hexaazetat war nicht in der Lage, mit CsA/Cyp18 um die CaN-Bindung zu konkurrieren. Im Gegensatz dazu wurde durch CsA/Cyp18-Lösung Matrix-gebundenes CaN abgelöst.

Die unvollständige Elution von CaN durch Gossypol kann damit erklärt werden, daß CaN eine 6fach höhere Affinität zu CsA/Cyp18 ( $K_i = 100$  nM) (Swanson et al., 1992) besitzt als zu Gossypol ( $K_i = 15$   $\mu$ M).

#### 4.1.5 Spezifität der Calcineurin-Inhibition durch Gossypol

##### 4.1.5.1 Inhibition von Proteinphosphatasen

Alle Vertreter der Ser/Thr-Proteinphosphatasen haben in ihren aktiven Zentren ein unterschiedlich stark konserviertes „Phosphoesterase-Motiv“. Aus diesem Grund könnte es möglich sein, daß nicht nur CaN (PP2B), sondern auch die PP1, die PP2A oder die PP2C durch Gossypol gehemmt wird. In Phosphatase-Inhibitionsassays wurden deshalb die Wirkungen von 20  $\mu$ M und 100  $\mu$ M Gossypol auf die katalytische Untereinheit der PP1, PP2A aus porcinem Hirn und rekombinanter PP2C untersucht (Abb. 4.11). Als Substrat wurde dafür RII-Phosphopeptid eingesetzt - mit Ausnahme der PP1, da sie nur unzureichend das RII-Phosphopeptid dephosphorylieren kann (Donella-Deana et al., 1994). Deshalb wurde [ $^{33}$ P]-markierte Phosphorylase a als PP1-Substrat verwendet (Antoniw und Cohen, 1976). Außerdem wurde die CaN-Aktivität gegenüber Phospho-Casein in Gegenwart von Gossypol mit ähnlichen Ergebnissen gemessen (Daten nicht gezeigt).

Phosphatase	Phosphatase-Restaktivität (% der Kontrolle)	
	bei 20 $\mu$ M Gossypol	bei 100 $\mu$ M Gossypol
PP1	97	84
PP2A	104	107
PP2B	38	2
PP2C	105	85

Abb. 4.11: **Inhibition von Vertretern aller vier Ser/Thr-Proteinphosphatase-Typen durch Gossypol.** Die inhibitorische Potenz von Gossypol gegenüber anderen Ser/Thr-Phosphatasegruppen wurde mit RII-Phosphopeptid bzw. Phosphorylase a als Substrat in drei unabhängigen Experimenten getestet. Die Meßwerte geben den Mittelwert dieser Versuchsreihen wieder, wobei die Standardabweichung stets  $\leq 7$  % war.

Dabei zeigte sich, daß CaN als einzige Ser/Thr-Proteinphosphatase wirksam von Gossypol inhibiert wird. Bei Gossypol-Konzentrationen, die ca. 5fach über dem  $IC_{50}$ -Wert der CaN-Inhibition liegen, werden aber auch ca. 15 % der PP1- und PP2C-Phosphatase-Aktivitäten gehemmt.

### 4.1.5.2 Inhibition von PPlasen

Die klinisch bereits in großem Umfang eingesetzten immunsuppressiven Substanzen CsA und FK506 haben zahlreiche Nebenwirkungen. Wie bereits in der Einleitung erwähnt, gibt es mehrere Hypothesen, von denen eine besagt, daß die Hemmung der PPlase-Aktivität von Cyclophilinen bzw. FKBP dafür ursächlich sein könnte. Deshalb wurde die PPlase-Aktivität von den drei humanen prototypischen Vertretern der PPlasen (Cyp18, FKBP12 und Par18) in Abhängigkeit von der Gossypol-Konzentration gemessen. Gossypol wurde zusätzlich auf eine Par18-Inhibition untersucht, da für Gossypol eine antimitotische Wirkung in humanen Krebszellen beschrieben ist (Ligueros et al., 1997; Band et al., 1989; Thomas et al., 1991) und eine Inhibition von Par18 zu einem Arrest in der  $G_2$ -Phase der Mitose führt (Winkler et al., 2000; Rippmann et al., 2000). Somit könnte eine Verbindung zwischen beiden Effekten bestehen.

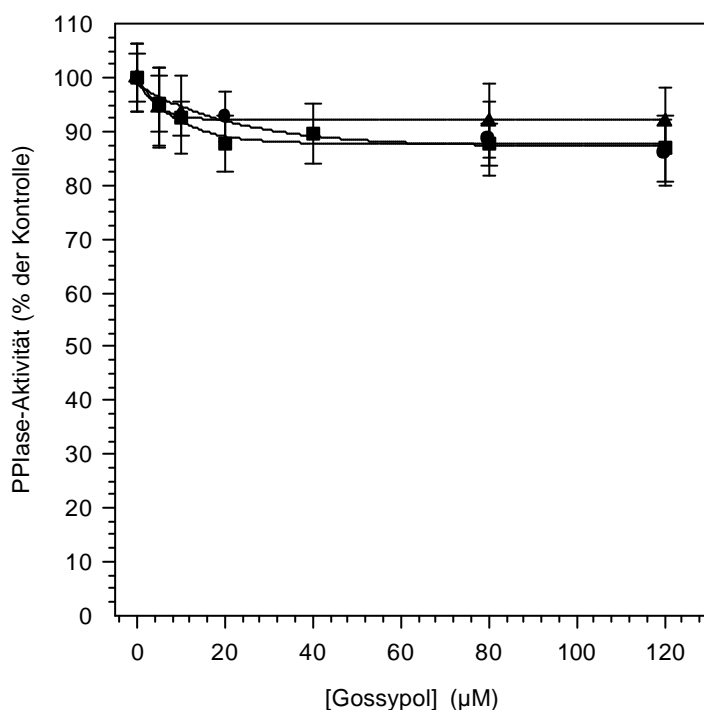


Abb. 4.12: **Inhibition der PPlase-Aktivität von Cyp18, FKBP12 und Par18 durch Gossypol.** Die drei PPlasen Cyp18 (●), FKBP12 (▲) und Par18 (■) wurden mit steigenden Konzentrationen an Gossypol 30 min bei 22°C inkubiert. Die sich anschließende Messung der PPlase-Aktivität erfolgte im Proteasegekoppelten Standard-PPlase-Test. Als Kontrolle wurde eine Probe der jeweiligen PPlase ohne Inhibitor mitgeführt. Die erhaltenen Meßwerte wurden nach einem Geschwindigkeitsgesetz 1. Ordnung angepaßt. Die gezeigten Datenpunkte geben den Mittelwert ( $\pm$  SD) von drei unabhängig durchgeführten Experimenten wieder. Die durchgezogenen Linien wurden zur besseren Visualisierung eingefügt.

Die PPlase-Aktivität von Cyp18, FKBP12 und Par18, als prototypischen Vertretern der humanen PPlasen, wurde nur geringfügig ( $\leq 14\%$ ) durch Gossypol gehemmt. Somit besitzt Gossypol gegenüber CsA und FK506 den Vorteil, daß es keine PPlasen inhibieren kann. Außerdem konnte die Annahme, daß die antimitotische Wirkung von Gossypol mit einer Inhibition der PPlase-Aktivität von Par18 *in vitro* korreliert, nicht bestätigt werden (Abb. 4.12).



#### 4.1.6 Inhibition von Calcineurin durch Gossypol *in vivo*

Nachdem gezeigt werden konnte, daß Gossypol und Gossypolon in der Lage sind, CaN *in vitro* zu inhibieren, stand der Beweis einer CaN-Inhibition durch Gossypol *in vivo* noch aus. Obwohl in der Vergangenheit zahlreiche Versuche unternommen wurden, die intrazelluläre CaN-Aktivität direkt zu messen, müssen diese Versuche als gescheitert eingestuft werden. Die Proteinphosphatase-Aktivität von CaN in der Zelle korreliert nicht unbedingt mit der CaN-Expression. Vielmehr wird dieses Enzym sehr komplex durch andere Faktoren wie Calcium, Calmodulin, endogene Inhibitoren oder Phosphorylierung (?) geregelt (Klee et al., 1979; Lai et al., 1998; Singh und Wang, 1987). Somit ist die Messung der CaN-Aktivität nur indirekt über Veränderungen ihrer physiologischen Substrate möglich. Wie bereits erwähnt, werden alle bislang bekannten Mitglieder der NFAT-Familie (ausgenommen NFATc5) durch CaN dephosphoryliert und dadurch aktiviert. Trotzdem schon zeitig erkannt wurde, daß Gossypol *in vivo* eine relativ hohe Zytotoxizität zeigt (Ye et al., 1983; Tuszynski und Cossu, 1984), wurde diese Substanz nicht nur experimentell, sondern auch *in vivo* als Kontrazeptivum beim Mann angewandt (Liu 1981; Frick und Aulitzky, 1988). Für die Zellversuche mit Gossypol wurden humane T-Lymphozyten ausgewählt, da der CaN/NFAT-Signalweg in diesen Zellen eine große Rolle spielt. Die IL-2-Produktion - ein wichtiges Ereignis der Immunantwort - wird über eine stringente Kopplung an den CaN/NFAT-Signalweg reguliert.

##### 4.1.6.1 Inhibition der NFAT-Translokation in den Zellkern

NFAT liegt im Zytosol unstimulierter T-Lymphozyten in einer phosphorylierten Form vor (Wesselborg et al., 1996). Nach Aktivierung der Zellen durch Antigen/MHC-Komplexe auf der Oberfläche Antigen-präsentierender Zellen (physiologisch) oder anti-CD3/anti-CD28-Antikörper (physiologisch imitiert) oder Phorbol-Ester/ $\text{Ca}^{2+}$ -Ionophor (artifizuell) wird der  $\text{Ca}^{2+}$ /CaN-Signalweg initiiert und zahlreiche zelluläre Proteine - darunter auch NFAT - durch CaN dephosphoryliert (Rooney et al., 1995; Garcia-Rodriguez und Rao, 2000). Infolge der Dephosphorylierung wird eine bis dahin maskierte Kernlokalisationssequenz zugänglich (Okamura et al., 2000b). Dadurch wird NFAT befähigt, im Komplex mit CaN in den Zellkern zu translozieren und dort die Expression von verschiedenen Genen zu starten (Masuda et al., 1997; Pan et al., 1997).

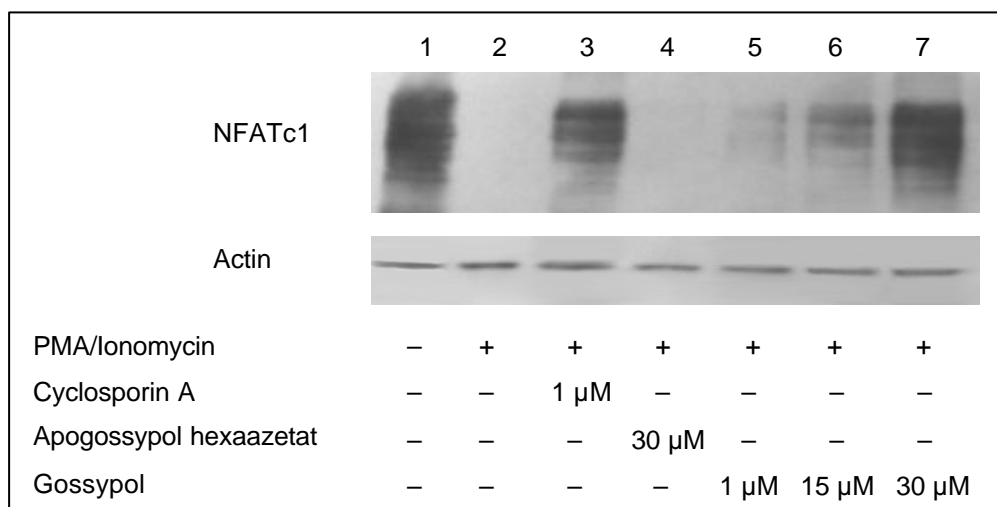


Abb. 4.13: **Inhibition der Translokation von NFATc1 aus dem Zytosol durch Gossypol.**

Humane T-Lymphozyten wurden mit 1  $\mu$ M CsA (Spur 3), 30  $\mu$ M Apogossypol hexaazetat (Spur 4) oder 1  $\mu$ M, 15  $\mu$ M und 30  $\mu$ M Gossypol (Spuren 5, 6, 7) für 10 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 40 nM PMA und 2  $\mu$ M Ionomycin (Spuren 2 bis 7) für 20 min bei 37°C stimuliert. Gleichzeitig wurde eine Probe, die nur DMSO enthielt, als Kontrolle mitgeführt (Spur 1). Die Zellen wurden in hypotonem Puffer lysiert und die zytosolischen Extrakte mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrozellulose-Membran geblottet. Die Detektion des zytosolischen NFATc1 erfolgte durch einen spezifischen Antikörper. Der Blot wurde außerdem mit einem anti-Actin-Antikörper inkubiert, um nachzuweisen, daß in allen Spuren gleiche Proteinmengen aufgetragen wurden.

Wie im Western Blot (Abb. 4.13) zu sehen ist, kann NFATc1 im Zytosol von PMA/Ionomycin-stimulierten T-Zellen nicht mehr nachgewiesen werden. Dieser Effekt kann mit einem Ionomycin-induzierten Anstieg des intrazellulären Calcium-Spiegels erklärt werden, der eine Aktivierung des CaN und damit eine Dephosphorylierung des NFAT nach sich zieht. Die Dephosphorylierung des Transkriptionsfaktors kann durch Applikation von CsA verhindert werden (Spur 3). Das NFAT verbleibt im Zytosol. Die Substanz Gossypol kann *in vivo* ebenfalls die Dephosphorylierung und damit die Translokation von NFAT in den Zellkern in einer konzentrationsabhängigen Weise hemmen. Im Gegensatz dazu zeigte Apogossypol hexaazetat keinen Effekt auf die NFAT-Translokation, da dieses Derivat CaN weder *in vitro* noch *in vivo* beeinflussen kann. Um zu beweisen, daß die beobachteten Effekte nicht auf unterschiedliche Proteinmengen im Western Blot zurückzuführen sind, wurde die Membran anschließend mit einem anti-Actin-Antikörper inkubiert. Kritisch betrachtet ist die Hemmung der Translokation nur ein indirekter Beweis für eine CaN-Inhibition. Die Dephosphorylierung des NFAT könnte theoretisch direkt über einen Mobilitätsshift in der SDS-PAGE detektiert werden (Shaw et al., 1995). Leider war dies mit den kommerziell erhältlichen anti-NFAT-Antikörpern nicht möglich, da sie NFAT nicht als Einzelbande detektieren können.

#### 4.1.6.2 Inhibition der NFAT-Reporter-Gen-Aktivität durch Gossypol

Neben der erhöhten Zugänglichkeit der Kernlokalisationssequenz des NFAT kommt es durch die CaN-vermittelte Dephosphorylierung auch zu einer Änderung der Konformation des Transkriptionsfaktors, in deren Folge auch die Affinität zu spezifischen DNA-Sequenzen steigt (Loh et al., 1996b). Somit führt eine Inhibition des CaN auch zu einer verringerten Affinität des NFAT gegenüber diesen Bindemotiven (Park et al., 1995a). Um den Einfluß von Gossypol auf diesen CaN-vermittelten Effekt zu untersuchen, wurde ein Reporter-Gen-Experiment durchgeführt. Bei diesem Versuch wurden humane T-Lymphozyten mit einem Luciferase-Reporter-Gen-Plasmid transfiziert. Der Promotor und damit die Expression des Enzyms Luciferase wurden von NFAT reguliert. Das NFAT-Bindemotiv im Reporter-Gen-Konstrukt war vom distalen Bereich des humanen IL-2-Promotors abgeleitet. Durch die Bestimmung der Luciferase-Aktivität war es möglich, die exprimierte Enzym-Menge mit der Aktivierung von NFAT zu korrelieren.

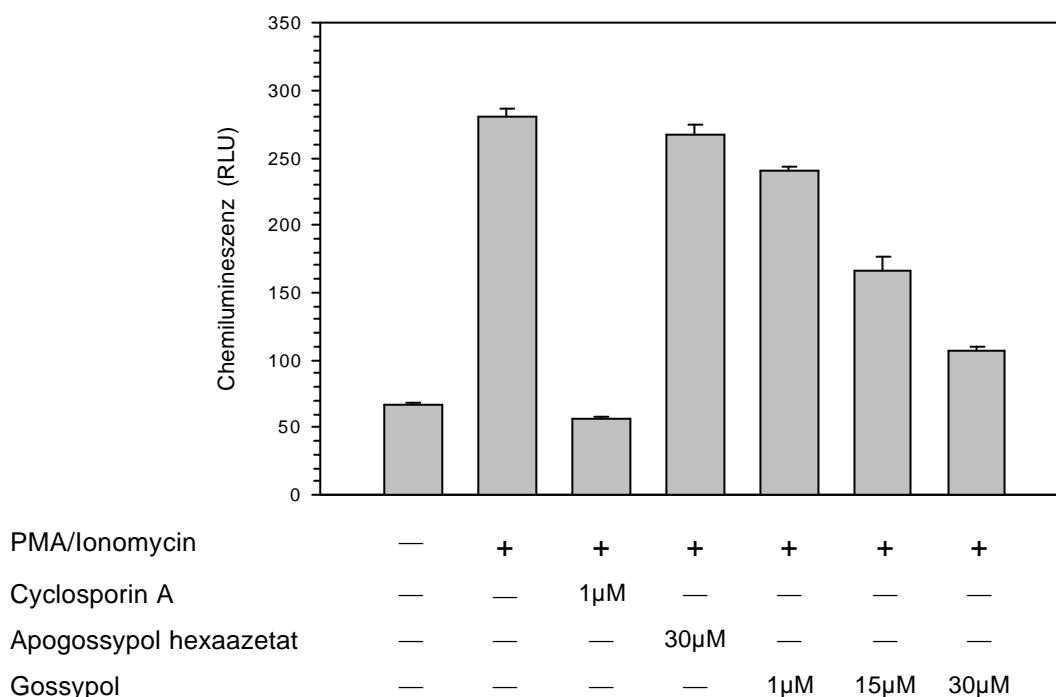


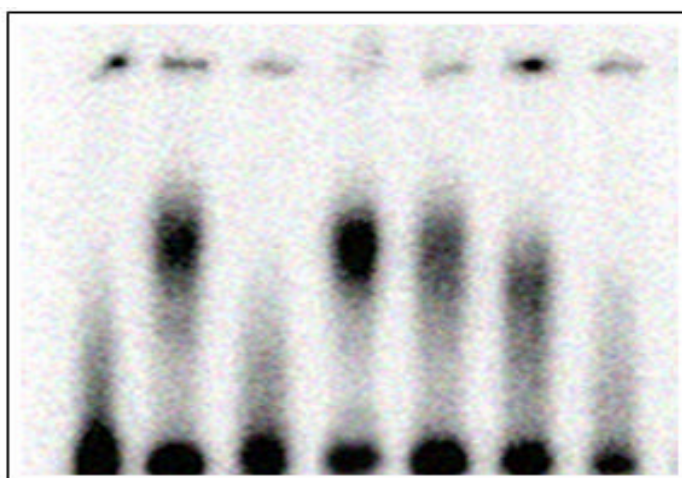
Abb. 4.14: **Inhibition der Luciferase-Expression in einem NFAT-Reporter-Gen-Assay durch Gossypol.**

Humane T-Lymphozyten wurden mit einem NFAT-Reporter-Gen-Konstrukt transfiziert und nachfolgend mit CsA, Apogossypol hexaazetat oder Gossypol für 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die Stimulation der Zellen mit 40 nM PMA und 2 µM Ionomycin für 5 h. Alle T-Lymphozyten wurden durch Zugabe von detergentenhaltigem Puffer und Ultraschall-Behandlung lysiert. Die Messungen der Luciferase-Aktivität im Gesamzell-Lysat erfolgten mit Hilfe eines Luciferase-Assay-Kits nach Angaben des Herstellers und die dabei entstehende Chemilumineszenz wurde mit einem Luminometer detektiert. Die Daten geben den Mittelwert ( $\pm$  SD) aus mehreren unabhängigen Experimenten wieder.

Wie aus Abb. 4.14 ersichtlich ist, ließ sich die CaN-Inhibition *in vivo* auch über die Inhibition der Transkriptionsaktivität von NFAT nachweisen. Durch Stimulation der Zellen mit PMA/Ionomycin steigt die NFAT-Transkriptionsaktivität und damit auch die Luciferase-Aktivität an. Erwartungsgemäß hemmt CsA bei einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  die Expression des Enzyms vollständig, was Li und HANDSCHUMACHER in Jurkat-Zellen ebenso beobachten konnten (Li und Handschumacher, 1996). Apogossypol hexaazetat hat auch in diesem Experiment keinen Einfluß auf den CaN/NFAT-Signalweg. Im Gegensatz dazu kann Gossypol die NFAT-kontrollierte Luciferase-Expression in stimulierten T-Lymphozyten in einer konzentrationsabhängigen Weise inhibieren.

#### 4.1.6.3 Veränderungen im NFAT-Gelshift durch Gossypol

Um die Ergebnisse aus dem vorherigen Abschnitt zu verifizieren, wurde ein elektrophoretischer Mobilitätsshift-Assay durchgeführt. Das Prinzip dieses Tests besteht in der Anlagerung einer radioaktiv markierten DNA-Sequenz an ein Protein und der nachfolgenden Auftrennung in einer nativen PAGE in Verbindung mit einer Autoradiografie.



PMA/Ionomycin	—	+	+	+	+	+	+
Cyclosporin A	—	—	1 $\mu\text{M}$	—	—	—	—
Apogossypol hexaazetat	—	—	—	30 $\mu\text{M}$	—	—	—
Gossypol	—	—	—	—	1 $\mu\text{M}$	15 $\mu\text{M}$	30 $\mu\text{M}$

Abb. 4.15: **Nachweis einer Gossypol-bedingten CaN-Inhibition durch EMSA mit NFAT-Bindemotiv.**

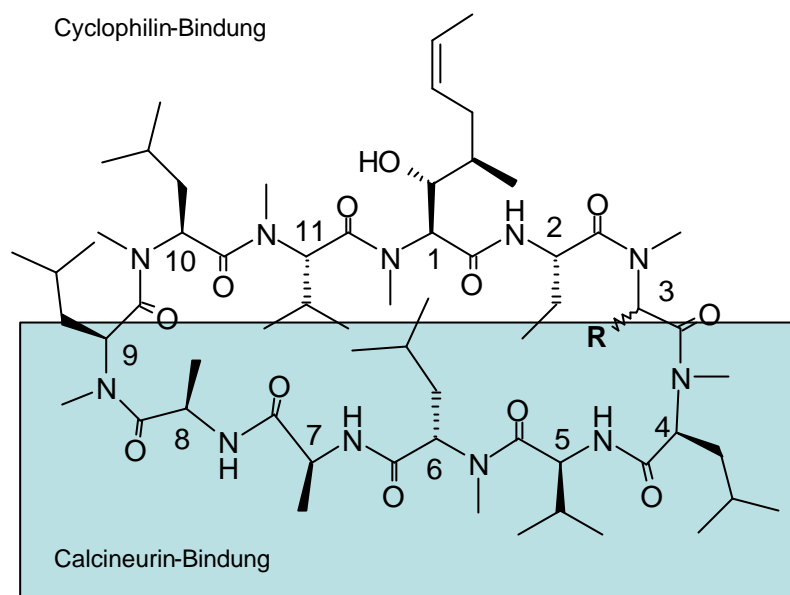
Humane T-Lymphozyten wurden mit CsA, Apogossypol hexaazetat oder Gossypol für 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die Stimulation der Zellen mit 40 nM PMA und 2  $\mu\text{M}$  Ionomycin für weitere 30 min. Nach hypotoner Lyse der T-Zellen wurden die Zellkerne isoliert und daraus Kernextrakte präpariert. Gleiche Mengen von Kernproteinen wurden mit einem radioaktiv markierten distalen Fragment des humanen IL-2-Promotors für 30 min bei 22°C inkubiert und durch native 6 %ige PAGE aufgetrennt. Die Radioaktivität im Gel konnte durch Autoradiografie visualisiert werden.

Dabei sind im Idealfall das freie Oligonukleotid und das Protein-gebundene Oligonukleotid zu detektieren. Aufgrund der höheren Molmasse des DNA/Protein-Komplexes im Vergleich zur freien DNA sollte dieser durch verminderte elektrophoretische Mobilität im Gel retardiert werden. So zeigt Abb. 4.15 einen EMSA, bei dem Kernextrakte von CsA-, Apogossypol hexaazetat- und Gossypol-behandelten humanen T-Zellen mit einer radioaktiv markierten DNA-Sequenz aus dem humanen IL-2-Promotor inkubiert wurden. In einer nativen PAGE wurde das NFAT-gebundene Nukleotid vom freien Nukleotid separiert und autoradiografisch detektiert. Mit diesem Versuch konnte nicht nur die Translokation des NFAT vom Zytosol in den Nukleus, sondern auch die veränderte Affinität zu spezifischen NFAT-Bindemotiven als Folge der Dephosphorylierung durch CaN analysiert werden. Die durch dieses Experiment gewonnenen Ergebnisse bestätigen die bereits vorliegenden Daten der vorausgegangenen Meßreihen.

## 4.2 CaN-Inhibition durch Cyclosporin-Derivate

Es ist seit 1976 bekannt, daß das zyklische Undekapeptid CsA, welches aus dem Pilz *Tolypocladium inflatum* isoliert wird, die Immunreaktion supprimieren kann (Borel et al., 1976). Diese Eigenschaft macht den Naturstoff CsA zu einem Standardmedikament (Sandimmun<sup>®</sup>, Neoral<sup>®</sup>) in der Prophylaxe und Therapie von Abstoßungsreaktionen nach Allo- und Xenotransplantationen (Wang et al., 1981; Sablinski et al., 1997) und schweren pathologischen Immunreaktionen (Manger et al., 1996). Der vermutete molekulare Mechanismus der immunsuppressiven Wirkung des CsA erfordert die gleichzeitige Interaktion von unterschiedlichen Bereichen des Moleküls mit CaN und eines Cyclophilins (Fischer et al., 1989a; Liu et al., 1991; Schreiber et al., 1992). CsA enthält mehrere nicht-proteinogene Aminosäuren wie (L)-2-Aminobuttersäure, D-Alanin oder (4R)-4-[(E)-2-butenyl]-4-Methyl-(L)-Threonin (MeBmt). Außerdem sind sieben Peptidbindungen N-methyliert. Diese ungewöhnlichen Strukturelemente machen CsA zu einem sehr hydrophoben, aber auch sehr proteasestabilen Molekül. Neben der Immunsuppression zeigt CsA noch weitere biologische Aktivitäten, wie z.B. antiinflammatorische (Rutgeerts, 1998), antifungale (Kirkland und Fierer, 1983) und antiparasitäre (Bell et al., 1996) Wirkungen. Die Immunsuppression ist aber die wichtigste Eigenschaft des CsA, weshalb in den letzten Jahrzehnten große Anstrengungen unternommen wurden neue CsA-Derivate zu synthetisieren. Diese sollten neben einer gesteigerten Wirksamkeit vor allem weniger Nebenwirkungen wie Nephrotoxizität, Hypertension, Enzephalopathien und Malignome zeigen.

Von Dr. Zhang (MPG, Halle) wurden mir CsA, zwei CsA-Derivate und [Ac-MeBmt]<sup>1</sup>CsH zur enzymkinetischen und zellbiologischen Charakterisierung überlassen.



Cyclosporin	Position 1	Position 3	Position 8	Position 11
CsA	MeBmt	L-Sar	D-Ala	Me-L-Val
[AD-Ser] <sup>8</sup> CsA	MeBmt	L-Sar	O-(NH <sub>2</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> NHC(O)CH <sub>2</sub> -) D-Ser	Me-L-Val
[DAT-Sar] <sup>3</sup> CsA	MeBmt	L-Sar-SCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> NMe <sub>2</sub>	D-Ala	Me-L-Val
[Ac-MeBmt] <sup>1</sup> CsH	MeBmt-OC(O)CH <sub>3</sub>	L-Sar	D-Ala	Me-D-Val

Abb. 4.16: **Struktur von CsA, [AD-Ser]<sup>8</sup>CsA, [DAT-Sar]<sup>3</sup>CsA und [Ac-MeBmt]<sup>1</sup>CsH**

Das zyklische Peptid CsA besteht aus 11 Aminosäuren, von denen 9 nicht proteinogen sind. Im CsA-Derivat [AD-Ser]<sup>8</sup>CsA ist das D-Alanin in Position 8 durch ein (2-Amino-3-[(5-amino-pentylcarbamoyl)-methoxy]-propionyl-D-Serin ersetzt, während das L-Sarkosin in Position 3 nicht verändert wurde. Im Gegensatz dazu wurde im [DAT-Sar]<sup>3</sup>CsA das D-Alanin in Position 3 beibehalten, während das L-Sarkosin in Position 3 zu einem (R) $\alpha$ -N,N-Dimethylaminoethylthio-L-Sarkosin modifiziert wurde und als Methansulfonat vorliegt. Das Methyl-Valin liegt - entgegen der sonst vorherrschenden L-Konformation - im Cyclosporin H-Derivat [Ac-MeBmt]<sup>1</sup>CsH in der D-Konformation vor. Außerdem ist die Hydroxyl-Gruppe des MeBmt in Position 1 acetyliert. Die blau unterlegten Aminosäuren sind vermutlich wichtig für die Bindung der Proteinphosphatase CaN und die restlichen Aminosäuren für die Bindung des Cyclophilins.

Aufgrund von enzymkinetischen Vorversuchen wurden [AD-Ser]<sup>8</sup>CsA und [DAT-Sar]<sup>3</sup>CsA für die Studien ausgewählt. Zum Vergleich wurden CsA und [Ac-MeBmt]<sup>1</sup>CsH in alle Versuchsreihen mit einbezogen. In Abb. 4.16 ist die Struktur von CsA und der durch chemische Modifikation erhaltenen CsA-Derivate [AD-Ser]<sup>8</sup>CsA und [DAT-Sar]<sup>3</sup>CsA dargestellt. Die Aminosäuren, die vermutlich zur Bindung von CaN beitragen, sind in der Abbildung blau unterlegt. Die Struktur des CaN/CsA/Cyp18-Ternärkomplexes wurde erst kürzlich aufgeklärt (Huai et al., 2002). Von CaN im Komplex mit anderen natürlichen, semi- und synthetischen Cyclosporinen, welche in unterschiedlichen Positionen verändert wurden, ist keine Strukturinformation verfügbar.

Diese Verbindungen wurden aber umfangreich in zahlreichen enzymologischen und zellbiologische Untersuchungen charakterisiert (Papageorgiou et al., 1997; Paprica et al., 1992). Bei der CsA-Biosynthese sind die Positionen 3 und 8 hoch konserviert, während andere - wie z.B. die Position 2 - relativ variant sind (Lawen und Traber, 1993).

#### 4.2.1 Inhibition der PPlase-Aktivität durch Cyclosporine

Wie FISCHER et al. zeigen konnten, wird die Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerase-Aktivität von Cyp18 schon von geringen Konzentrationen an CsA inhibiert (Fischer et al., 1989b). Um zu testen, ob die vorliegenden Cyclosporin-Derivate diese PPlase auch hemmen können, wurden die  $IC_{50}$ -Werte für die Cyp18-Inhibition nach der publizierten Methode von FISCHER et al. bestimmt (Fischer et al., 1989b).

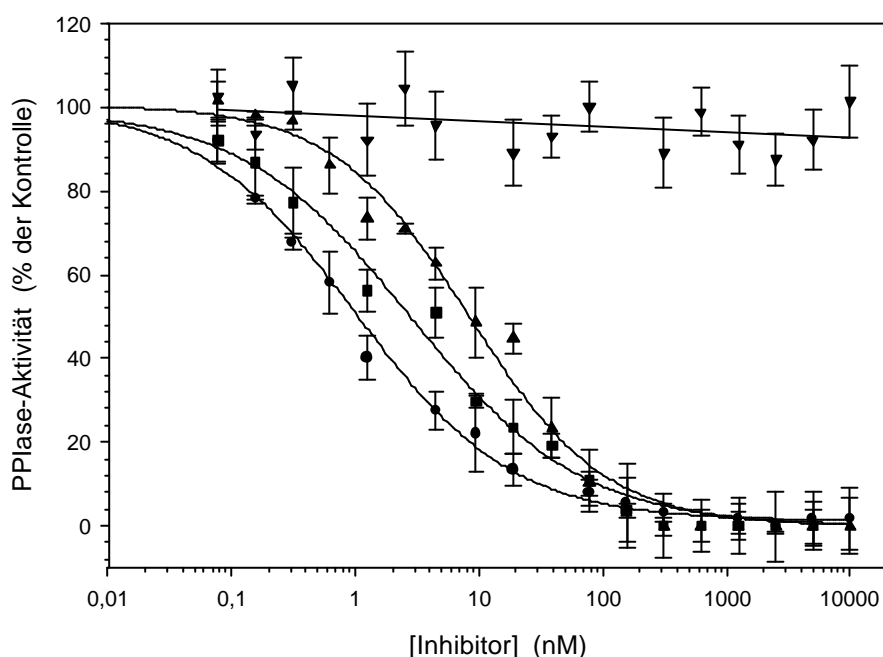


Abb. 4.17: Inhibition der PPlase-Aktivität durch CsA, [DAT-Sar]<sup>3</sup>CsA, [AD-Ser]<sup>8</sup>CsA und [Ac-MeBmt]<sup>1</sup>CsH. Die Messung der PPlase-Aktivität erfolgte im Protease-gekoppelten Test nach FISCHER et al. (Fischer et al., 1989b) mit Suc-Ala-Phe-Pro-Phe-pNA als Substrat. Rekombinantes Cyclophilin18 wurde mit verschiedenen Konzentrationen an CsA (●), [DAT-Sar]<sup>3</sup>CsA (■), [AD-Ser]<sup>8</sup>CsA (▲) und [Ac-MeBmt]<sup>1</sup>CsH (▼) für 30 min bei 22°C vorinkubiert. Nach einer weiteren 20 minütigen Temperierungsphase in Anwesenheit des Substrates erfolgte der Start der Messung durch Zugabe von  $\alpha$ -Chymotrypsin zum Meßansatz. Der Verlauf der Reaktion konnte durch Zunahme der Extinktion bei 390 nm spektrophotometrisch verfolgt werden. Die erhaltenen Kurven wurden nach einem Geschwindigkeitsgesetz 1. Ordnung angepaßt. Die Daten entsprechen den Mittelwerten ( $\pm$  SD) von drei unabhängigen Meßreihen.

Wie bereits in der Literatur beschrieben, inhibiert das verwendete CsA die PPlase-Aktivität von Cyp18 auch im unteren nanomolaren Bereich. Unter diesen Bedingungen wurden folgende  $IC_{50}$ -Werte gemessen:

für CsA  $1.3 \pm 0.1$  nM, für  $[\text{DAT-Sar}]^3\text{CsA}$   $3.6 \pm 0.4$  nM und für  $[\text{AD-Ser}]^8\text{CsA}$   $10.2 \pm 1$  nM. Es ist somit sicher, daß sowohl CsA als auch  $[\text{DAT-Sar}]^3\text{CsA}$  und  $[\text{AD-Ser}]^8\text{CsA}$  mit Cyp18 binäre Komplexe bilden können. Das CsH-Derivat  $[\text{Ac-MeBmt}]^1\text{CsH}$  ist in einer Konzentration von  $10 \mu\text{M}$  jedoch nur in der Lage, 7 % der Enzym-Aktivität zu inhibieren. Die Substanz CsH kann die PPlase-Aktivität von Cyp18 ca. 1000fach schlechter hemmen als CsA. Diese Tatsache ist in der Literatur bereits mehrmals beschrieben (de Paulis et al., 1996) und könnte auf sterische Gründe zurückgeführt werden. Die Acetylierung des MeBmt-Restes im CsH wurde vorgenommen, um die Affinität zu Cyp18 weiter zu senken.

#### 4.2.2 Calcineurin-Inhibition durch Cyclosporine *in vitro*

Um zu testen, ob diese Cyclosporin-Derivate allein oder im Komplex mit Cyp18 auch die Enzym-Aktivität von CaN verändern können, wurden sie in einem CaN-Assay untersucht. Es ist bekannt, daß schon nanomolare Konzentrationen von CsA im Komplex mit Cyp18 die Proteinphosphatase-Aktivität von CaN wirksam hemmen können (Liu et al., 1991).

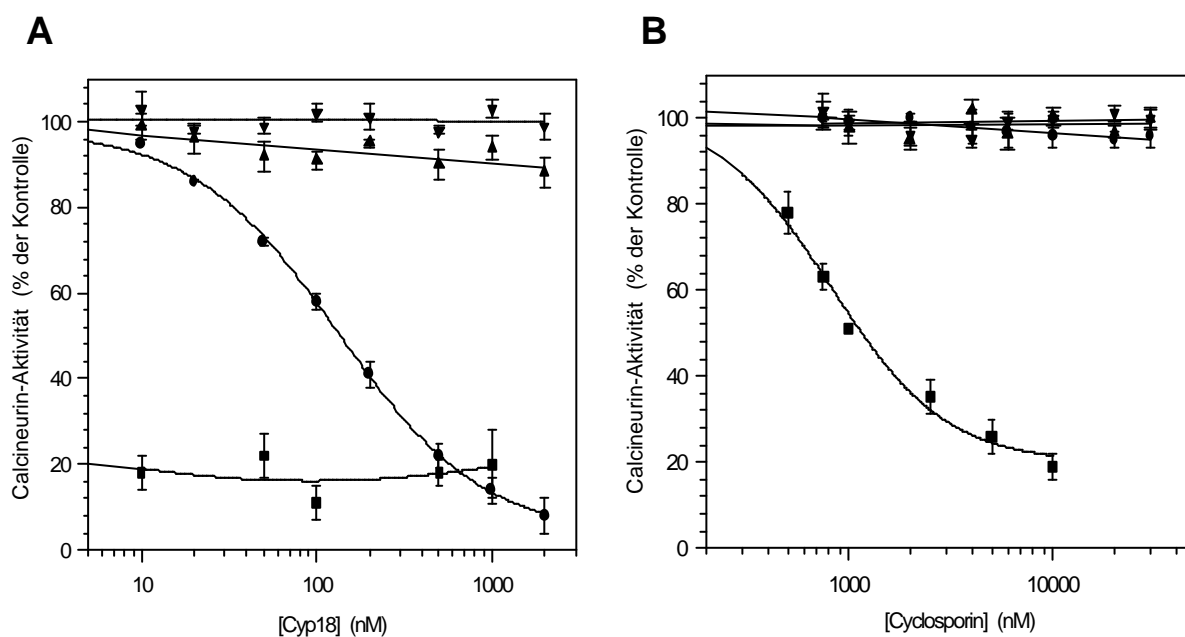


Abb. 4.18: Inhibition von CaN durch CsA,  $[\text{DAT-Sar}]^3\text{CsA}$ ,  $[\text{AD-Ser}]^8\text{CsA}$  und  $[\text{Ac-MeBmt}]^1\text{CsH}$ , gemessen im CaN-Assay mit RII-Phosphopeptid als Substrat.

Zur Messung der CaN-Inhibition durch CsA (●),  $[\text{DAT-Sar}]^3\text{CsA}$  (■),  $[\text{AD-Ser}]^8\text{CsA}$  (▲) und  $[\text{Ac-MeBmt}]^1\text{CsH}$  (▼) wurden die Substanzen (A) in einer Konzentration von  $10 \mu\text{M}$  mit steigenden Konzentrationen an Cyp18 für 30 min bei  $22^\circ\text{C}$  vorinkubiert. Dieses Gemisch oder steigende Konzentrationen der Einzelsubstanzen (B) wurden weitere 30 min bei  $22^\circ\text{C}$  mit CaN/Calmodulin in Assay-Puffer inkubiert. Die Messung erfolgte anschließend im Standard-CaN-Assay mit RII-Phosphopeptid als Substrat. Die gezeigten Daten entsprechen den Mittelwerten ( $\pm$  SD) von drei unabhängigen Meßreihen.



Um die inhibitorische Potenz von CsA, [AD-Ser]<sup>8</sup>CsA und [DAT-Sar]<sup>3</sup>CsA im Komplex mit Cyp18 gegenüber CaN zu messen, wurden 10  $\mu$ M der jeweiligen Verbindung mit steigenden Konzentrationen an Cyp18 für 30 min bei 22°C vorinkubiert. Anschließend erfolgte ein weiterer Inkubationsschritt mit CaN/Calmodulin in Assay-Puffer. Da die CsA-Derivate *tight binding*-Inhibitoren für Cyclophiline sind, kann die Konzentration des CaN-inhibierenden CsA/Cyp18-Komplexes über die Konzentration des Cyclophilins im Meßansatz eingestellt werden. Obwohl CsA, [DAT-Sar]<sup>3</sup>CsA und [AD-Ser]<sup>8</sup>CsA die PPIase-Aktivität von Cyp18 inhibieren können, zeigen nur CsA und [DAT-Sar]<sup>3</sup>CsA auch eine Hemmung der Phosphatase-Aktivität von CaN (Abb. 4.18 A). Das in der putativen CaN-Binderegion modifizierte [AD-Ser]<sup>8</sup>CsA ist dazu nicht befähigt, genauso wie [Ac-MeBmt]<sup>1</sup>CsH. Der IC<sub>50</sub>-Wert der CaN-Inhibition beträgt für den CsA/Cyp18-Komplex  $110 \pm 9$  nM. Dieser Wert stimmt sehr gut mit den bereits publizierten Werten anderer Arbeitsgruppen überein (Liu et al., 1991) und wurde auch mit Phospho-Casein als Substrat bestätigt. Überraschenderweise konnte für [DAT-Sar]<sup>3</sup>CsA aus diesen Meßdaten eine Cyclophilin-unabhängige CaN-Inhibition abgeleitet werden (Abb. 4.18).

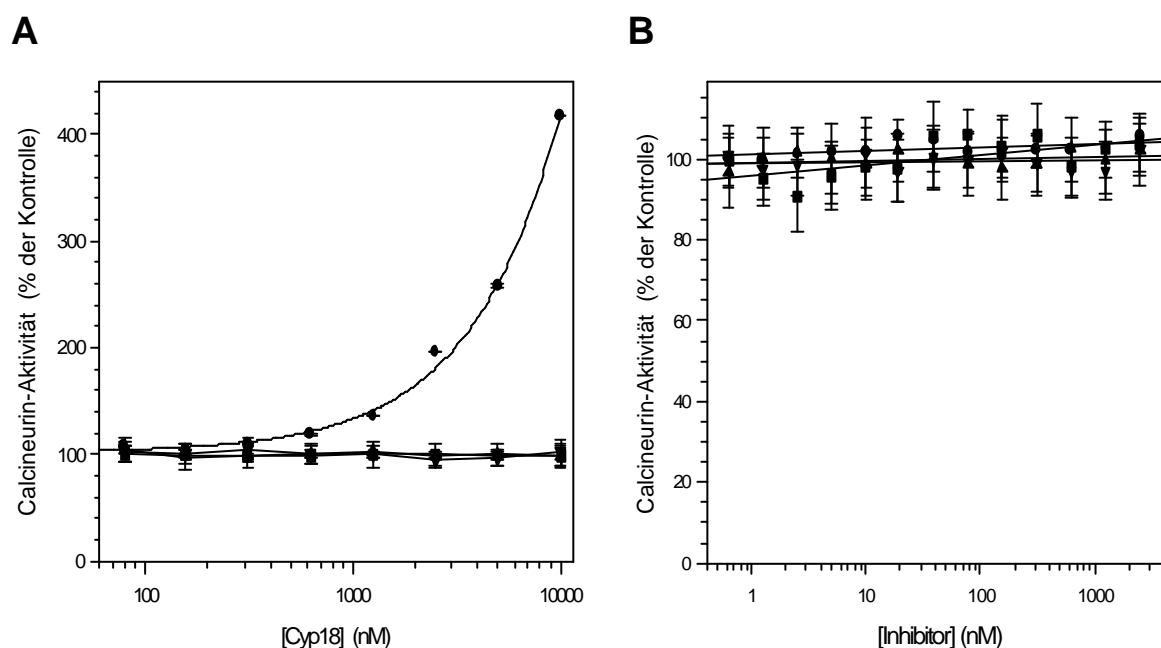


Abb. 4.19: Inhibition von CaN durch CsA, [DAT-Sar]<sup>3</sup>CsA, [AD-Ser]<sup>8</sup>CsA und [Ac-MeBmt]<sup>1</sup>CsH im CaN-Assay, gemessen mit pNPP als Substrat.

Zur Messung der CaN-Inhibition durch CsA (●), [DAT-Sar]<sup>3</sup>CsA (■), [AD-Ser]<sup>8</sup>CsA (▲) und [Ac-MeBmt]<sup>1</sup>CsH (▼) wurden die Substanzen in einer Konzentration von 10  $\mu$ M mit steigenden Konzentrationen an Cyp18 für 30 min bei 22°C vorinkubiert. Dieses Gemisch (A) oder steigende Konzentrationen der Einzelsubstanzen (B) wurden weitere 30 min bei 22°C mit CaN/Calmodulin in Assay-Puffer inkubiert. Die Messung erfolgte anschließend im CaN-Test mit pNPP als Substrat. Zur Berechnung der Phosphatase-Aktivitäten wurden die Anfangsanstiege der Dephosphorylierung nach vorheriger linearer Regression verwendet. Die gezeigten Daten entsprechen den Mittelwerten ( $\pm$  SD) von drei unabhängigen Meßreihen.

Zur Bestätigung dieses Befundes wurden die verwendeten Cyclosporine ohne Cyp18 mit CaN/Calmodulin in Assay-Puffer inkubiert. Für die Messung wurde RII-Phosphopeptid als Substrat eingesetzt (Abb. 4.18 B). Nach Auswertung der vorliegenden Daten konnte für  $[\text{DAT-Sar}]^3\text{CsA}$  ein  $\text{IC}_{50}$ -Wert von  $1 \pm 0.1 \mu\text{M}$  bestimmt werden. Das CsA-Derivat  $[\text{DAT-Sar}]^3\text{CsA}$  kann CaN unabhängig von der Bindung an Cyp18 inhibieren. Ohne Cyp18-Zusatz hatten weder CsA noch  $[\text{AD-Ser}]^8\text{CsA}$  oder  $[\text{Ac-MeBmt}]^1\text{CsH}$  einen Einfluß auf die CaN-Aktivität.

In einem anderen CaN-Assay mit dem unphysiologischen Substrat pNPP wurde zusätzlich untersucht, ob die Substanzen auch in diesem Test die Phosphatase-Aktivität beeinflussen können. Analog zu den bereits durchgeführten Messungen mit dem RII-Phosphopeptid wurde die Substanz-Konzentration oder wenn diese konstant war, alternativ die Cyp18-Konzentration variiert (Abb. 4.18 A). Für CsA konnte die typische und in Publikationen bereits mehrmals beschriebene Aktivierung der Phosphatase-Aktivität durch den CsA/Cyp18-Komplex beobachtet werden (Liu et al., 1991; Swanson et al., 1992).

Die Enzym-Aktivität von CaN blieb bei Messungen mit pNPP als Substrat durch  $[\text{DAT-Sar}]^3\text{CsA}$ ,  $[\text{AD-Ser}]^8\text{CsA}$  und  $[\text{Ac-MeBmt}]^1\text{CsH}$  in Gegenwart von Cyp18 unbeeinflusst. Auch in Meßreihen, in denen die Substanzen ohne die Cyp18 mit CaN und pNPP inkubiert wurden, war keine Veränderung der CaN-Aktivität zu verzeichnen (Abb. 4.18 B).

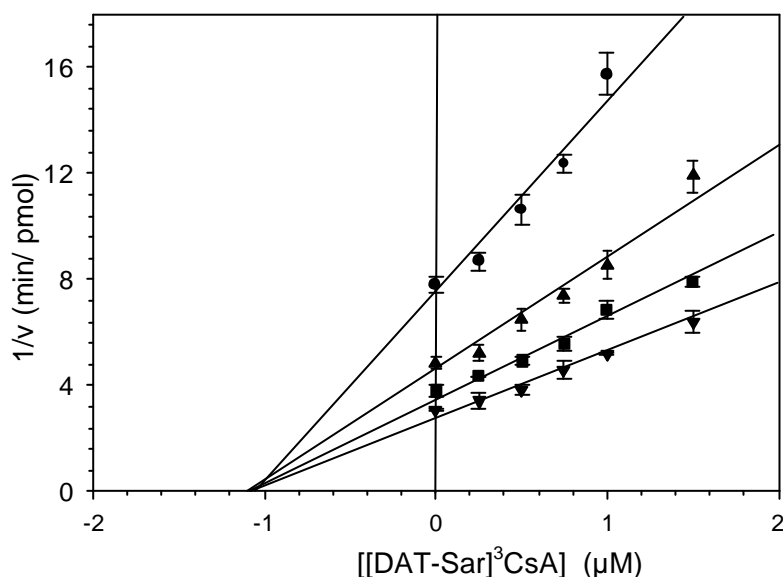


Abb. 4.20: **Dixon-Plot der CaN-Inhibition durch  $[\text{DAT-Sar}]^3\text{CsA}$ .**

CaN wurde mit steigenden Konzentrationen von  $[\text{DAT-Sar}]^3\text{CsA}$  inhibiert. Zur Messung wurden folgende Substratkonzentrationen eingesetzt:  $5 \mu\text{M}$  (●),  $8 \mu\text{M}$  (▲),  $10 \mu\text{M}$  (■), und  $15 \mu\text{M}$  (▼) RII-Phosphopeptid (Gemisch aus biotinyliertem und unbiotinyliertem RII-Phosphopeptid in einem molaren Verhältnis von 1:200). Die Daten repräsentieren die Mittelwerte ( $\pm$  SD) von drei unabhängigen Versuchen.

Um den  $K_i$ -Wert und den Hemmtyp der CaN-Inhibition durch  $[\text{DAT-Sar}]^3\text{CsA}$  zu ermitteln, wurde die Enzym-Aktivität mit steigenden Konzentrationen an  $[\text{DAT-Sar}]^3\text{CsA}$  bei unterschiedlichen Konzentrationen des RII-Phosphopeptid-Substrates im Ansatz gemessen. Die erhaltenen Meßwerte wurden in einem Dixon-Plot aufgetragen. Für einen kompetitiven Inhibitor sollten die Geraden ein Strahlenbündel mit Schnittpunkt über der  $y$ -Achse bilden. Der dazugehörige  $y$ -Wert ist der negative  $K_i$ -Wert. Im Falle eines nicht-kompetitiven Inhibitors sollte ein Strahlenbündel entstehen, dessen Schnittpunkt jedoch auf der  $y$ -Achse liegt. Bei einem unkompetitiven Inhibitor schneiden sich die Kurven nicht, da eine Parallelschar entsteht. Bei einem nicht-kompetitiven Inhibitor entsteht ein Strahlenbündel. Dessen Schnittpunkt mit der  $y$ -Achse entspricht bei  $[\text{S}]=\infty$  dem negativen  $K_i$ -Wert.

Wie in Abb. 4.19 zu sehen ist, liegt bei der CaN-Inhibition durch  $[\text{DAT-Sar}]^3\text{CsA}$  ein nicht-kompetitiver Hemmtyp vor. Als ungefährer  $K_i$ -Wert dieser Enzym-Hemmung wurde  $1.1 \pm 0.1 \mu\text{M}$  ermittelt. Dieser Wert ist nahezu identisch mit dem aus Abb. 4.18 B bestimmten  $\text{IC}_{50}$ -Wert von  $1 \mu\text{M}$ . Da außerdem geklärt werden mußte, ob  $[\text{DAT-Sar}]^3\text{CsA}$  auch im Komplex mit Cyp18 CaN inhibieren kann, wurde ein Konkurrenzexperiment durchgeführt.

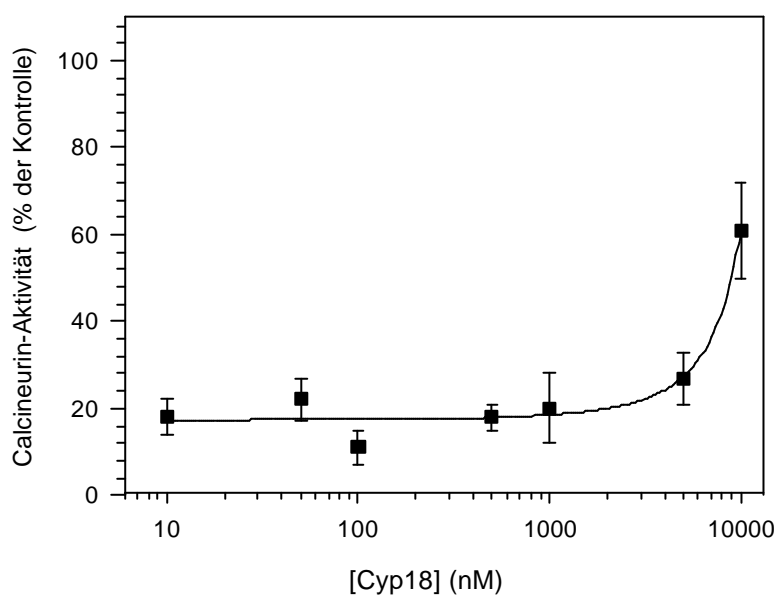


Abb. 4.21: **Kompetition des an CaN gebundenen  $[\text{DAT-Sar}]^3\text{CsA}$  durch Cyp18.**

Die CaN-Aktivität wurde mit RII-Phosphopeptid gemessen, nachdem ein durch Vorinkubation gebildeter dimere  $[\text{DAT-Sar}]^3\text{CsA}/\text{CaN}$ -Komplex mit steigenden Konzentrationen an Cyp18 für 30 min bei  $30^\circ\text{C}$  inkubiert wurde. Die Daten geben die Mittelwerte ( $\pm$  SD) von drei unabhängigen Versuchen wieder.

Durch steigende Konzentrationen von Cyp18 im Reaktionsansatz wurde versucht, das CaN-gebundene  $[\text{DAT-Sar}]^3\text{CsA}$  zu kompetitieren und so die Phosphatase-Aktivität des Enzyms zu erhöhen. Tatsächlich gelang es, die CaN-Aktivität durch einen Cyp18-Zusatz um mehr als den Faktor 3 zu steigern (Abb. 4.21).

Neben diesem enzymkinetischen Beweis wurden noch weitere proteinchemische Methoden eingesetzt, um diese Annahme zu erhärten. So wurde Cyp18 als GST-Fusionsprotein zusammen mit CaN und den Inhibitoren CsA oder [DAT-Sar]<sup>3</sup>CsA bzw. DMSO als Kontrolle inkubiert (Abb. 4.21).

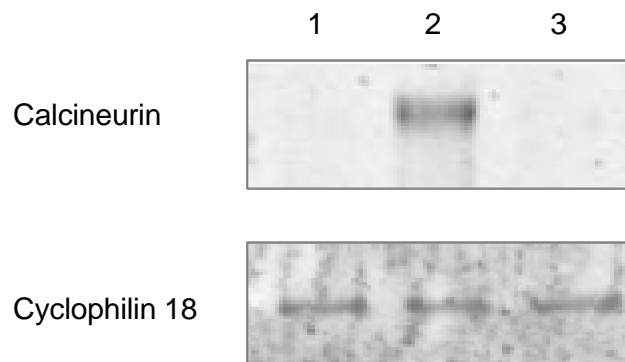


Abb. 4.22: **Präzipitation eines trimeren CaN/Inhibitor/GST-Cyp18-Komplexes.**

GST-Cyp18 wurde mit CaN in Anwesenheit von DMSO (Spur 1), 10 μM CsA (Spur 2) oder 10 μM [DAT-Sar]<sup>3</sup>CsA (Spur 3) für 20 min bei 22°C inkubiert und anschließend mit Glutathion-Sepharose präzipitiert. Die gebundenen Proteine wurden eluiert und mittels SDS-PAGE aufgetrennt, um nach dem Blotten mit einem anti-CaN- und anti-Cyp18-Antikörper analysiert zu werden.

Obwohl beide Cyclosporine an GST-Cyp18 binden und die PPlase-Aktivität des Fusionsproteins inhibieren können (Daten nicht gezeigt), war nur der CsA/GST-Cyp18-Komplex in der Lage, CaN zu binden. Durch die Inkubation der Membran mit einem anti-Cyp18-Ab wurde bewiesen, daß gleiche Proteinmengen an Cyp18 verwendet wurden.

### 4.2.3 Spezifität der Calcineurin-Inhibition durch [DAT-Sar]<sup>3</sup>CsA

In umfangreichen Meßreihen mit radioaktiv markiertem Phospho-Casein und Phosphorylase a wurde der Fragestellung nachgegangen, wie spezifisch CaN durch [DAT-Sar]<sup>3</sup>CsA gehemmt wird. Es könnte sein, daß ein Teil der CaN-Spezifität des CsA/Cyp18-Komplexes durch die Proteinkomponente vermittelt wird.

In diesen Experimenten wurden sowohl die PP1, PP2A, PP2B (CaN) als auch die PP2C mit zwei Konzentrationen an [DAT-Sar]<sup>3</sup>CsA oder einem äquimolaren CsA/Cyp18-Gemisch für 20 min bei 22°C inkubiert. Die Messung der PP1-Aktivität erfolgte mit Phosphorylase a, die der anderen Ser/Thr-Proteinphosphatasen mit Phospho-Casein als Substrat.

Phosphatase	Phosphatase-Restaktivität (% der Kontrolle)		
	bei 20 $\mu\text{M}$ [DAT-Sar] <sup>3</sup> CsA	bei 100 $\mu\text{M}$ [DAT-Sar] <sup>3</sup> CsA	bei 100 $\mu\text{M}$ CsA/Cyp18
PP1	104	95	97
PP2A	96	102	104
PP2B	18	5	0
PP2C	94	107	99

Abb. 4.23: **Inhibition von vier Ser/Thr-Proteinphosphatase-Typen durch [DAT-Sar]<sup>3</sup>CsA und CsA/Cyp18.** Die inhibitorische Potenz von zwei verschiedenen [DAT-Sar]<sup>3</sup>CsA-Konzentrationen und eines äquimolaren CsA/Cyp18-Gemisches gegenüber anderen Ser/Thr-Phosphatasen wurde mit Phosphorylase a bzw. Phospho-Casein als Substrat in drei unabhängigen Experimenten getestet. Die Meßwerte geben den Mittelwert dieser Versuchsreihen wieder, wobei die Standardabweichung stets  $\leq 8\%$  war.

Das CsA-Derivat [DAT-Sar]<sup>3</sup>CsA zeigt im Vergleich mit anderen Proteinphosphatasen eine ähnlich hohe Spezifität für CaN wie der CsA/Cyp18-Komplex. Somit kann davon ausgegangen werden, daß diese Selektivität nicht durch Cyp18 vermittelt wird und die Modifikation des CsA in Position 3 darauf keinen Einfluß hat. Vermutlich bindet [DAT-Sar]<sup>3</sup>CsA an die gleiche Stelle des CaN-Moleküls wie der CsA/Cyp18-Komplex.

#### 4.2.4 Lokalisation der [DAT-Sar]<sup>3</sup>CsA-Bindungsstelle am Calcineurin

Lange Zeit war nur die Röntgen-Kristallstruktur des CaN/FK506/FKBP12-Komplexes bekannt (Griffith et al., 1995). Erst im September diesen Jahres wurde die Struktur von CsA im Komplex mit CaN und Cyp18 veröffentlicht (Huai et al., 2002). Damit ist CsA das einzige Cyclosporin, von dem die exakte Bindungsstelle am CaN bekannt ist. Zur indirekten Lokalisation der [DAT-Sar]<sup>3</sup>CsA-Bindungsstelle am CaN wurde deshalb ein enzymkinetisches Experiment durchgeführt. Dabei wurde die Inhibition von CaN durch [DAT-Sar]<sup>3</sup>CsA, den FK506/FKBP12-Komplex oder einem Gemisch aus beiden Komponenten mit RII-Phosphopeptid gemessen. Da auch FK506 ein *tight binding*-Inhibitor für FKBP12 ist, konnte durch Variation der FKBP12-Konzentration im Ansatz, die Konzentration des FK506/FKBP12-Komplexes eingestellt werden (Aldape et al., 1992). Gleichzeitig wurden für das Gemisch die theoretisch zu erwartenden Kurvenverläufe für identische oder verschiedene Bindungsstellen simuliert. Für die Simulation einer identischen Bindungsstelle wurde die Inhibitionskurve des FK506/FKBP12-Komplexes zugrunde gelegt. Ein additiver Term, der die inhibitorische Potenz und die Konzentration des zweiten Inhibitors im Meßansatz ausdrückt, wird mit einbezogen, so daß sich die resultierende Kurve in Richtung geringerer FK506/FKBP12-Konzentrationen verschiebt.

Die Kurvenform bleibt jedoch gleich. Für die Simulation einer Bindung an verschiedene Stellen des CaN-Moleküls wurde die dazugehörige Kurve durch ein vereinfachtes Modell von KELETI berechnet (Keleti, 1986). Dabei wird auch wieder von der Inhibitionskurve des FK506/FKBP12-Komplexes ausgegangen. Diese wird linearisiert und neben dem Anstieg auch der Schnittpunkt mit der y-Achse berechnet. Entsprechend einem Term, der sich aus dem  $K_i$ -Wert und der  $[\text{DAT-Sar}]^3\text{CsA}$ -Konzentration im Meßansatz zusammensetzt, wird die Inhibitionskurve des FK506/FKBP12-Komplexes auf der y-Achse verschoben. Nach Delinearisierung der Kurve erhält man die simulierte Inhibitionskurve für den Fall, daß  $[\text{DAT-Sar}]^3\text{CsA}$  und der FK506/FKBP12-Komplex an unterschiedlichen Stellen binden. Das CsA/Cyp18-Meßsystem konnte in diesem Fall nicht angewandt werden, da die gleichzeitige Anwesenheit von  $[\text{DAT-Sar}]^3\text{CsA}$  und Cyp18 im Meßansatz zu unerwünschten Interaktionen führt. Aus diesem Grund wurde für die enzymkinetischen Messungen der FK506/FKBP12-Komplex als hochaffiner CaN-Inhibitor eingesetzt.

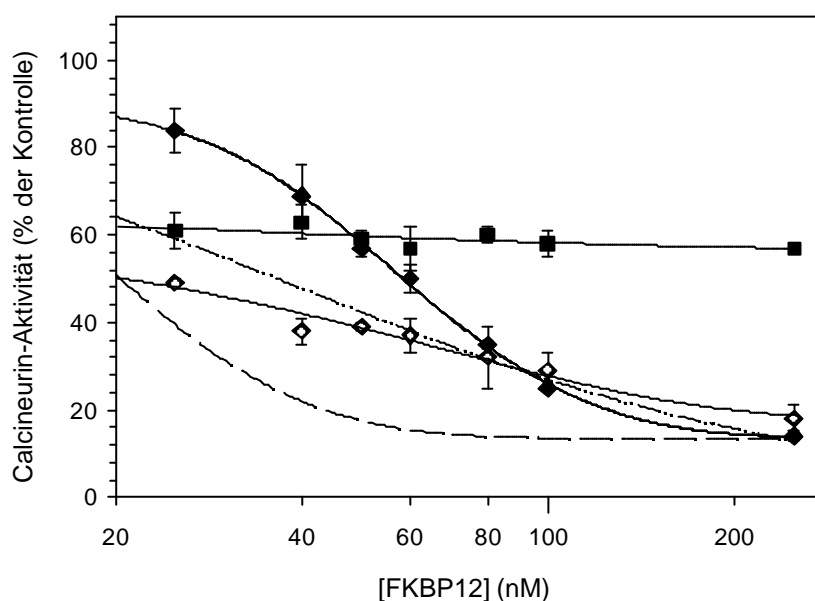


Abb. 4.24: Inhibition von CaN durch  $[\text{DAT-Sar}]^3\text{CsA}$ , FK506/FKBP12-Komplex oder einem Inhibitor-Gemisch aus  $[\text{DAT-Sar}]^3\text{CsA}$  und FK506/FKBP12.

CaN wurde mit  $0.75 \mu\text{M}$   $[\text{DAT-Sar}]^3\text{CsA}$  (■),  $1 \mu\text{M}$  FK506 (◆) oder einem Gemisch aus  $0.75 \mu\text{M}$   $[\text{DAT-Sar}]^3\text{CsA}$  und  $1 \mu\text{M}$  FK506 (◆) in Gegenwart von steigenden Konzentrationen an FKBP12 für 20 min bei  $22^\circ\text{C}$  inkubiert. Die Restaktivität wurde mit RII-Phosphopeptid gemessen und auf eine Kontrolle ohne Inhibitor berechnet. Alle Daten geben die Mittelwerte ( $\pm$  SD) von drei unabhängigen Versuchen wieder. Durch Simulation einer Inhibition, bei der beide Inhibitoren dieselbe Bindungsstelle beanspruchen, wurde die Kurve (— • —) generiert. Eine Inhibition, bei der sich die Inhibitoren an zwei unterschiedlichen Stellen anlagern, würde einer Kurvenform (— —) entsprechen.

Die CaN-Inhibition durch  $[\text{DAT-Sar}]^3\text{CsA}$  ist unabhängig von der FKBP12-Konzentration (Abb. 4.23). Die CaN-Aktivität wird durch den FK506/FKBP12-Komplex gehemmt ( $\text{IC}_{50}$ -Wert=  $60 \text{ nM}$ ).

Dieser Wert ist dem in der Literatur publizierten Wert von 50 nM ähnlich (Liu et al., 1991). Bei der simultanen Inhibition von CaN durch [DAT-Sar]<sup>3</sup>CsA und den FK506/FKBP12-Komplex ging die Enzym-Aktivität stärker zurück, als mit [DAT-Sar]<sup>3</sup>CsA alleine. Die entstandene Kurvenform ähnelte dabei mehr der simulierten Kurve für identische Bindungsstellen.

#### **4.2.5 Calcineurin-Inhibition durch Cyclosporine *in vivo***

Auch für die Detektion einer CaN-Inhibition durch die Cyclosporine *in vivo* wurde NFAT als physiologisches Substrat herangezogen. Die Transkriptionsaktivität von NFAT ist gut über Reporter-Gen-Assays meßbar und die Veränderung der Affinität zu spezifischen DNA-Bereichen bzw. die Translokation vom Zytosol in den Kern kann mit EMSA verfolgt werden.

##### **4.2.5.1 Einfluß der Cyclosporine auf NFAT-Reporter-Gen-Aktivität**

Zur indirekten Messung der intrazellulären CaN-Aktivität wurden humane T-Lymphozyten mit einem Luciferase-Reporter-Gen-Konstrukt transfiziert. Die Expression des Reporter-Enzyms stand dabei unter Kontrolle von NFAT. Die Zellen wurden nach einer Ruhephase mit CsA, [DAT-Sar]<sup>3</sup>CsA, [AD-Ser]<sup>8</sup>CsA und CsH vorinkubiert. Durch die sich anschließende Zugabe von PMA/Ionomycin erfolgte eine Stimulation der Zellen. Der Phorbol-Ester PMA bindet an die Proteinkinase C (PKC) und aktiviert dieses Schlüssel-Enzym zahlreicher physiologischer Vorgänge, welches andere zelluläre Proteine phosphorylieren kann (Mosior und Newton, 1995). Ionomycin ist ein Calcium-Ionophor, welches nach Applikation dafür sorgt, daß die intrazellulären Calcium-Speicher in das Cytoplasma entleert werden (Negulescu et al., 1994). Der Anstieg des zytosolischen Calcium-Spiegels führt zu einer Aktivierung Calcium-bindender Proteine, wie z.B. Calmodulin und CaN. Es ist hinreichend bekannt, daß die T-Zell-Aktivierung unter anderem über eine PKC-Aktivierung und einen erhöhten Calcium-Spiegel initiiert wird. Mit Hilfe von PMA und Ionomycin ist es somit möglich, eine physiologische Stimulation partiell nachzuahmen (June et al., 1989). Nachdem die Zellen ausreichend Zeit hatten, die Luciferase zu exprimieren und zu akkumulieren, wurden sie durch detergentenhaltigen Puffer und Sonikation lysiert. Die geklärten Überstände wurden separiert und auf Luciferase-Aktivität hin untersucht. Dabei mißt man die ATP-abhängige und unter Chemilumineszenz ablaufenden Oxidation des Substrates Luciferin durch das Enzym Luciferase.

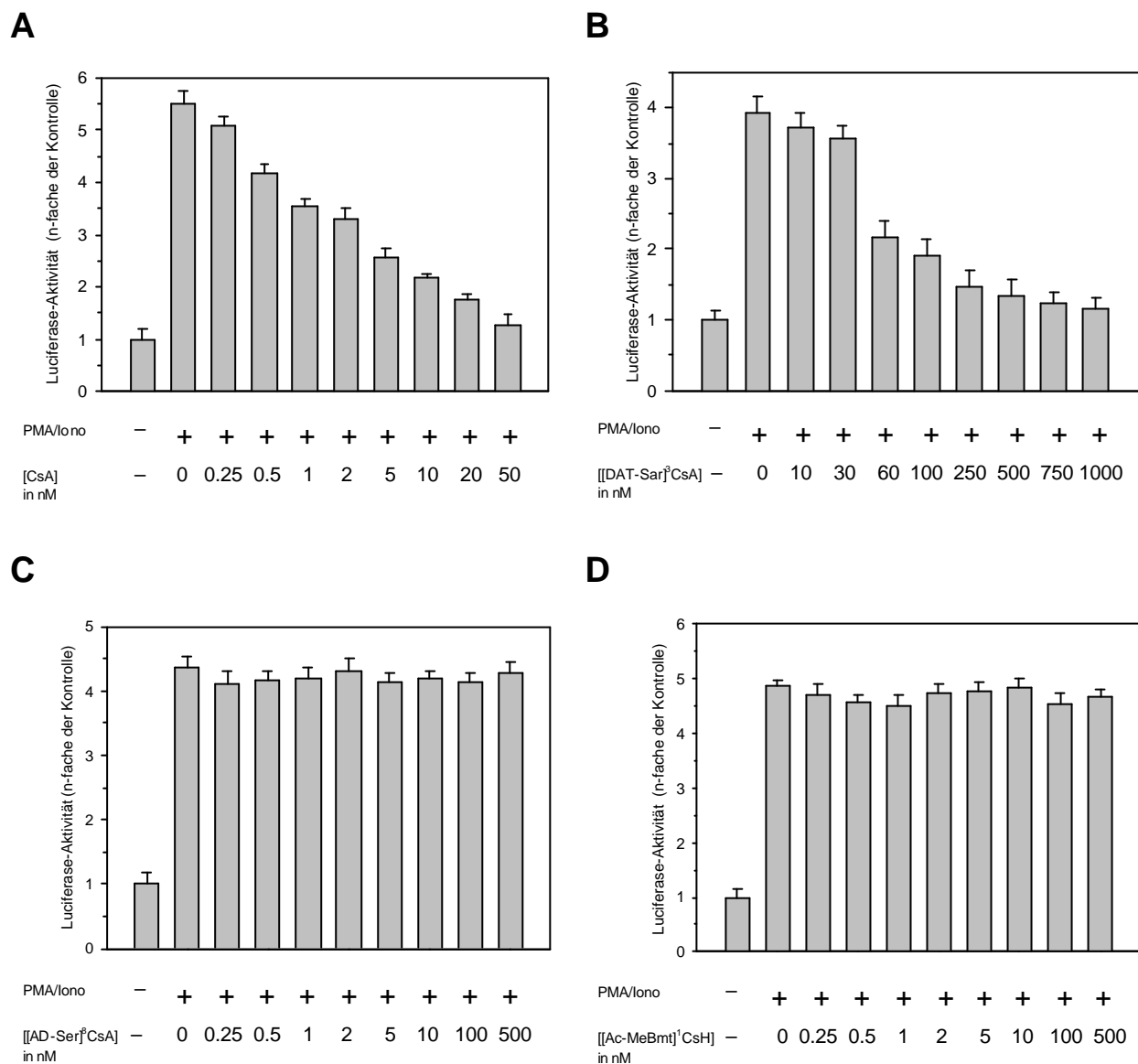


Abb. 4.25: **Inhibition der Luciferase-Expression in einem NFAT-Reporter-Gen-Assay durch Cyclosporine.**

Humane T-Lymphozyten wurden mit einem NFAT-Luciferase-Reporter-Gen-Konstrukt transfiziert und anschließend mit steigenden Konzentrationen an CsA (A), [DAT-Sar]<sup>3</sup>CsA (B), [AD-Ser]<sup>8</sup>CsA (C) und [Ac-MeBmt]<sup>1</sup>CsH (D) für 30 min bei 37°C inkubiert. Durch Zugabe von 40 nM PMA und 1 µM Ionomycin erfolgte die Stimulation der Zellen für 5 h bei 37°C. Nach Entfernung des Mediums wurden die Zellen in einem speziellen Aufschluß-Puffer lysiert und die Luciferase-Aktivität detektiert. Die dargestellten Werte geben das n-fache der Luciferase-Aktivität (± SD) von mehreren unabhängigen Experimenten wieder. Da die Zellen gleichzeitig mit einem β-Galaktosidase-Expressionsplasmid transfiziert wurden, konnten alle Meßwerte auf gleichen Proteingehalt normiert werden.

Die Aktivität des NFAT-Reporter-Gen-Konstruktes geht bei steigenden CsA-Konzentrationen drastisch zurück (Abb. 4.25). So konnte in dieser Meßreihe für CsA ein IC<sub>50</sub>-Wert von 2 ± 0.3 nM bestimmt werden. Das steht im Widerspruch zu den *in vitro* ermittelten Daten von 100 nM, stimmt aber mit Resultaten vergleichbarer *in vivo*-Experimente in der Literatur überein (Aramburu et al., 1999b).



Der Grund dafür ist, daß CsA die Zellmembran gut passieren kann. Im Zytosol wird es sofort von Cyclophilinen gebunden. Diese können bis zu 0.4 % des Gesamtproteins der Zelle ausmachen (Harding et al., 1986; Hohman und Hultsch, 1990). Dadurch wird CsA in der Zelle aufkonzentriert. Das gleiche Prinzip sollte auch bei [DAT-Sar]<sup>3</sup>CsA möglich sein, aber mit dem Unterschied, daß der gebildete [DAT-Sar]<sup>3</sup>CsA/Cyp18-Komplex CaN nicht inhibieren kann. [DAT-Sar]<sup>3</sup>CsA inhibiert die Reporter-Expression mit einem IC<sub>50</sub>-Wert von 60 ± 4 nM. Das CsA-Derivat [AD-Ser]<sup>8</sup>CsA und das CsH-Derivat [Ac-MeBmt]<sup>1</sup>CsH zeigten keinen Effekt auf die Aktivierung von NFAT im Reporter-Gen-Assay.

#### 4.2.5.2 Veränderungen im NFAT-Gelshift durch Cyclosporine

Um die Resultate des bereits durchgeführten NFAT-Reporter-Gen-Assays zu überprüfen, wurde ein EMSA mit radioaktiv markiertem Oligonukleotid, welches ein Fragment des distalen Bereiches des humanen IL-2-Promotors enthielt, durchgeführt. Dafür wurden Kernextrakte von T-Zellen präpariert, die zuvor mit CsA, [DAT-Sar]<sup>3</sup>CsA, [AD-Ser]<sup>8</sup>CsA und [Ac-MeBmt]<sup>1</sup>CsH behandelt wurden. Nur wenn NFAT durch CaN dephosphoryliert wird, kann es in den Kern translozieren und dort an spezifische DNA-Sequenzen binden. Durch die Dephosphorylierung wird auch die Affinität des Transkriptionsfaktors zu seinen Bindemotiven gesteigert, die mit Hilfe eines EMSA detektiert werden können. Mit diesem Experiment kann überprüft werden, ob nanomolare Konzentrationen von [DAT-Sar]<sup>3</sup>CsA einen Einfluß auf die NFAT/DNA-Bindung haben. Um das Gelshift-System zu verifizieren, wurde zuerst die Substanz CsA getestet, da bereits mehrfach bewiesen wurde, daß durch diese das Bindevermögen von NFAT an IL-2-Promotor-Bereiche gesenkt bzw. total aufgehoben werden kann (Randak et al., 1990; Brabletz et al., 1991). Neben der Autoradiografie eines NFAT-EMSA von CsA-behandelten T-Lymphozyten (Abb. 4.26 A) ist auf der rechten Seite die densitometrische Auswertung des Gelshifts zu sehen (Abb. 4.26 B).

CsA ist in der Lage, die Affinität des NFAT zum Oligonukleotid in einer konzentrationsabhängigen Weise zu verringern. Im Gelshift-Experiment wurde für CsA ein IC<sub>50</sub>-Wert von 3 ± 0.4 nM ermittelt. Dieses Ergebnis stimmt mit den aus den Reporter-Gen-Assays gewonnenen IC<sub>50</sub>-Wert von 2 nM gut überein. Natürlich ist der Fehler bei einem EMSA viel größer, was mit einem ungünstigen Signal/Rausch-Verhältnis begründet werden kann. Aufgrund dieser guten Übereinstimmung kann man davon ausgehen, daß die Ergebnisse aus den Reporter-Gen-Assays auch auf die Gelshift-Experimente übertragbar sind. So zeigten auch [DAT-Sar]<sup>3</sup>CsA-behandelte T-Zellen eine konzentrationsabhängige Verminderung der NFAT/DNA-Interaktion (Abb. 4.27).

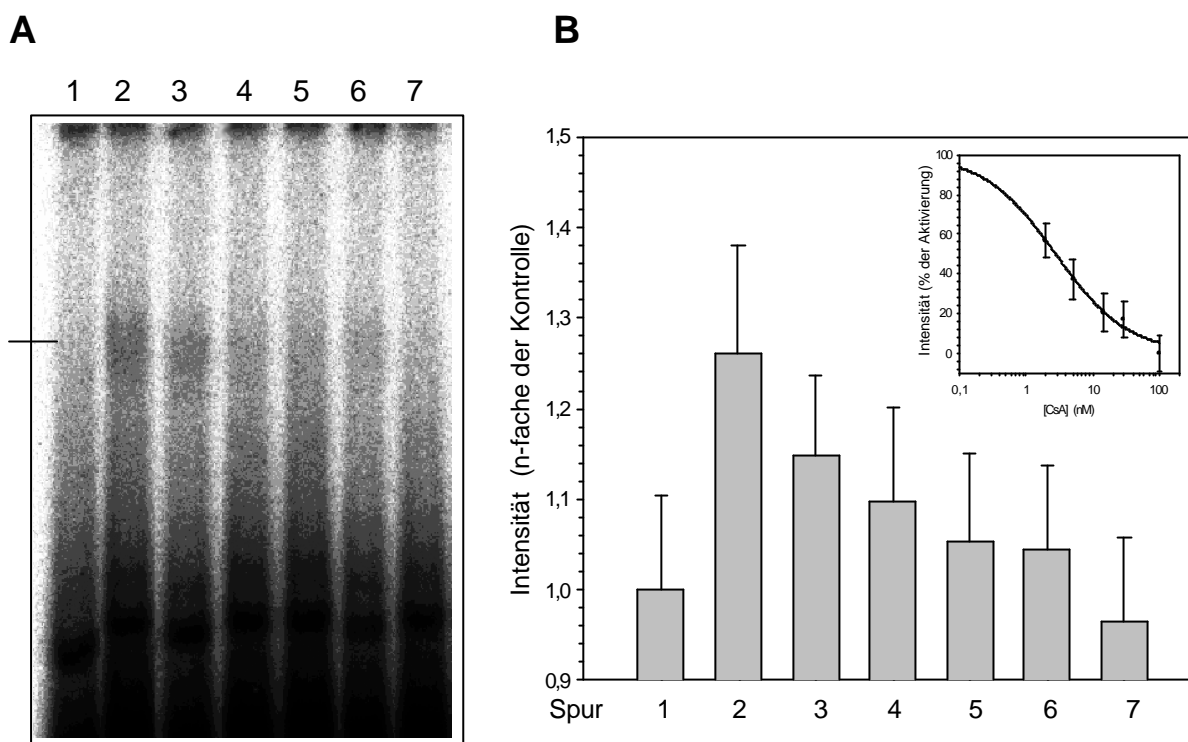


Abb. 4.26: **NFAT-Gelshift mit Kernextrakten von CsA-behandelten T-Lymphozyten.**

Humane T-Zellen wurden mit CsA in folgenden Konzentrationen für 30 min bei 37°C inkubiert: 1 nM (Spur 3), 5 nM (Spur 4), 15 nM (Spur 5), 30 nM (Spur 6) und 100 nM (Spur 7). Nach Stimulation der Zellen für 40 min bei 37°C durch Zugabe von 40 nM PMA und 2 µM Ionomycin erfolgte die Präparation der Kernextrakte. Für das Gelshift-Experiment wurden 4 µg Kernprotein mit 2 pmol radioaktiv markiertem Oligonukleotid (Fragment des distalen IL-2-Promotors) für 30 min bei 25°C inkubiert. Die Auftrennung der Proben erfolgte in einem 6 %igen TBE-Gel. Durch Autoradiografie wurde die Radioaktivität visualisiert (A). Nach der Digitalisierung der Daten erfolgte die densitometrische Auswertung (B). Kernextrakte unstimulierter (Spur 1) und stimulierter T-Zellen ohne Inhibitor (Spur 2) wurden als Kontrolle mitgeführt. Um die Spezifität der NFAT/DNA-Wechselwirkung zu beweisen, wurde unmarkiertes Oligonukleotid in 50fachem molarem Überschuß zu einer stimulierten Probe dazugegeben, wodurch kein Gelshift auftrat (Daten nicht gezeigt). Im Diagramm sind die Mittelwerte ( $\pm$  SD) von drei unabhängigen Experimenten dargestellt. Der Pfeil kennzeichnet die Lokalisation des NFAT/DNA-Komplexes im Gel.

Nach densitometrischer Auswertung und Auftragung der Daten gegen die Inhibitor-Konzentration konnte für [DAT-Sar]<sup>3</sup>CsA ein IC<sub>50</sub>-Wert von  $70 \pm 6$  nM bestimmt werden. Die im NFAT-Reporter-Gen-Assay eingesetzte [DAT-Sar]<sup>3</sup>CsA-Konzentration, bei der 50 % der Aktivität gehemmt wurden, betrug 60 nM. Somit konnten im NFAT-EMSA die IC<sub>50</sub>-Werte für CsA und [DAT-Sar]<sup>3</sup>CsA der Reporter-Gen-Assays bestätigt werden.

Analog zu den beiden vorherigen Experimenten wurden T-Lymphozyten mit [AD-Ser]<sup>8</sup>CsA behandelt, um zu klären, ob die im NFAT-Gelshift beobachteten Effekte von CsA und [DAT-Sar]<sup>3</sup>CsA spezifisch durch CaN vermittelt wurden. [AD-Ser]<sup>8</sup>CsA sollte keinen Einfluß auf die NFAT/DNA-Wechselwirkung haben, da weder [AD-Ser]<sup>8</sup>CsA alleine noch der [AD-Ser]<sup>8</sup>CsA/Cyp18-Komplex an CaN binden können. Es konnten keine [AD-Ser]<sup>8</sup>CsA-abhängigen Veränderungen im NFAT-Gelshift detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

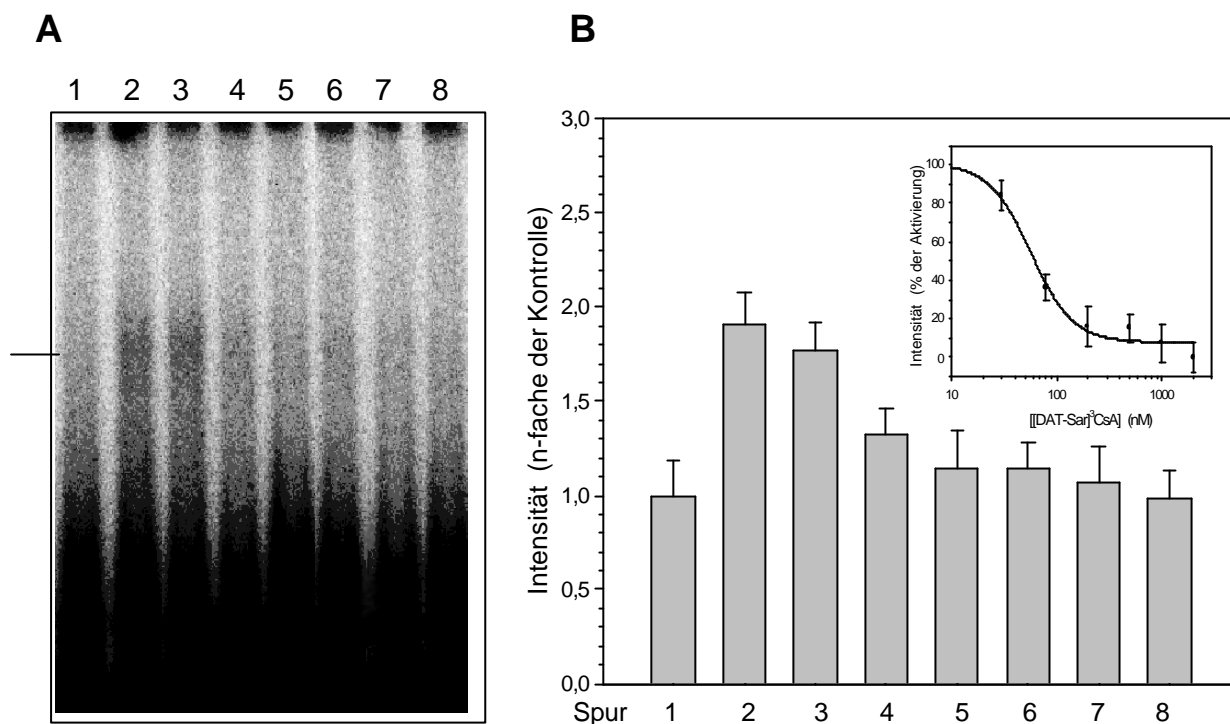


Abb. 4.27: **NFAT-Gelshift mit Kernextrakten von [DAT-Sar]<sup>3</sup>CsA-behandelten T-Lymphozyten.**

Humane T-Zellen wurden mit [DAT-Sar]<sup>3</sup>CsA in folgenden Konzentrationen für 30 min bei 37°C inkubiert: 30 nM (Spur 3), 80 nM (Spur 4), 200 nM (Spur 5), 500 nM (Spur 6), 1 µM (Spur 7) und 2 µM (Spur 8). Nach Stimulation der Zellen für 40 min bei 37°C durch Zugabe von 40 nM PMA und 2 µM Ionomycin erfolgte die Präparation der Kernextrakte. Für das Gelshift-Experiment wurden 4 µg Kernprotein mit 2 pmol radioaktiv markiertem Oligonukleotid (Fragment des distalen IL-2-Promotors) für 30 min bei 25°C inkubiert. Die Auftrennung der Proben erfolgte in einem 6 %igen TBE-Gel. Durch Autoradiografie wurde die Radioaktivität visualisiert (A). Nach der Digitalisierung der Daten erfolgte die densitometrische Auswertung (B). Kernextrakte unstimulierter (Spur 1) und stimulierter T-Zellen ohne Inhibitor (Spur 2) wurden als Kontrolle mitgeführt. Um die Spezifität der Protein/DNA-Wechselwirkung zu beweisen, wurde unmarkiertes Oligonukleotid in 50fachem molarem Überschuß zu einer stimulierten Probe hinzugegeben, wodurch kein Gelshift auftrat (Daten nicht gezeigt). Im Diagramm sind die Mittelwerte (± SD) von drei unabhängigen Experimenten dargestellt. Der Pfeil kennzeichnet die Lokalisation des NFAT/DNA-Komplexes im Gel.

Auf einen NFAT-EMSA mit [Ac-MeBmt]<sup>1</sup>CsH wurde verzichtet, da durch dieses Derivat weder CaN noch Cyp18 inhibiert werden kann und im NFAT-Reporter-Gen-Assay kein Einfluß nachzuweisen war. Aus den Ergebnissen läßt sich schlußfolgern, daß nur CsA und [DAT-Sar]<sup>3</sup>CsA konzentrationsabhängig die CaN-Aktivität *in vivo* und damit auch die Dephosphorylierung von NFAT blockieren können.

#### 4.2.5.3 Einfluß der Cyclosporine auf NFκB-Reporter-Gen-Aktivität

Die Transkriptionsaktivität von NFκB wird vermutlich auch über den Calcium/CaN-Signalweg beeinflusst, wobei der genaue Mechanismus noch unklar ist. Es ist beschrieben, daß das Immunsuppressivum CsA die Degradation der NFκB-Inhibitoren kBα und kBβ nach Zell-Aktivierung verhindern kann. Dieser Effekt konnte in Jurkat-Zellen, aber auch in humanen und murinen primären T-Lymphozyten beobachtet werden (Marienfeld et al., 1997).

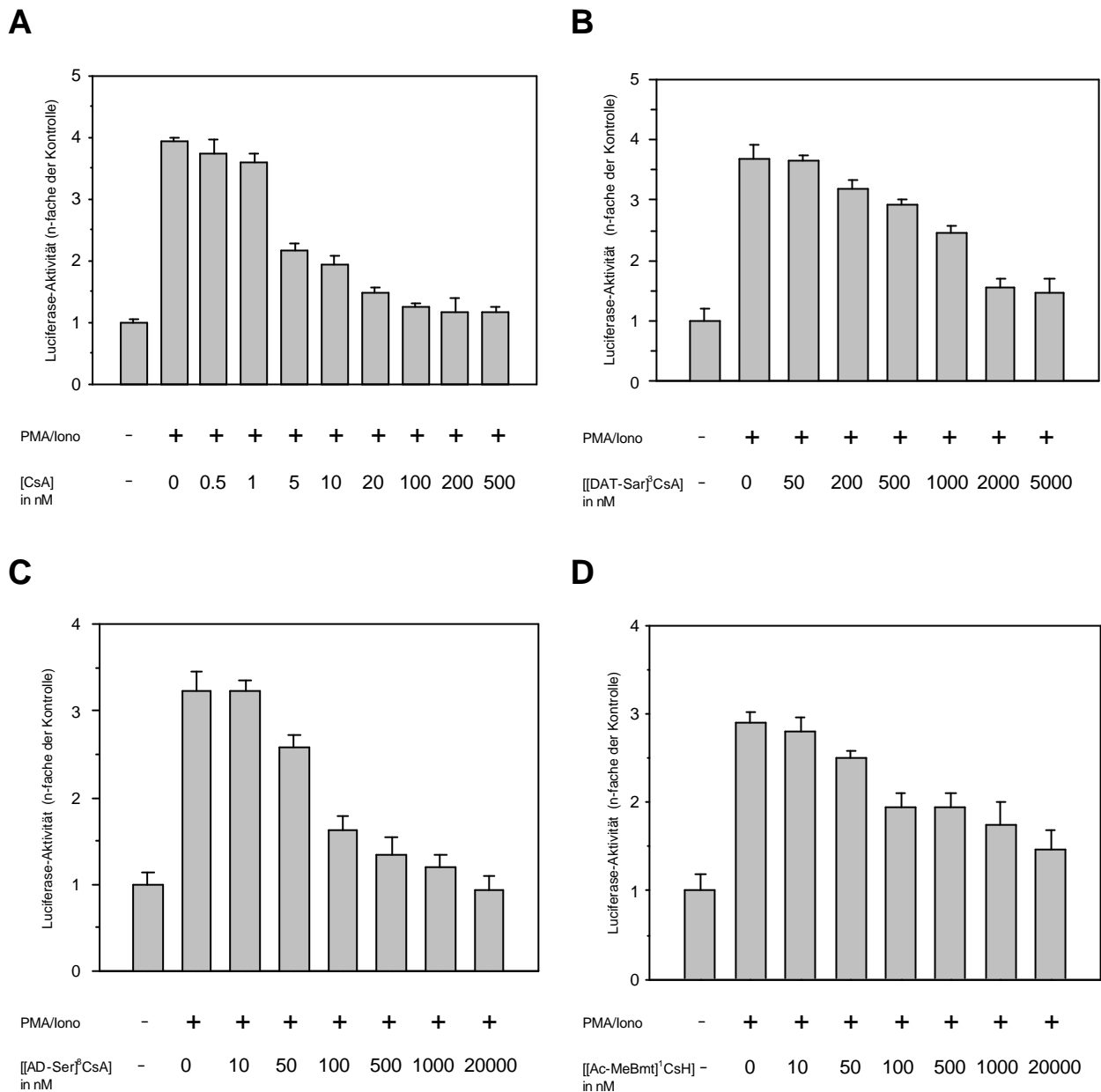


Abb. 4.28: Inhibition der Luciferase-Expression in einem NF $\kappa$ B-Reporter-Gen-Assay durch Cyclosporine.

Humane T-Lymphozyten wurden mit einem NF $\kappa$ B-Luciferase-Reporter-Gen-Konstrukt transfiziert und dann mit steigenden Konzentrationen an CsA (A), [DAT-Sar]<sup>3</sup>CsA (B), [AD-Ser]<sup>8</sup>CsA (C) und [Ac-MeBmt]<sup>1</sup>CsH (D) für 30 min bei 37°C inkubiert. Durch Zugabe von 40 nM PMA und 1  $\mu$ M Ionomycin wurden die Zellen für 5 h bei 37°C stimuliert. Anschließend wurden die Zellen in einem speziellen Aufschluß-Puffer lysiert und die Luciferase-Aktivität detektiert. Die dargestellten Werte geben das n-fache der Luciferase-Aktivität ( $\pm$  SD) von mehreren unabhängigen Experimenten wieder. Da die Zellen gleichzeitig mit einem  $\beta$ -Galaktosidase-Expressionsplasmid transfiziert wurden, konnten alle Meßwerte auf einen gleichen Proteingehalt normiert werden.

Es ist aus der Literatur bekannt, daß CsA, im Gegensatz zum NFAT-Signalweg, die Aktivierung des NF $\kappa$ B-Signalweges nicht vollständig verhindern kann (Aramburu et al., 1999b).

Möglicherweise wird diese Hemmung der NF $\kappa$ B-Aktivität eigentlich durch eine Cyclophilin-Inhibition vermittelt. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde ein Reporter-Gen-Assay, bei dem die Expression von Luciferase unter Kontrolle von NF $\kappa$ B stand, durchgeführt (Abb. 4.28).

CsA hemmt die Aktivität des NF $\kappa$ B-Reportergen-Konstruktes in T-Lymphozyten mit einem IC<sub>50</sub>-Wert von  $4 \pm 0.2$  nM. Ähnliche Werte wurden auch von ARAMBURU et al. in Jurkat-Zellen gemessen (Aramburu et al., 1999b). Jedoch war das CsA-Derivat [DAT-Sar]<sup>3</sup>CsA in diesem Test im Vergleich mit CsA ein 250fach schlechterer Inhibitor der Transkriptionsaktivität (IC<sub>50</sub> =  $1 \pm 0.1$   $\mu$ M). Die Expressionsaktivität ließ sich - den Erwartungen entsprechend - durch beide Substanzen nicht komplett inhibieren. Das CsA-Derivat [AD-Ser]<sup>8</sup>CsA zeigte trotz fehlender CaN-Inhibition eine deutliche Hemmung der Luciferase-Expression (IC<sub>50</sub> =  $75 \pm 4$  nM) in diesem Assay. Dieses Ergebnis könnte ein Indiz für eine Cyclophilin-Beteiligung sein. Zur Absicherung dieser Annahme wurde in diesem Assay zusätzlich [Ac-MeBmt]<sup>1</sup>CsH untersucht. Da diese Verbindung weder in der Lage ist CaN noch Cyclophilin zu inhibieren, sollte kein Einfluß auf die NF $\kappa$ B-Transkriptionsaktivität nachzuweisen sein. Jedoch vermindern steigende Konzentrationen an [Ac-MeBmt]<sup>1</sup>CsH auch die Reporter-Expression mit einem IC<sub>50</sub>-Wert von  $100 \pm 8$  nM. Somit kann geschlossen werden, daß die Abnahme der NF $\kappa$ B-Transkriptionsaktivität in stimulierten T-Zellen nach Inkubation mit CsA, [DAT-Sar]<sup>3</sup>CsA, [AD-Ser]<sup>8</sup>CsA und [Ac-MeBmt]<sup>1</sup>CsH nicht ausschließlich auf eine Beeinflussung von CaN zurückzuführen ist. So verhält sich das CsH, von welchem das [Ac-MeBmt]<sup>1</sup>CsH abgeleitet wurde, *in vivo* nicht indifferent (Wenzel-Seifert et al., 1991).

#### 4.2.5.4 Veränderungen im NF $\kappa$ B-Gelshift durch Cyclosporine

Kritisch betrachtet, könnten Ursachen für die verminderte Luciferase-Aktivität in CsA-, [DAT-Sar]<sup>3</sup>CsA-, [AD-Ser]<sup>8</sup>CsA- oder [Ac-MeBmt]<sup>1</sup>CsH-behandelten T-Zellen auch Veränderungen in der Proteinstabilität, Expression anderer Proteine oder die Beeinflussung von zellulären Regelkreisen sein. Deshalb wurde versucht, mit Hilfe von Gelshift-Experimenten *in vitro* die Bindung von NF $\kappa$ B an spezifische DNA-Sequenzen nachzuweisen (Abb. 4.29 und 4.30). Die Stimulation der T-Lymphozyten durch PMA und Ionomycin führte zu einer Aktivierung von NF $\kappa$ B, die über eine Zunahme der Menge an retardiertem und radioaktiv markiertem Oligonukleotid im Gel detektiert werden konnte. Ähnliche Beobachtungen konnten für NF $\kappa$ B bereits mehrfach von anderen Experimentatoren gemacht werden. Zusätzlich wurde hier aber versucht, durch Vorinkubation der Zellen mit CsA (Abb. 4.29 A), [DAT-Sar]<sup>3</sup>CsA (Abb. 4.29 C), [AD-Ser]<sup>8</sup>CsA (Abb. 4.30 A) oder [Ac-MeBmt]<sup>1</sup>CsH (Abb. 4.30 C) die Aktivierung von NF $\kappa$ B zu vermindern oder aufzuheben. CsA konnte mit einem IC<sub>50</sub>-Wert von  $15 \pm 1$  nM die Bindung von NF $\kappa$ B-Proteinen an die DNA in einer konzentrationsabhängigen Weise hemmen (Abb. 4.29 B).

Für [DAT-Sar]<sup>3</sup>CsA konnte in dieser Versuchsreihe ebenfalls ein Hemmeffekt beobachtet werden ( $IC_{50} = 23 \pm 2$  nM).

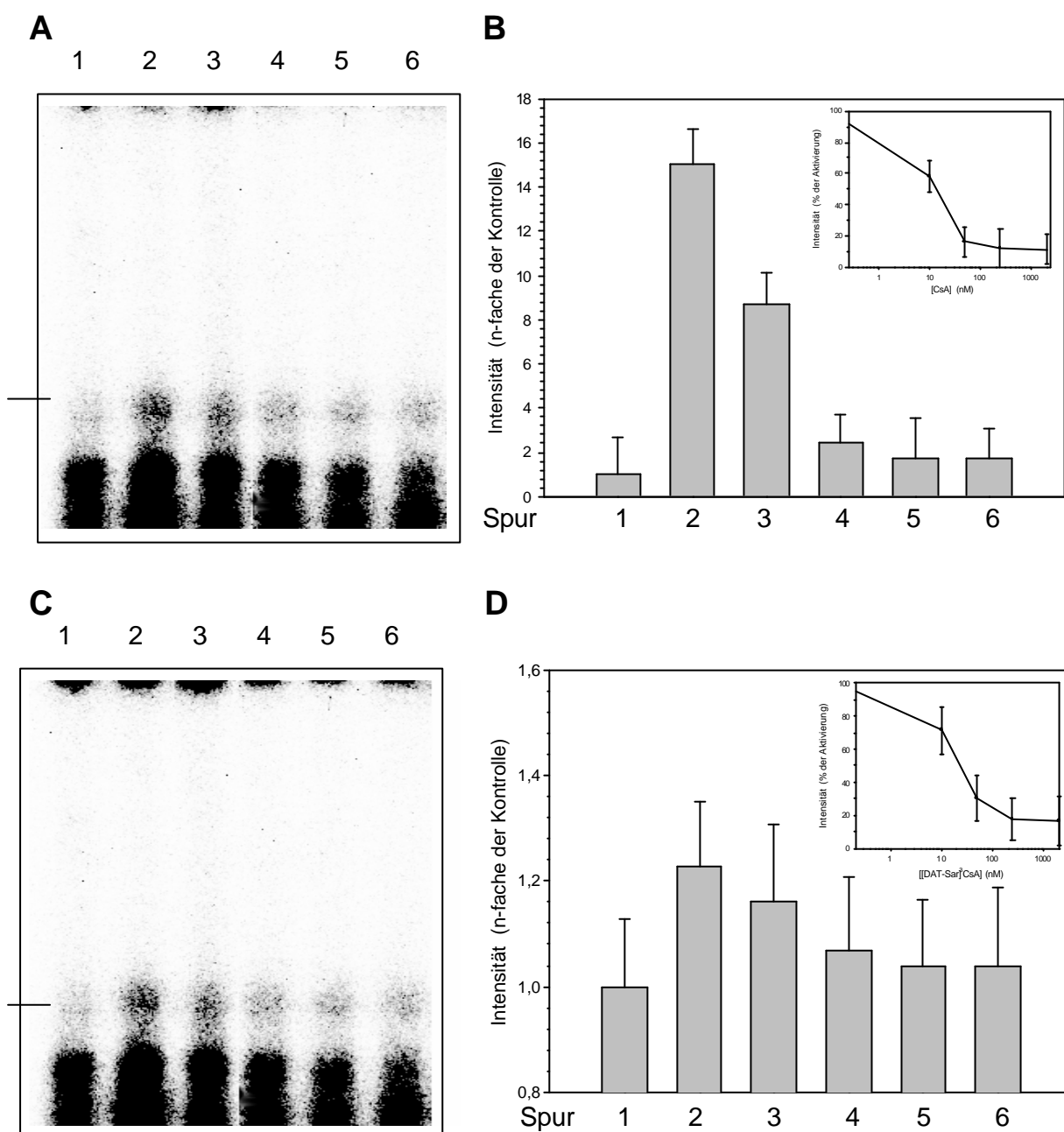


Abb. 4.29: **NFκB-Gelshift mit Kernproteinen aus CsA- bzw. [DAT-Sar]<sup>3</sup>CsA-behandelten T-Zellen.**

Humane T-Zellen wurden mit CsA (**A**) bzw. [DAT-Sar]<sup>3</sup>CsA (**C**) in folgenden Konzentrationen für 30 min bei 37°C inkubiert: 10 nM (Spur 3), 50 nM (Spur 4), 250 nM (Spur 5) und 2 µM (Spur 6). Nach Stimulation der Zellen für 40 min bei 37°C mit 40 nM PMA und 2 µM Ionomycin erfolgte die Präparation der Kernextrakte. Für das Gelshift-Experiment wurden 4 µg Kernprotein mit 2 pmol radioaktiv markiertem Oligonukleotid (p65-Bindemotiv) für 30 min bei 25°C inkubiert. Die Auftrennung der Proben erfolgte in einem 6 %igen TBE-Gel. Durch Autoradiografie wurde die Radioaktivität visualisiert (**A** und **C**). Nach der Digitalisierung der Daten erfolgte die densitometrische Auswertung (**B** und **D**). Kernextrakte unstimulierter (Spur 1) und stimulierter T-Zellen ohne Inhibitor (Spur 2) wurden als Kontrolle mitgeführt. Um die Spezifität der Protein/DNA-Wechselwirkung zu beweisen, wurde unmarkiertes Oligonukleotid in 50fachem molarem Überschuss zu einer stimulierten Probe hinzugegeben, wodurch kein Gelshift auftrat (Daten nicht gezeigt). Im Diagramm sind die Meßwerte ( $\pm$  SD) von drei unabhängigen Experimenten dargestellt. Der Pfeil kennzeichnet die Lokalisation des NFκB/DNA-Komplexes im Gel.

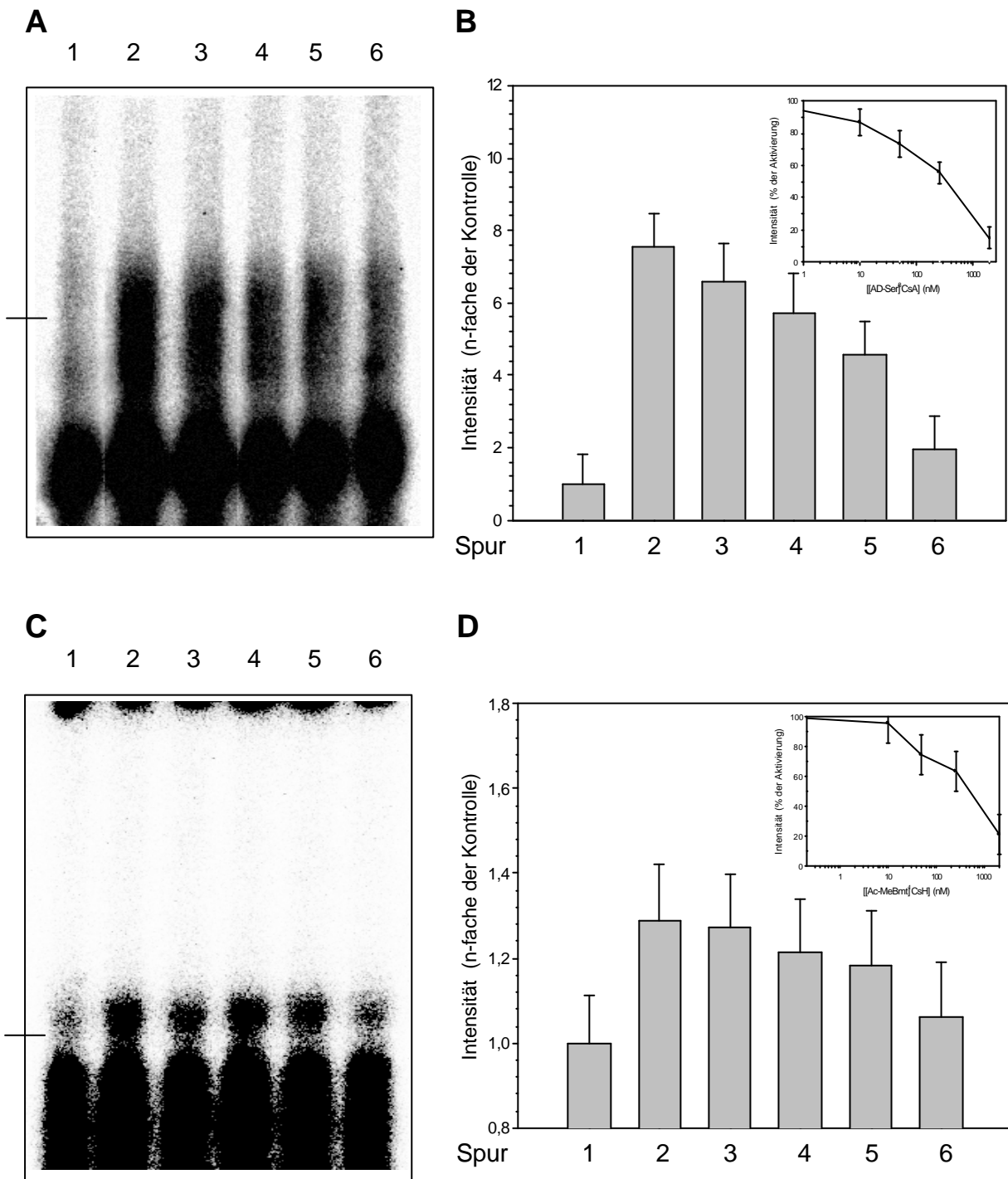


Abb.4.30: **NFκB-Gelshift mit Kernproteinen aus [AD-Ser]<sup>8</sup>CsA- bzw. [Ac-MeBmt]<sup>1</sup>CsH-behandelten T-Zellen.** Humane T-Zellen wurden mit [AD-Ser]<sup>8</sup>CsA (**A**) bzw. [Ac-MeBmt]<sup>1</sup>CsH (**C**) in folgenden Konzentrationen für 30 min bei 37°C inkubiert: 10 nM (Spur 3), 50 nM (Spur 4), 250 nM (Spur 5) und 2 μM (Spur 6). Nach Stimulation der Zellen für 40 min bei 37°C mit 40 nM PMA und 2 μM Ionomycin erfolgte die Präparation der Kernextrakte. Für das Gelshift-Experiment wurden 4 μg Kernprotein mit 2 pmol radioaktiv markiertem Oligonukleotid (p65-Bindemotiv) für 30 min bei 25°C inkubiert. Die Auftrennung der Proben erfolgte in einem 6 %igen TBE-Gel. Durch Autoradiografie wurde die Radioaktivität visualisiert (**A** und **C**). Nach der Digitalisierung der Daten erfolgte die densitometrische Auswertung (**B** und **D**). Kernextrakte unstimulierter (Spur 1) und stimulierter T-Zellen ohne Inhibitor (Spur 2) wurden als Kontrolle mitgeführt. Um die Spezifität der Protein/DNA-Wechselwirkung zu beweisen, wurde unmarkiertes Oligonukleotid in 50fachem molarem Überschuß zu einer stimulierten Probe hinzugegeben, wodurch kein Gelshift auftrat (Daten nicht gezeigt). Im Diagramm sind die Mittelwerte (± SD) von drei unabhängigen Experimenten dargestellt. Der Pfeil kennzeichnet die Lokalisation des NFκB/DNA-Komplexes im Gel.

Das CsA-Derivat [AD-Ser]<sup>8</sup>CsA kann die Aktivierung von NFκB mit einem IC<sub>50</sub>-Wert von 300 ± 32 nM inhibieren. Obwohl dieses Derivat im Komplex mit Cyclophilin das CaN nicht hemmen kann, wird durch diese Substanz der NFκB-Signalweg beeinflusst. Überraschenderweise kann [Ac-MeBmt]<sup>1</sup>CsH im Gelshift-Experiment die Aktivierung von NFκB ebenfalls vermindern (IC<sub>50</sub>= 500 ± 48 nM).

#### 4.2.5.5 Einfluß der Cyclosporine auf AP-1-Reportergen-Aktivität

Um den Einfluß der Cyclosporine auf den AP-1-Signalweg zu untersuchen, wurden Reportergen-Assays genutzt (Abb. 4.31).

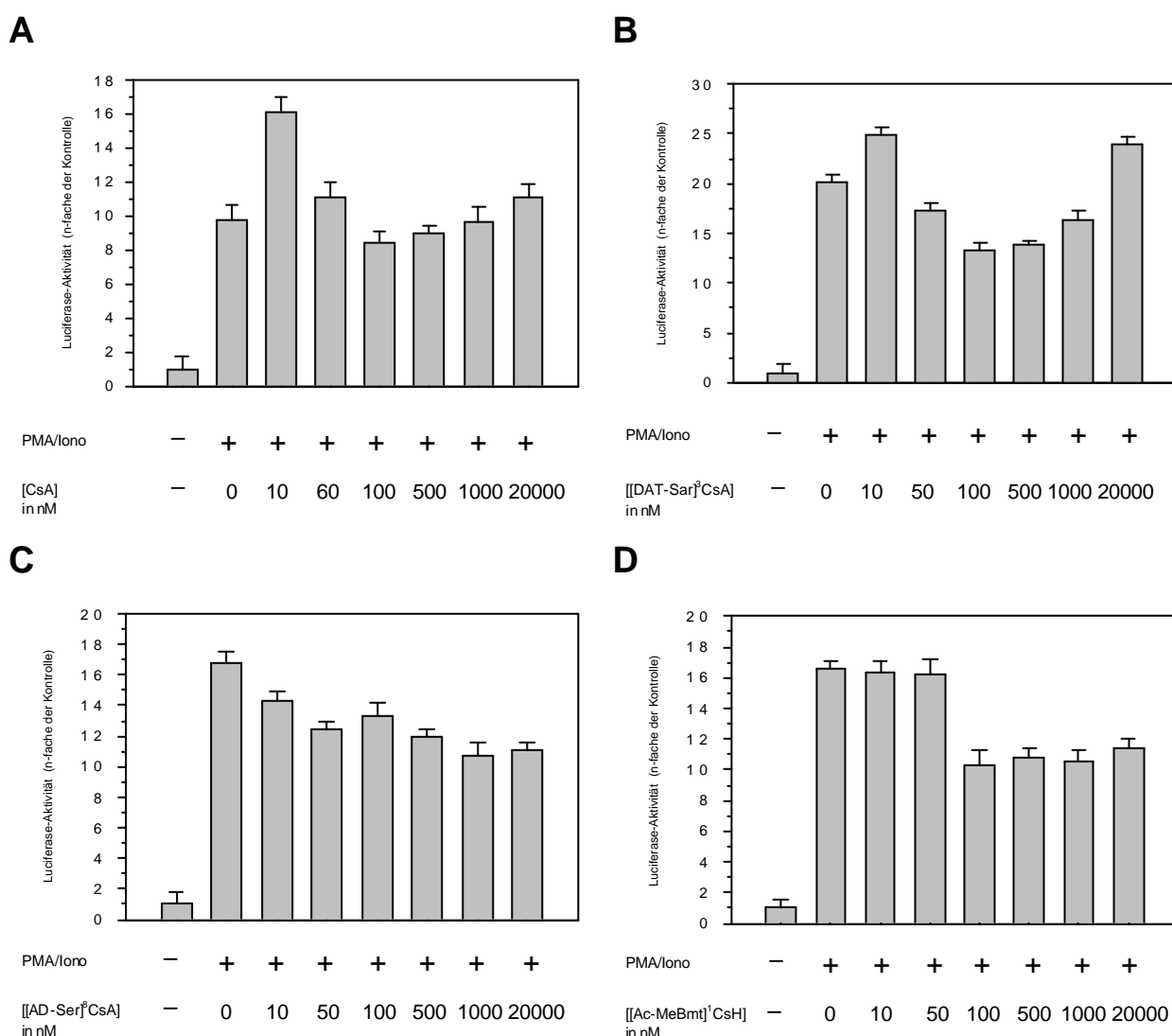


Abb. 4.31: Inhibition der Luciferase-Expression in einem AP-1-Reportergen-Assay durch Cyclosporine.

Humane T-Lymphozyten wurden mit einem AP-1-Luciferase-Reportergen-Konstrukt transfiziert und dann mit steigenden Konzentrationen an CsA (A), [DAT-Sar]<sup>3</sup>CsA (B), [AD-Ser]<sup>8</sup>CsA (C) und [Ac-MeBmt]<sup>1</sup>CsH (D) für 30 min bei 37°C inkubiert. Durch Zugabe von 40 nM PMA und 1 µM Ionomycin wurden die Zellen für 5 h bei 37°C stimuliert. Anschließend wurden die Zellen in einem speziellen Aufschluß-Puffer lysiert und die Luciferase-Aktivität detektiert. Die dargestellten Mittelwerte (± SD) geben das n-fache der Luciferase-Aktivität von mehreren unabhängigen Experimenten wieder. Die Zellen wurden gleichzeitig mit einem β-Galaktosidase-Expressionsplasmid transfiziert, um alle Meßwerte auf einen gleichen Proteingehalt normieren zu können.



Bei diesem Assay stand die Expression des Reportergens Luciferase unter der Kontrolle von AP-1. Mit steigenden Konzentrationen an [AD-Ser]<sup>8</sup>CsA und [Ac-MeBmt]<sup>1</sup>CsH war eine Inhibierung der AP-1-Transkriptionsaktivität zu verzeichnen. Dem gegenüber zeigt die Luciferase-Expression in Abhängigkeit von der CsA- und [DAT-Sar]<sup>3</sup>CsA-Konzentration einen komplexeren Verlauf.

Geringe Konzentrationen (10 nM) dieser Substanzen sind in der Lage, die AP-1-Transkriptionsaktivität zu steigern (Abb. 4.31 A und B). Bei einer weiteren Erhöhung der Konzentration ( $\geq$  50 nM) nimmt die Menge an exprimierter Luciferase jedoch wieder ab. Diese Abnahme kann durch weitere Erhöhung der CsA- bzw. [DAT-Sar]<sup>3</sup>CsA-Konzentrationen  $\geq$  1  $\mu$ M rückgängig gemacht werden, so daß es wieder zu einer Aktivierung kommt. Bei [AD-Ser]<sup>8</sup>CsA und [Ac-MeBmt]<sup>1</sup>CsH ist keine initiale oder finale Steigerung der Luciferase-Expression zu beobachten. Bei [Ac-MeBmt]<sup>1</sup>CsH trat ab 100 nM eine sprunghafte Verminderung der exprimierten Luciferase-Menge ein, wobei eine weitere Erhöhung der [Ac-MeBmt]<sup>1</sup>CsH-Konzentration die Inhibition nicht verstärken konnte .

#### 4.2.5.6 Veränderungen im AP-1-Gelshift durch Cyclosporine

Die im AP-1-Reportergen-Assay erhaltenen Ergebnisse wurden durch AP-1-Gelshift-Experimente (Abb. 4.32 und 4.33) bestätigt. Im Intensität/Konzentration-Diagramm dieses *in vitro*-Bindungstests konnte sowohl für CsA, als auch für [DAT-Sar]<sup>3</sup>CsA ein ähnlicher Verlauf wie im AP-1-Reportergen-Assay beobachtet werden (Abb. 4.32). Nach einer initialen Aktivierung folgt eine Inhibierung und dieser wiederum eine unterschiedlich stark ausgeprägte Aktivierung, wenn die Konzentration von CsA bzw. [DAT-Sar]<sup>3</sup>CsA im Kulturmedium weiter erhöht wird. Steigende [AD-Ser]<sup>8</sup>CsA-Konzentrationen hatten aber nur einen minimalen Einfluß auf die Bindungsaktivität des AP-1-Komplexes (Abb. 4.33). Für [Ac-MeBmt]<sup>1</sup>CsH war ebenfalls eine potente Inhibition der AP-1/DNA-Wechselwirkung zu detektieren (Abb. 4.33). Dabei konnten mit [Ac-MeBmt]<sup>1</sup>CsH-Konzentrationen  $\geq$  50 nM Bindungsaktivitäten gemessen werden, die mit denen der unstimulierten Proben vergleichbar waren (Abb. 4.33).

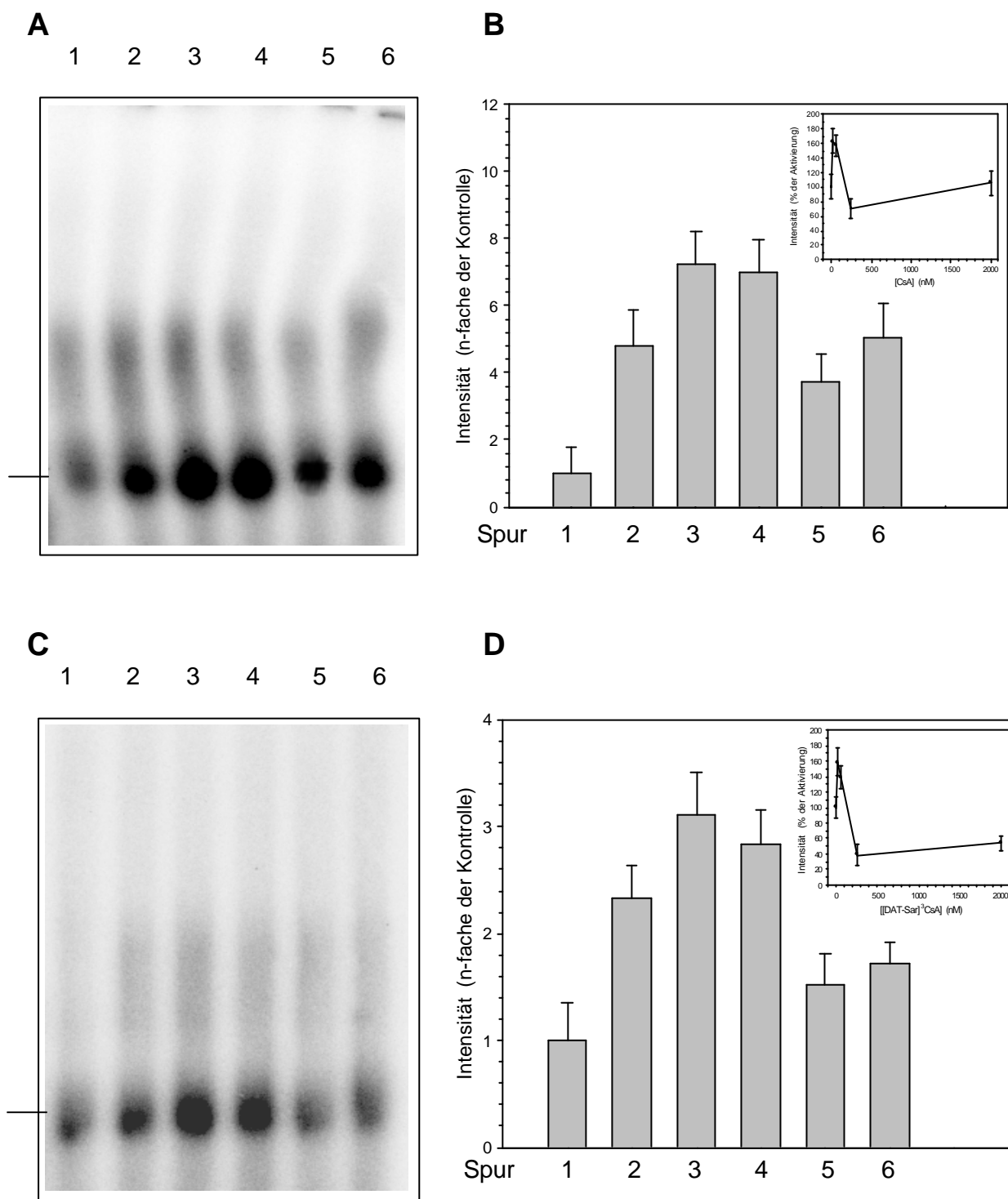


Abb. 4.32: **AP-1-Gelshift mit Kernproteinen aus CsA- bzw. [DAT-Sar]<sup>3</sup>CsA-behandelten T-Zellen.**

Humane T-Zellen wurden mit CsA (**A**) bzw. [DAT-Sar]<sup>3</sup>CsA (**C**) in folgenden Konzentrationen für 30 min bei 37°C inkubiert: 10 nM (Spur 3), 50 nM (Spur 4), 250 nM (Spur 5) und 2 μM (Spur 6). Nach Stimulation der Zellen für 40 min bei 37°C mit 40 nM PMA und 2 μM Ionomycin erfolgte die Präparation der Kernextrakte. Für das Gelshift-Experiment wurden 4 μg Kernprotein mit 2 pmol radioaktiv markiertem Oligonukleotid (AP-1-SV40-Bindemotiv) für 30 min bei 25°C inkubiert. Die Auftrennung der Proben erfolgte in einem 6 %igen TBE-Gel. Durch Autoradiografie wurde die Radioaktivität visualisiert (**A** und **C**). Nach der Digitalisierung der Daten erfolgte die densitometrische Auswertung (**B** und **D**). Kernextrakte unstimulierter (Spur 1) und stimulierter T-Zellen ohne Inhibitor (Spur 2) wurden als Kontrolle mitgeführt. Um die Spezifität der Protein/DNA-Wechselwirkung zu beweisen, wurde unmarkiertes Oligonukleotid in 50fachem molarem Überschuss zu einer stimulierten Probe hinzugegeben, wodurch kein Gelshift auftrat (Daten nicht gezeigt). Im Diagramm sind die Mittelwerte  $\pm$  SD von drei unabhängigen Experimenten dargestellt. Der Pfeil kennzeichnet die Lokalisation des AP-1/DNA-Komplexes im Gel.

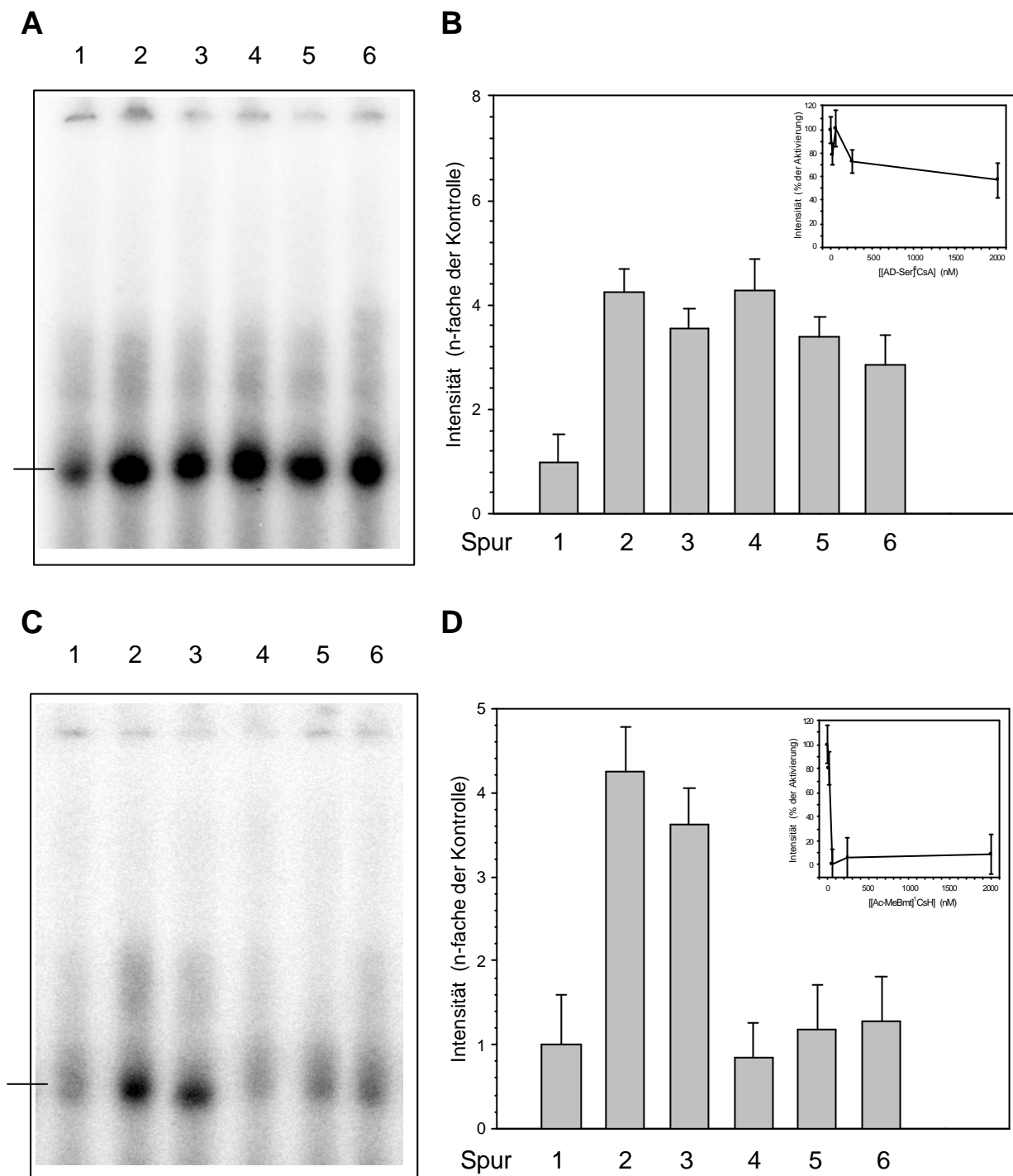


Abb.4.33: **AP-1-Gelshift mit Kernproteinen aus [AD-Ser]<sup>8</sup>CsA- bzw. [Ac-MeBmt]<sup>1</sup>-CsH-behandelten T-Zellen.** Humane T-Zellen wurden mit [AD-Ser]<sup>8</sup>CsA (**A**) bzw. [Ac-MeBmt]<sup>1</sup>CsH (**C**) in folgenden Konzentrationen für 30 min bei 37°C inkubiert: 10 nM (Spur 3), 50 nM (Spur 4), 250 nM (Spur 5) und 2 μM (Spur 6). Nach Stimulation der Zellen für 40 min bei 37°C mit 40 nM PMA und 2 μM Ionomycin erfolgte die Präparation der Kernextrakte. Für das Gelshift-Experiment wurden 4 μg Kernprotein mit 2 pmol radioaktiv markiertem Oligonukleotid (AP-1-SV40-Bindemotiv) für 30 min bei 25°C inkubiert. Die Auftrennung der Proben erfolgte in einem 6 %igen TBE-Gel. Durch Autoradiografie wurde die Radioaktivität visualisiert (**A** und **C**). Nach der Digitalisierung der Daten erfolgte die densitometrische Auswertung (**B** und **D**). Kernextrakte unstimulierter (Spur 1) und stimulierter T-Zellen ohne Inhibitor (Spur 2) wurden als Kontrolle mitgeführt. Um die Spezifität der Protein/DNA-Wechselwirkung zu beweisen, wurde unmarkiertes Oligonukleotid in 50fachem molarem Überschuß zu einer stimulierten Probe hinzugegeben, wodurch kein Gelshift auftrat (Daten nicht gezeigt). Im Diagramm sind die Mittelwerte (± SD) von drei unabhängigen Experimenten dargestellt. Der Pfeil kennzeichnet die Lokalisation des AP-1/DNA-Komplexes im Gel.

#### 4.2.6 Einfluß der Cyclosporine auf MAPK-Signalwege

Die MAP-Kinasen ERK1/2, JNK und p38 spielen bei inflammatorischen und proliferativen Prozessen eine große Rolle. Es wurde seit längerer Zeit vermutet, daß CaN-Inhibitoren diese Signalwege beeinflussen können. Einen Beweis für diese Hypothese erbrachten DE WINDT et al., die zeigen konnten, daß CaN in Kardiomyozyten eng mit dem JNK- bzw. p38-Signalweg verbunden ist (De Windt et al., 2000; Lim et al., 2001a). Um zu überprüfen, ob diese Ergebnisse auch auf Zellen des Immunsystems übertragbar sind, wurden T-Zellen mit CsA, [DAT-Sar]<sup>3</sup>CsA, [AD-Ser]<sup>8</sup>CsA und [Ac-MeBmt]<sup>1</sup>CsH vorinkubiert und anschließend mit PMA/Ionomycin stimuliert.

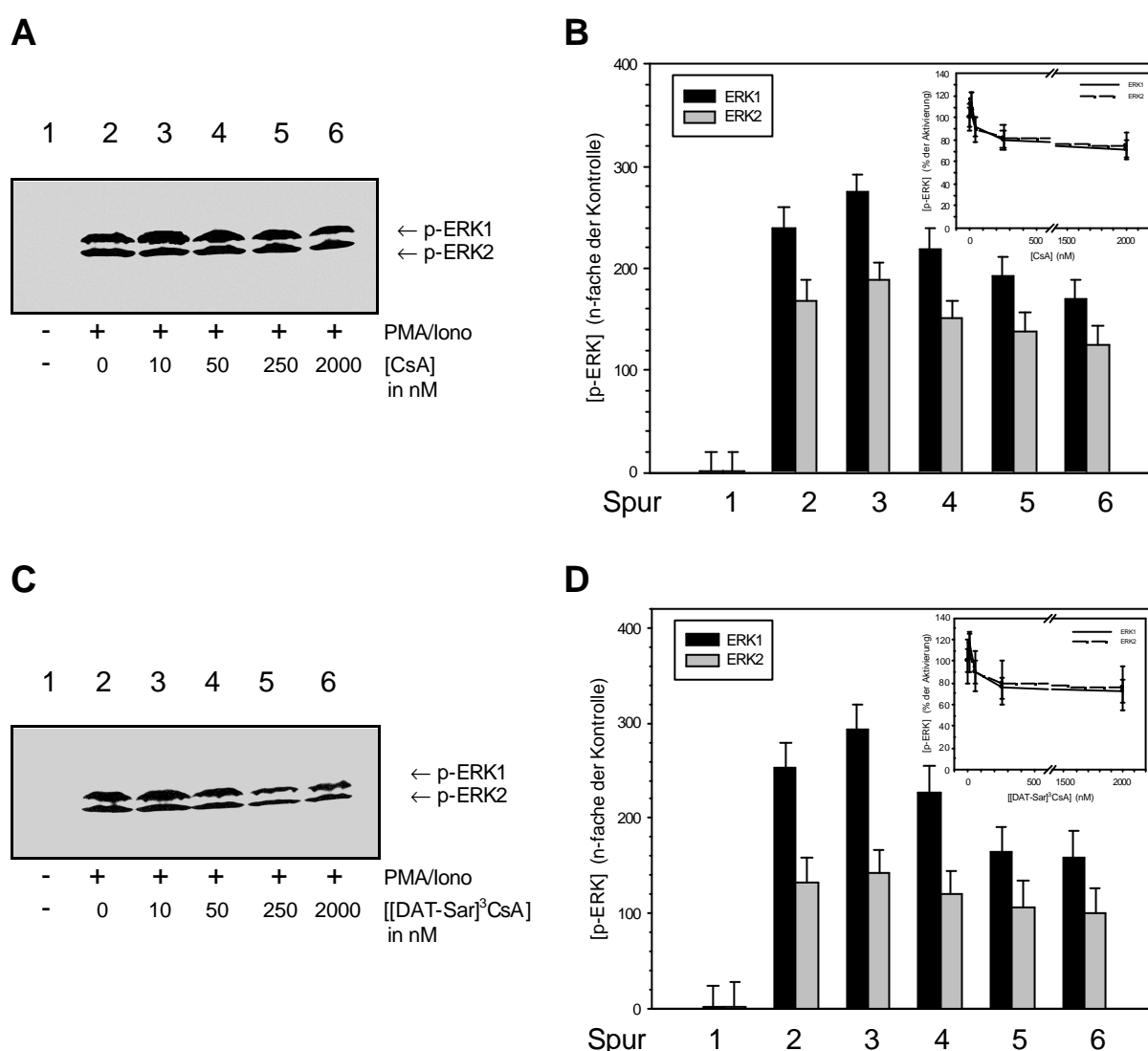


Abb. 4.34: Einfluß von CsA und [DAT-Sar]<sup>3</sup>CsA auf den Aktivierungsgrad von ERK1/2.

Humane T-Lymphozyten wurden mit CsA (A und B) bzw. [DAT-Sar]<sup>3</sup>CsA (C und D) in den angegebenen Konzentrationen für 30 min bei 37°C vorinkubiert. Anschließend erfolgte die Stimulation mit 40 nM PMA und 2 µM Ionomycin für 40 min bei 37°C. Die Zellen wurden durch das Kochen im Probenpuffer lysiert. Die Proben wurden in einer 15%igen SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulose geblotet und mit einem anti-p-ERK1/2-Antikörper untersucht (A und C). Die Blots wurden digitalisiert und densitometrisch ausgewertet (B und D). Mit einem anti-Cyp18-Antikörper wurde die relative Menge des Markerproteins Cyp18 detektiert und gleiche Gesamtproteinmengen in allen Proben nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Das Diagramm gibt die Mittelwerte (± SD) von drei unabhängigen Versuchen wieder.

Der Gehalt an aktivierter MAP-Kinase wurde mit Hilfe eines phosphospezifischen Antikörpers detektiert, der nur das 2fach phosphorylierte Thr-X-Tyr-Motiv der aktivierten MAP-Kinase erkennt. Der Aktivierungsgrad spiegelt die Stärke der Phosphorylierung wieder. Wie in Abb. 4.34 zu sehen ist, steigt die p-ERK1/2-Menge in den Zellen durch PMA/Ionomycin-Stimulation deutlich an. Die Vorinkubation mit einer geringen Konzentration an CsA oder [DAT-Sar]<sup>3</sup>CsA führt zu einer zusätzlichen Aktivierung der ERK1/2 von 15-20 %. Eine weitere Erhöhung der CsA- bzw. [DAT-Sar]<sup>3</sup>CsA-Konzentration führt zu einer Senkung des p-ERK1/2-Spiegels.

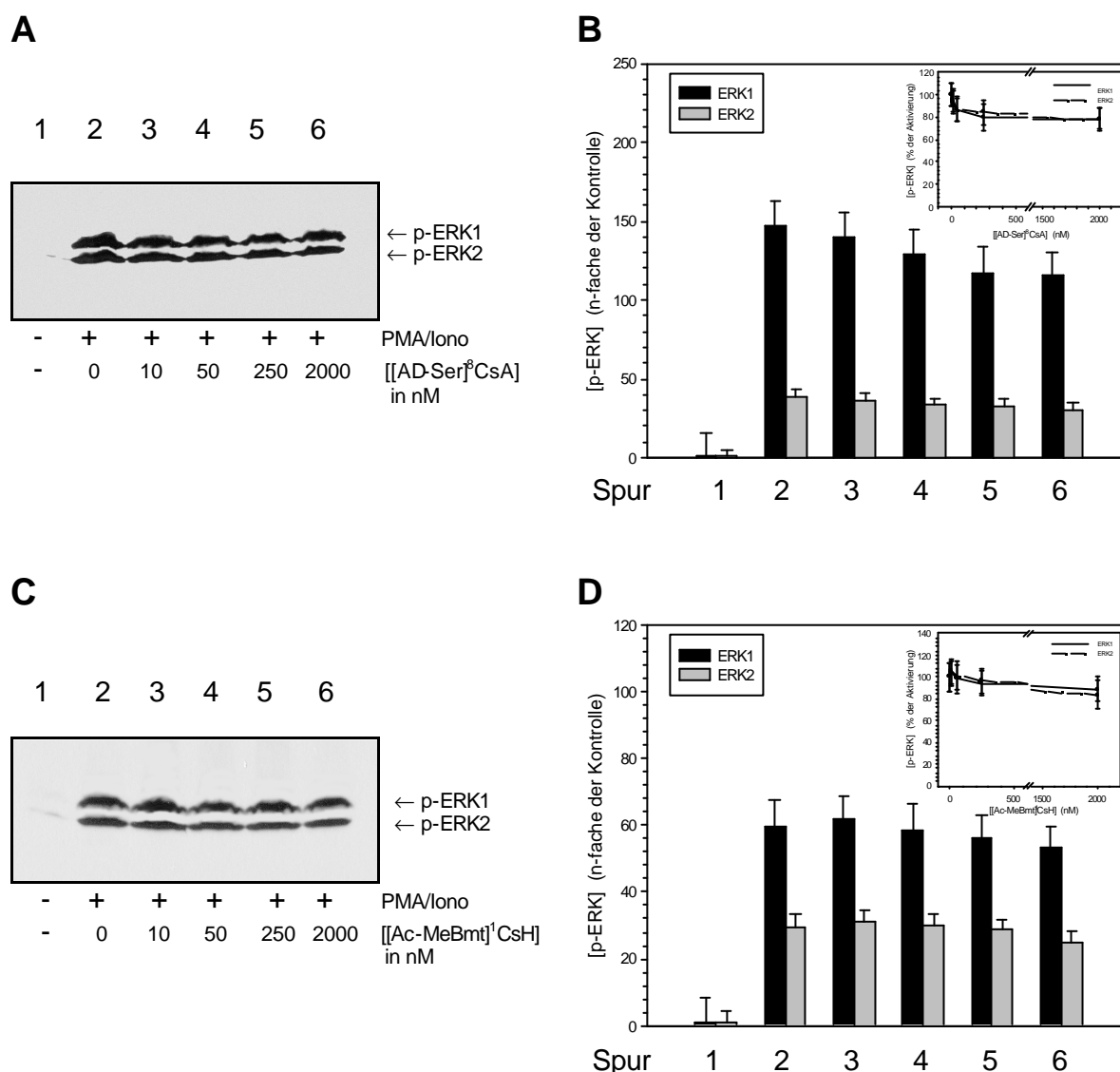


Abb. 4.35: **Einfluß von [AD-Ser]<sup>8</sup>CsA und [Ac-MeBmt]<sup>1</sup>CsH auf den Aktivierungsgrad von ERK1/2.**

Humane T-Lymphozyten wurden mit [AD-Ser]<sup>8</sup>CsA (A und B) bzw. [Ac-MeBmt]<sup>1</sup>CsH (C und D) in den angegebenen Konzentrationen für 30 min bei 37°C vorinkubiert. Anschließend erfolgte die Stimulation mit 40 nM PMA und 2 µM Ionomycin für 40 min bei 37°C. Die Zellen wurden durch das Kochen im Probenpuffer lysiert. Die Proben wurden in einer 15%igen SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulose geblottet und mit einem anti-p-ERK1/2-Ab untersucht (A und C). Die Blots wurden digitalisiert und densitometrisch ausgewertet (B und D). Mit einem anti-Cyp18-Ab wurde die relative Menge des Markerproteins Cyp18 detektiert und gleiche Gesamtproteinmengen in allen Proben nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Das Diagramm gibt die Mittelwerte (± SD) von drei unabhängigen Versuchen wieder.

Auch die Behandlung der Zellen mit  $[\text{AD-Ser}]^3\text{CsA}$  führte zu einer Verminderung der p-ERK1/2-Menge um 15-20 %. Das Derivat  $[\text{Ac-MeBmt}]^1\text{CsA}$  hatte keinen Einfluß auf den Aktivierungsgrad der MAP-Kinase ERK1/2. Analog zu dieser Versuchsreihe wurden die Zell-Lysate auch mit einem anti-p-JNK-Ab untersucht (Abb. 4.36 und 4.37).

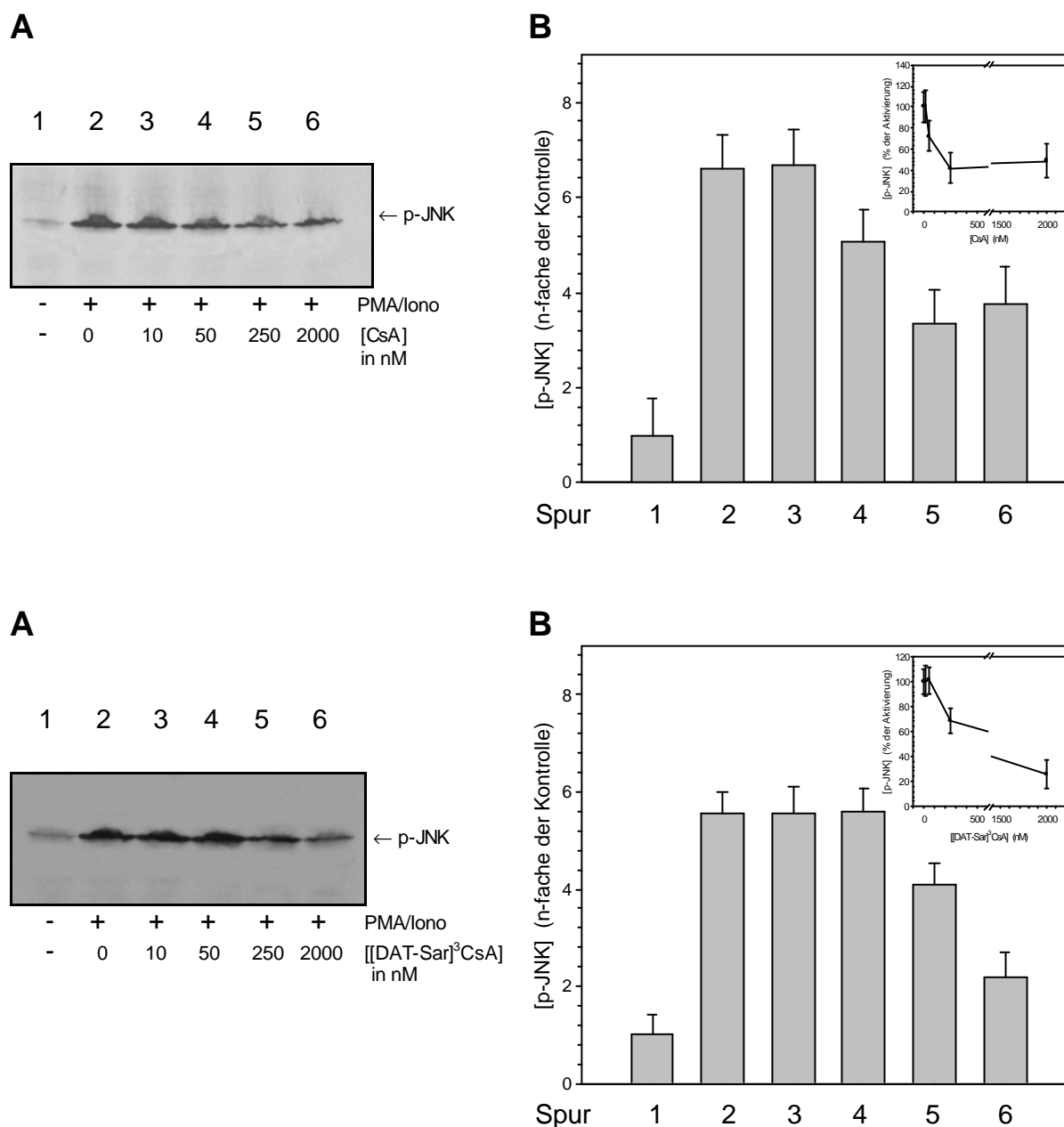


Abb. 4.36: **Einfluß von CsA und  $[\text{DAT-Sar}]^3\text{CsA}$  auf den Aktivierungsgrad von JNK.**

Humane T-Lymphozyten wurden mit CsA (**A** und **B**) bzw.  $[\text{DAT-Sar}]^3\text{CsA}$  (**C** und **D**) in den angegebenen Konzentrationen für 30 min bei 37°C vorinkubiert. Anschließend erfolgte die Stimulation mit 40 nM PMA und 2 µM Ionomycin für 40 min bei 37°C. Die Zellen wurden durch das Kochen im Probenpuffer lysiert. Die Proben wurden in einer 15%igen SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulose geblottet und mit einem anti-p-JNK-Ab untersucht (**A** und **C**). Die Blots wurden digitalisiert und densitometrisch ausgewertet (**B** und **D**). Mit einem anti-Cyp18-Ab wurde die relative Menge des Markerproteins Cyp18 detektiert und gleiche Gesamtproteinmengen in allen Proben nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Das Diagramm gibt die Mittelwerte ( $\pm$  SD) von drei unabhängigen Versuchen wieder.

Dabei zeigte sich, daß sowohl CsA als auch [DAT-Sar]<sup>3</sup>CsA in der Lage sind, die Menge an p-JNK in den T-Zellen in einer konzentrationsabhängigen Weise zu vermindern. Für CsA wurde ein IC<sub>50</sub>-Wert von 200 ± 0.2 nM und für [DAT-Sar]<sup>3</sup>CsA ein IC<sub>50</sub>-Wert von 1 ± 0.1 µM bestimmt. Für die Derivate [AD-Ser]<sup>8</sup>CsA oder [Ac-MeBmt]<sup>1</sup>CsH konnte kein Einfluß auf die Aktivierung der MAP-Kinase JNK nachgewiesen werden (Abb. 4.37).

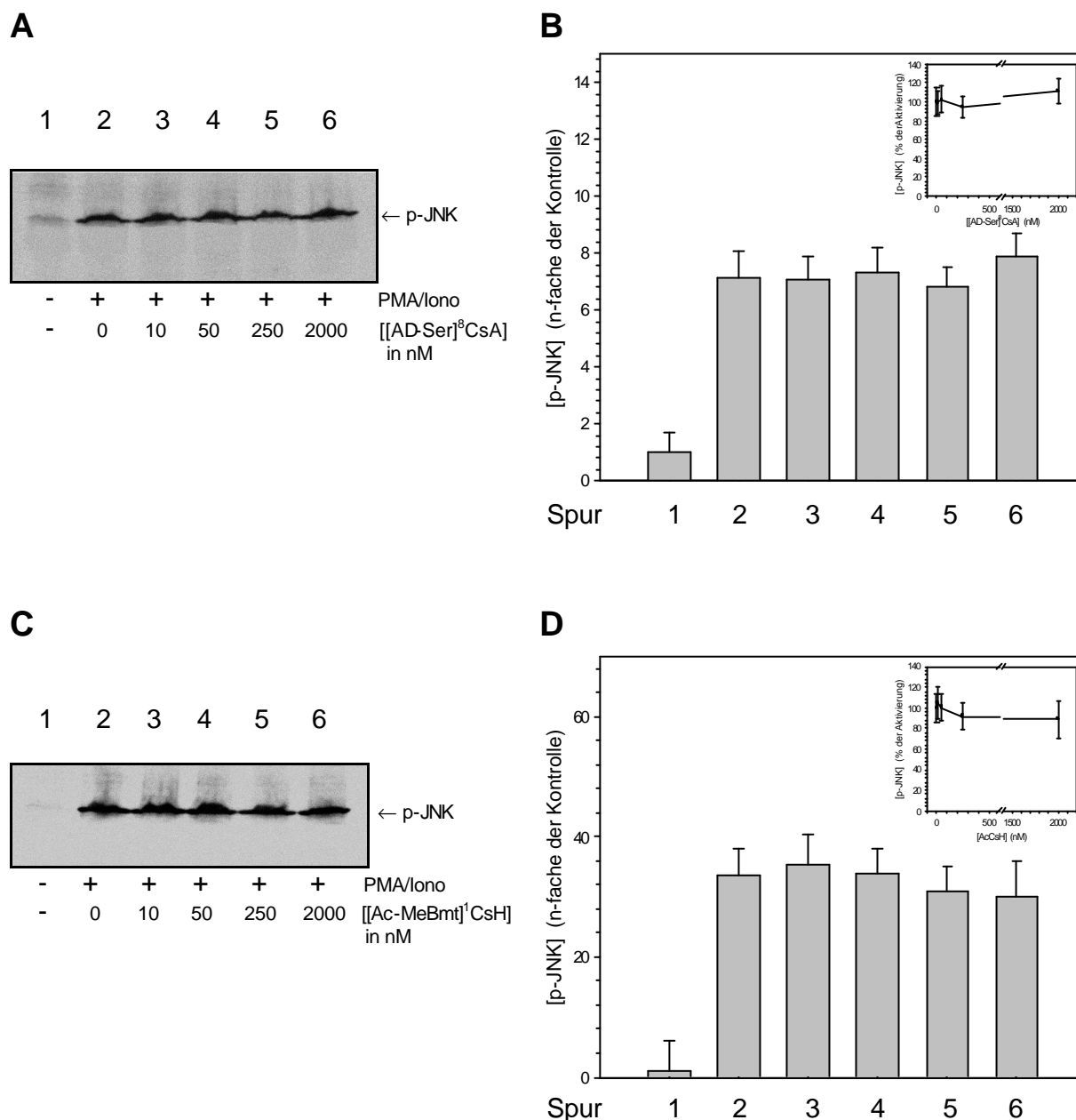


Abb. 4.37: **Einfluß von [AD-Ser]<sup>8</sup>CsA und [Ac-MeBmt]<sup>1</sup>CsH auf den Aktivierungsgrad von JNK.**

Humane T-Lymphozyten wurden mit [AD-Ser]<sup>8</sup>CsA (**A** und **B**) bzw. [Ac-MeBmt]<sup>1</sup>CsH (**C** und **D**) in den angegebenen Konzentrationen für 30 min bei 37°C vorinkubiert. Anschließend erfolgte die Stimulation mit 40 nM PMA und 2 µM Ionomycin für 40 min bei 37°C. Die Zellen wurden durch das Kochen im Probenpuffer lysiert. Die Proben wurden in einer 15%igen SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulose geblottet und mit einem anti-p-JNK-Ab untersucht (**A** und **C**). Die Blots wurden digitalisiert und densitometrisch ausgewertet (**B** und **D**). Mit einem anti-Cyp18-Ab wurde die relative Menge des Markerproteins Cyp18 detektiert und gleiche Gesamtproteinmengen in allen Proben nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Das Diagramm gibt die Mittelwerte (± SD) von drei unabhängigen Versuchen wieder.

Um den Aktivierungsstatus der MAP-Kinase p38 zu bestimmen, wurde die Konzentration der phosphorylierten Form der p38-Kinase in den Zell-Lysaten mit einem anti-p-p38-Ab analysiert (Abb. 4.38 und 4.39).

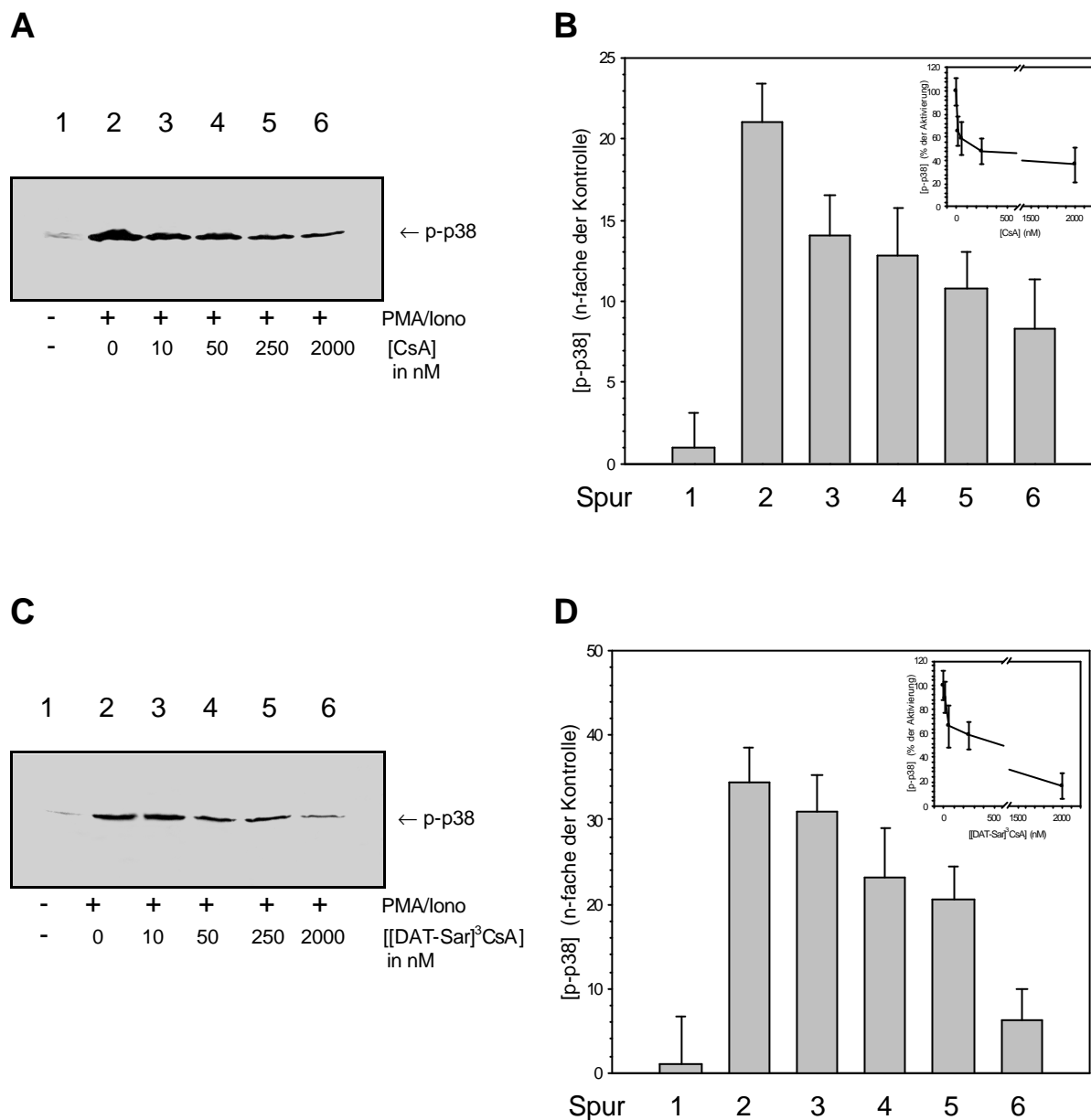


Abb. 4.38: **Einfluß von Cs A und [DAT-Sar]<sup>3</sup>CsA auf den Aktivierungsgrad von p38.**

Humane T-Lymphozyten wurden mit CsA (**A** und **B**) bzw. [DAT-Sar]<sup>3</sup>CsA (**C** und **D**) in den angegebenen Konzentrationen für 30 min bei 37°C vorinkubiert. Anschließend erfolgte die Stimulation mit 40 nM PMA und 2 µM Ionomycin für 40 min bei 37°C. Die Zellen wurden durch das Kochen im Probenpuffer lysiert. Die Proben wurden in einer 15%igen SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulose geblottet und mit einem anti-p-p38-Ab untersucht (**A** und **C**). Die Blots wurden digitalisiert und densitometrisch ausgewertet (**B** und **D**). Mit einem anti-Cyp18-Ab wurde die relative Menge des Markerproteins Cyp18 detektiert und gleiche Gesamtproteinmengen in allen Proben nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Das Diagramm gibt die Mittelwerte (± SD) von drei unabhängigen Versuchen wieder.



Ähnlich zu den Versuchen, in denen die Menge an p-JNK detektiert wurde, führten auch hier die Applikation der beiden Substanzen CsA und [DAT-Sar]<sup>3</sup>CsA in einer konzentrationsabhängigen Weise zu einer drastischen Verminderung der p38-Aktivierung (Abb. 4.38). Für CsA wurde ein IC<sub>50</sub>-Wert von 200 ± 18 nM und für [DAT-Sar]<sup>3</sup>CsA ein IC<sub>50</sub>-Wert von 1 ± 0.1 µM bestimmt. Im Gegensatz dazu zeigten sich [AD-Ser]<sup>8</sup>CsA und [Ac-MeBmt]<sup>1</sup>CsH indifferent in Bezug auf den Aktivierungsgrad der MAP-Kinase p38.

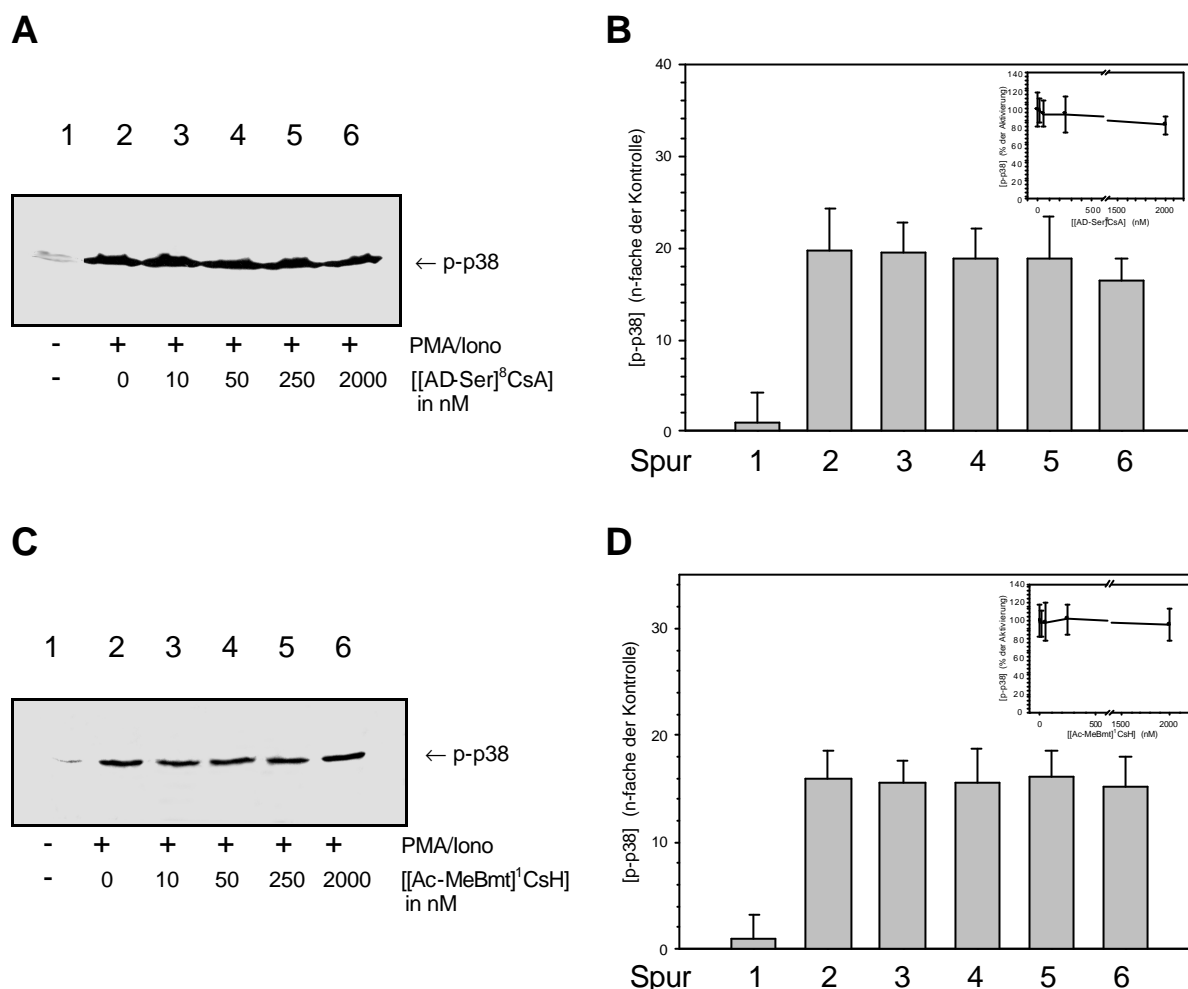


Abb. 4.39: **Einfluß von [AD-Ser]<sup>8</sup>CsA und [Ac-MeBmt]<sup>1</sup>CsH auf den Aktivierungsgrad von p38.**

Humane T-Lymphozyten wurden mit [AD-Ser]<sup>8</sup>CsA (**A** und **B**) bzw. [Ac-MeBmt]<sup>1</sup>CsH (**C** und **D**) in den angegebenen Konzentrationen für 30 min bei 37°C vorinkubiert. Anschließend erfolgte die Stimulation mit 40 nM PMA und 2 µM Ionomycin für 40 min bei 37°C. Die Zellen wurden durch das Kochen im Probenpuffer lysiert. Die Proben wurden in einer 15%igen SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulose geblottet und mit einem anti-p-p38-Ab untersucht (**A** und **C**). Die Blots wurden digitalisiert und densitometrisch ausgewertet (**B** und **D**). Mit einem anti-Cyp18-Ab wurde die relative Menge des Markerproteins Cyp18 detektiert und gleiche Gesamtproteinmengen in allen Proben nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Das Diagramm gibt die Mittelwerte (± SD) von drei unabhängigen Versuchen wieder.

Es kann zusammengefaßt werden, daß die Menge an p-JNK und p-p38 in humanen T-Zellen durch Inkubation mit CsA und [DAT-Sar]<sup>3</sup>CsA vermindert wird. [AD-Ser]<sup>8</sup>CsA und [Ac-MeBmt]<sup>1</sup>CsH waren dazu nicht in der Lage. Die intrazelluläre Konzentration an p-ERK1/2 wird durch CsA, [DAT-Sar]<sup>3</sup>CsA und [AD-Ser]<sup>8</sup>CsA geringfügig beeinflusst.

## 5 Diskussion

### 5.1 Gossypol inhibiert Calcineurin *in vitro* und *in vivo*

Auf der Suche nach niedermolekularen CaN-Inhibitoren wurde das polyphenolische Aldehyd Gossypol als reversibler und direkt auf das CaN wirkender Inhibitor in einer Substanzsammlung identifiziert (Abb. 4.1). Wie Literatur-Recherchen ergaben, wurde Gossypol bislang noch nicht im Zusammenhang mit Phosphatasen genannt. In Abb. 5.1 sind die wichtigsten Ergebnisse der enzymkinetischen und zellbiologischen Versuche tabellarisch zusammengefaßt.

Assay	IC <sub>50</sub> -Wert		
	Gossypol	Gossypolon	Apogossypol hexaazetat
CaN-Inhibition			
RII-Phosphopeptid als Substrat	17 µM	9 µM	k.I.
CaN-Inhibition			
pNPP als Substrat	14 µM	6 µM	k.I.
Reversibilität der CaN-Inhibition	vollständig reversibel	reversibel mit partiell kovalentem Anteil	k.I.
Hemmtyp	nicht-kompetitiv	nicht untersucht	k.I.
Cyp18-Inhibition	90 % RA bei 120 µM	nicht untersucht	nicht untersucht
FKBP12-Inhibition			
hPar18-Inhibition			
Inhibition der PP1	84 % RA bei 100 µM	nicht untersucht	nicht untersucht
Inhibition der PP2A	k.I.	nicht untersucht	nicht untersucht
Inhibition der PP2C	85 % RA bei 100 µM	nicht untersucht	nicht untersucht
Translokation von NFAT aus Zytosol	Inhibition	nicht untersucht	k.I.
NFAT-Reporter-gen-Assay	15 µM	nicht untersucht	k.I.
NFAT-EMSA	13 µM	nicht untersucht	k.I.

Abb. 5.1: Daten der enzymkinetischen und zellbiologischen Charakterisierung von Gossypol, Gossypolon und Apogossypol hexaazetat.

Während CaN durch Gossypol mit einem  $IC_{50}$ -Wert von  $17 \pm 1 \mu\text{M}$  und durch Gossypolon mit einem  $IC_{50}$ -Wert von  $9 \pm 1 \mu\text{M}$  im RII-Phosphopeptid-Test gehemmt wird, zeigte Apogossypol hexaazetat nur eine geringe CaN-Inhibition mit  $IC_{50}$ -Werten  $\gg 100 \mu\text{M}$  (Abb. 4.2). Ähnliche Daten wurden auch in einem Phosphatase-Assay mit dem unphysiologischen Substrat pNPP gemessen (Abb. 4.3).

CsA und FK506 inhibieren CaN auch sehr potent in einer nicht-kompetitiven Weise mit  $IC_{50}$ -Werten von 100 nM und 57 nM (Liu et al., 1991), bei der jedoch die vorherige Bindung an das gegenwärtige Immunophilin - als *Matchmaker*-Protein - essentiell für die Inhibition ist. Gleichzeitig wird auch die PPIase-Aktivität der Immunophiline gehemmt (Fischer et al., 1989a), was eine Ursache für die zahlreichen biologischen Effekte der Immunsuppressiva CsA und FK506 sein könnte. Im Gegensatz dazu werden bei Gossypol-Konzentrationen von 120  $\mu\text{M}$  nur 10 % der PPIase-Aktivität von hCyp18, hFKBP12 und hPar18 inhibiert (Abb. 4.10). In der Literatur sind zahlreiche Beispiele aufgeführt, in denen bestimmte Folgeerscheinungen nach CsA- oder FK506-Anwendung auf eine CaN-Inhibition zurückgeführt werden. Genau genommen könnte aber auch die Inhibition der PPIasen ursächlich sein (Ahlers et al., 1999; Bennett et al., 1996; Marumo et al., 1995).

Obwohl eine signifikante Homologie zwischen den katalytischen Untereinheiten der Proteinphosphatasen besteht, ist die CaN-Inhibition durch die Immunsuppressivum/Immunophilin-Komplexe sehr spezifisch, da sich diese Komplexe nur in der Nähe des aktiven Zentrums anlagern. Die katalytische Untereinheit des CaN ist nicht direkt in den Inhibitionsmechanismus einbezogen (Liu et al., 1992b; Griffith et al., 1995). Eine ähnlich hohe Spezifität gegenüber CaN (PP2B) zeigte auch Gossypol. Die anderen untersuchten Ser/Thr-Proteinphosphatasen PP1, PP2A und PP2C wurden selbst bei Gossypol-Konzentrationen von 100  $\mu\text{M}$  kaum gehemmt (Abb. 4.9). Diese Spezifität ist in Übereinstimmung mit dem gemessenen nicht-kompetitiven Hemmtyp. CaN-Inhibitoren, die direkt im aktiven Zentrum binden (Microcystin) oder Inhibitoren, die einen gemischten Hemmtyp zeigen (Okadasäure), fehlt diese Spezifität (Enz et al., 1994).

Gossypol hat selber aber auch einen Einfluß auf die CaN-Bindung des CsA/Cyp18-Komplexes, da dieser durch Konkurrenz vom CaN verdrängt wird (Abb. 4.8). Außerdem konnte enzymkinetisch der Beweis erbracht werden, daß die Gossypol-Bindungsstelle mit der des CsA/Cyp18-Komplexes identisch sein könnte (Abb. 4.7). Die Struktur des CaN/CsA/Cyp18-Komplexes wurde erst kürzlich veröffentlicht (Huai et al., 2002). Sie ähnelt stark der Struktur des CaN/FK506/FKBP12-Komplexes (Griffith et al., 1995).

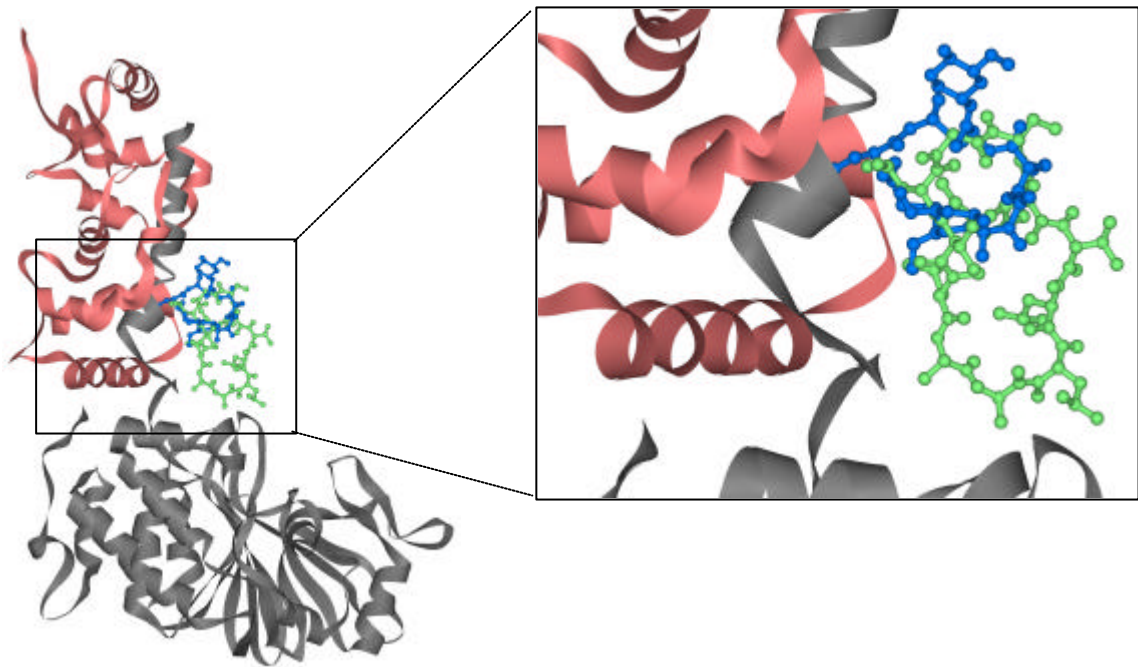


Abb. 5.2: **Struktur des humanen CaN mit gebundenem CsA bzw. FK506.**

Die Röntgen-Kristallstrukturen des CsA/Cyp18/CaN- und des FK506/FKBP12-Komplexes wurden computertechnisch überlagert, wobei die katalytische Untereinheit in beiden Komplexen (grau) als Bezugspunkt diente. Zur besseren Visualisierung wurden das Cyp18 und das FKBP12 aus der Grafik entfernt. Das CsA ist grün und das FK506 blau dargestellt.

Beide PPIase/Inhibitor-Komplexe binden dabei nur in der Nähe des aktiven Zentrums des Enzyms (Abb. 5.2). Somit kann nach Auswertungen der vorliegenden experimentellen Daten davon ausgegangen werden, daß auch Gossypol nicht direkt im aktiven Zentrum, sondern nur in seiner Nähe binden kann. Es sind insgesamt 23 Aminosäure-Reste des CaN an der Bindung des CsA/Cyp18-Komplexes beteiligt. Demzufolge müßte Gossypol mit einem Teil dieser Aminosäuren aus der katalytischen und/oder aus der regulatorischen Untereinheit interagieren.

Erste Anzeichen für einen nicht-kompetitiven Hemmtyp wurden auch aus dem nahezu deckungsgleichen Verlauf der Inhibitionskurven in Abb. 4.4 bei unterschiedlichen pNPP-Konzentrationen erhalten. Diese Vermutung konnte durch weitere Meßreihen und einer Dixon-Auftragung bestätigt werden (Abb. 4.5). Gleichzeitig konnte aus dieser Auftragung ein  $K_i$ -Wert von 17  $\mu\text{M}$  ermittelt werden.

Da für die Aktivierung von CaN sowohl Calcium als auch Calmodulin erforderlich sind (Klee et al., 1979), wäre es möglich, daß die gemessene CaN-Inhibition durch Gossypol auf eine Beeinflussung von Calmodulin oder der Calmodulin-Bindungsstelle des CaN zurückzuführen ist. Experimente, bei denen steigende Calmodulin-Konzentrationen nicht zu einer Vergrößerung des  $\text{IC}_{50}$ -Wertes führten, sprechen jedoch nicht für diesen Mechanismus (Abb. 4.6).

Weiterhin ist die Inhibition der CaN-Aktivität durch Gossypol im pNPP-Assay ein zusätzliches Indiz für das Fehlen einer Calmodulin-Beteiligung, da die Dephosphorylierung des pNPP durch CaN Calmodulin-unabhängig verläuft. Diese Experimente waren von besonderer Bedeutung, da in der Literatur bereits die physikalische Interaktion von Gossypol mit Calmodulin *in vitro* beschrieben ist (Jinsart et al., 1991).

CaN ist eine binukleäre Fe-Zn-Metallo-Phosphatase. Im aktiven Zentrum dieses Enzyms ist vermutlich ein zweiwertiges Eisen-Ion lokalisiert, was auch die hohe Sensitivität gegenüber oxidativen Prozessen erklären könnte (Wang et al., 1996). In diesem Zusammenhang wird aber ebenso die kovalente Modifikation von Cystein-Resten diskutiert (Bogumil et al., 2000). Diese Oxidationsprozesse können zu einer Inaktivierung des CaN führen, die jedoch durch den Zusatz von Ammoniumeisen(II)-sulfat (Wang et al., 1996), Dithiothreitol oder der Oxidoreduktase Thioredoxin (Bogumil et al., 2000) wieder rückgängig gemacht werden kann. Aus diesem Grund wurde die Gossypol-vermittelte CaN-Inhibition auch in Gegenwart von Ammoniumeisen(II)-sulfat und 5 mM DTT gemessen. Der Zusatz dieser reduzierenden Verbindungen konnte die Hemmung der CaN-Aktivität jedoch nicht verhindern. Somit kann ein Redox-Mechanismus als Ursache der CaN-Inhibition durch Gossypol weitestgehend ausgeschlossen werden. Aber auch eine kovalente Modifikation des CaN durch Gossypol kommt vermutlich nicht in Betracht, da ein großer Teil der CaN-Aktivität durch Dialyse wiederhergestellt werden konnte (Abb. 4.11) und dieser Anteil - im Gegensatz zu Gossypolon - mit längeren Präinkubationszeiten nicht abnahm (Abb. 4.12).

Gossypol inhibiert CaN unabhängig von der Art des Substrates, da neben der Dephosphorylierung des RII-Phosphopeptids auch die des pNPP und Phospho-Caseins vermindert wird. Dieser Umstand steht in Kontrast zu dem Verhalten der CsA/Cyp18- bzw. FK506/FKBP12-Komplexe, die zwar die CaN-Aktivität hemmen, wenn das RII-Phosphopeptid als Substrat benutzt wird, jedoch die CaN-Aktivität im pNPP-Test um das 2-4fache steigern (Liu et al., 1991; Swanson et al., 1992).

Für Gossypol wurde nicht nur *in vitro* ein Einfluß auf die Dephosphorylierung von pNPP, RII-Phosphopeptid und Phospho-Casein untersucht, sondern zusätzlich auch auf die Dephosphorylierung eines Phosphoproteins *in vivo*.

Es wurde bereits mehrmals gezeigt, daß die IL-2-Produktion, und damit auch die T-Zell-Proliferation, durch eine CsA/Cyp18- bzw. FK506/FKBP12-Komplex-vermittelte Inhibition der NFAT-Dephosphorylierung beeinflusst werden kann (Liu et al., 1992a; Shaw et al., 1995). Deshalb wurde die CaN-abhängige Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFAT in Gegenwart von Gossypol und dem strukturähnlichen Apogossypol hexaazetat in T-Lymphozyten beobachtet.

NFATc1, als typisches CaN-Substrat, migriert in der SDS-PAGE mit einer molekularen Masse von 90-115 kDa. Nach dem Transfer der aufgetrennten Proteine wurde das Zytosol mit einem spezifischen Antikörper auf die Anwesenheit von NFATc1 untersucht. Gossypol kann die Dephosphorylierung von NFATc1 und damit die Translokation in den Zellkern in einer konzentrationsabhängigen Weise verhindern, während Apogossypol hexaazetat dazu nicht in der Lage ist (Abb. 4.13). Das CsA zeigte, wie bereits in der Literatur beschrieben (Shaw et al., 1995), in diesem Versuch einen ähnlichen Effekt wie Gossypol. Da diese Effekte auch auf andere Ursachen, wie z.B. Hemmung einer Proteinkinase oder Protease zurückzuführen sein könnten, wurde das Ergebnis noch durch weitere Experimente abgesichert. Dazu bot sich ein Luciferase-gekoppelter NFAT-Reporter-Gen-Assay an. Mit Hilfe dieses funktionellen Assays konnte gezeigt werden, daß die Abnahme der NFATc1-Menge im Zytosol mit der NFAT-Aktivität und demzufolge mit der NFAT-Dephosphorylierung korreliert (Abb. 4.14).

Gleichzeitig wurde bewiesen, daß Gossypol *in vivo* die Bindung von NFAT an spezifische DNA-Sequenzen und somit die Transkription von Genen verändern kann. Die Inhibition wurde als Abnahme der Luciferase-Expression detektiert. Zusätzlich wurde auch ein EMSA für NFAT durchgeführt. Bei diesem Gelshift-Experiment wurden Kern-Extrakte von humanen T-Zellen präpariert, die vorher mit Gossypol, Apogossypol hexaazetat oder CsA behandelt wurden. Nur in den Fällen, in denen NFAT eine hohe Affinität zu spezifischen DNA-Bindemotiven zeigt, kommt es zu einer Retardierung des radioaktiv markierten Oligonukleotids. Die Sequenz des Oligonukleotids wurde vom distalen Teil des humanen IL-2-Promotors abgeleitet. Unter den getesteten Substanzen waren nur Gossypol und CsA in der Lage, einer PMA/Ionomycin-vermittelten Steigerung der NFAT-Affinität zu spezifischen DNA-Sequenzen entgegenzuwirken (Abb. 4.15).

Das polyphenolische Aldehyd Gossypol hat in Zell-Experimenten gegenüber peptidischen CaN-Inhibitoren (Sagoo et al., 1996; Coghlan et al., 1995) die Vorteile einer hohen Zellpermeabilität (Vander Jagt et al., 2000) und Resistenz gegenüber proteolytischem Abbau.

Die Identifizierung von Gossypol als wirksamen CaN-Inhibitor wirft ein neues Licht auf bereits bekannte Gossypol-Effekte, wie z.B. Antifertilisation oder Hemmung des proliferativen Wachstums von Tumor-Zellen und könnte vielleicht auch die Nebenwirkungen der kontrazeptiven Therapie erklären (Poso et al., 1980; Coyle et al., 1994; Flack et al., 1993; Frick et al., 1988). Für Gossypol wurde jedoch auch die Inaktivierung intrazellulärer Dehydrogenasen (Meksongsee et al., 1970), Proteinkinasen (Qi et al., 1984), Steroid-synthetisierender Enzyme (Lin et al., 1981), Cathepsin L (McDonald und Kadkhodayan, 1988) und Topoisomerase II (Adlakha et al., 1989) beschrieben.

Außerdem sind nicht-kovalente Enzym-Gossypol-Komplexe von Proteinkinase C ( $IC_{50}= 31 \mu\text{M}$ ) (Kimura et al., 1985), Proteinkinase A ( $IC_{50}= 10 \mu\text{M}$ ) (Xiao et al., 1993) und der NADH-bindenden Domäne der LDH ( $IC_{50}= 1\mu\text{M}$ ) (Tso und Lee, 1982) bekannt. Aufgrund seiner chemischen Struktur ist Gossypol außerdem in der Lage, die Phospholipase  $A_2$  nach kovalenter Modifikation des *N*-Terminus durch Bildung einer Schiff'schen Base zu inhibieren (Yu et al., 1997a). In malignen Zell-Linien wirkt Gossypol durch irreversible Arretierung der Zellen in der S-Phase antiproliferativ (Gilbert et al., 1995). In klinischen Studien konnte diese anti-Tumor-Aktivität jedoch nicht in jedem Fall bestätigt werden, wie VAN POZNAK et al. für refraktäre Brustkrebs-Metastasen beschreibt (Van Poznak et al., 2001). Für das Gossypol-Derivat Gossypolon wurde ebenfalls spermizidale Aktivität und Veränderungen in der Morphologie von Tumor-Zellen nachgewiesen. Da die Effekte weit geringer sind als die des Gossypols, kann man auf einen CaN-unabhängigen Signalweg schließen (Kim et al., 1984; Gilbert et al., 1995).

Einige Untersuchungen beschäftigen sich mit der Wirkung von Gossypol auf die Protein-Phosphorylierung. So wurde in Retinoblastoma-Zellen nach Gossypol-Behandlung eine Abnahme des Verhältnisses von phosphorylierten zu unphosphorylierten regulatorischen Proteinen des Zell-Zyklus beobachtet. Vermutlich wird aber in diesem Fall eine Proteinkinase durch Gossypol beeinflusst (Ligueros et al., 1997). Interessanterweise wird die Aktivität der Ornithindecaboxylase und demzufolge auch die Proliferation von Nb2-Lymphoma-Zellen der Ratte nach Prolaktin-Stimulation, sowohl durch Gossypol als auch durch CsA gehemmt (Shidaifat et al., 1997). Das könnte auf eine Beteiligung von CaN hindeuten.

Alle Ergebnisse zusammenfassend, kann man Gossypol als einen reversiblen Inhibitor bezeichnen, der unter den Ser/Thr-Proteinphosphatasen spezifisch für CaN ist. Trotzdem kann man mit dieser Substanz *in vivo* keine CaN-Effekte aufklären, da CaN nicht das einzige zelluläre Target für Gossypol ist. Die in zahlreichen Studien belegte Toxizität von Gossypol gegenüber primären Zellen und Zell-Linien ist ein weiterer Faktor, der die klinische Verwendung von Gossypol als Medikament ausschließen würde (Ye et al., 1983; Coyle et al. 1994; Blackstaffe et al. 1997).

Obwohl Gossypol auch die Aktivität zahlreicher anderer Enzyme beeinflusst, könnte diese Substanz als Leitstruktur für die Synthese neuer CaN-Inhibitoren fungieren, die sich durch eine Hemmung der CaN-Aktivität im nanomolaren Bereich, geringe Zytotoxizität und einer Indifferenz gegenüber anderen Gossypol-sensitiven Enzymen auszeichnen.

## 5.2 [DAT-Sar]<sup>3</sup>CsA inhibiert CaN *in vitro* und *in vivo*

Die Entdeckung des zyklischen Undekapeptids CsA in den 70er Jahren des letzten Jahrhunderts hat die Transplantationsmedizin revolutioniert. Obwohl schon alternative Behandlungsstrategien erarbeitet und immer neue immunsuppressive Substanzen klinisch eingesetzt werden, ist CsA neben Tacrolimus (FK506) bei der Prophylaxe und Therapie schwerer Abstoßungsreaktionen nicht mehr wegzudenken. Der hohen Wirksamkeit stehen jedoch zahlreiche Nebenwirkungen entgegen. Möglicherweise werden diese Nebenwirkungen durch die Bindung des CsA an das *Matchmaker*-Protein Cyclophilin verursacht. Simultan dazu wird auch die PPIase-Aktivität der ubiquitär vorkommenden Cyclophiline gehemmt (Fischer et al., 1989a). Der so gebildete CsA/Cyclophilin-Komplex bindet und inhibiert die Calcium/Calmodulin-abhängige Proteinphosphatase CaN, wodurch verschiedene andere Signalwege beeinflusst werden (Liu et al., 1991; Fruman et al., 1992a). Besonders hervorzuheben ist dabei der NFAT-Signalweg, der als Bestandteil des T-Zell-Signalnetzwerkes maßgeblich für die Sekretion von Zytokinen und damit für eine Zell-Proliferation nach Antigen-Kontakt verantwortlich ist (Loh et al., 1996b; Batiuk et al., 1997). Weder CsA noch FK506 allein können CaN inhibieren. Aus diesem Grund wurden in der Vergangenheit intensive Anstrengungen unternommen, Cyclosporine zu entwickeln, die zwar CaN inhibieren können, aber die enzymatische Aktivität der Cyclophiline nicht beeinflussen.

CsA ist ähnlich wie FK506 ein bifunktionales Molekül, da es mit einem Teil des Moleküls an CaN und mit einem anderen Teil des Moleküls an eine PPIase der Cyclophilin-Familie binden und diese inhibieren kann (Fruman et al., 1995; Liu et al., 1991; Schreiber et al., 1992). Die Kristallstrukturen des FK506/FKBP12/CaN-Komplexes und die des CsA/Cyclophilin18/CaN-Komplexes sind bekannt (Griffith et al., 1995; Huai et al., 2002). Überraschenderweise binden die beiden strukturell sehr unterschiedlichen Inhibitor-Komplexe in der so genannten *latch*-Region des CaN, die eine Tertiärstruktur darstellt und durch Interaktion der B-Untereinheit mit der A-Untereinheit des CaN geformt wird (Abb. 5.3). Jedoch sind die Reste, die zur Bindung beitragen, different (Huai et al., 2002). Die gezielte Modifikation des CsA-Moleküls, speziell in den Kontaktregionen zum Cyclophilin bzw. CaN, sollte Derivate mit neuen biochemischen Eigenschaften hervorbringen. So ist das [AD-Ser]<sup>8</sup>CsA-Derivat in Position 8 - der CaN-Kontaktregion - verändert (Abb. 5.3). Im Gegensatz dazu ist das CsA-Derivat [DAT-Sar]<sup>3</sup>CsA in Position 3 - an der Grenzfläche zwischen Cyclophilin und CaN - substituiert. Ein weiteres Cyclosporin-Derivat, das sich in zwei Positionen vom CsA unterscheidet, ist [Ac-MeBmt]<sup>1</sup>CsH.



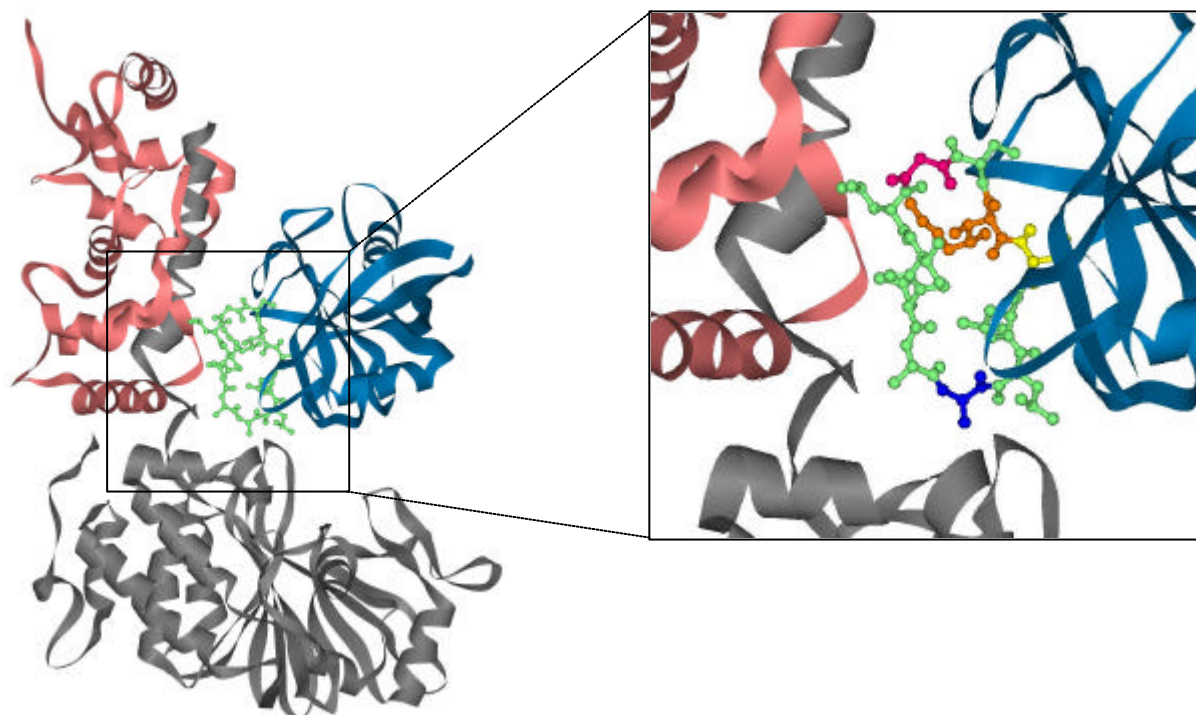


Abb. 5.3: **Ausschnitt aus der Röntgen-Kristallstruktur des CsA/Cyp18/CaN-Komplexes (Huai et al., 2002).**

Das Bild zeigt CsA im Komplex mit CaN und Cyp18. In der Vergrößerung sind die Positionen, welche in den getesteten Substanzen im Vergleich zu CsA verändert sind, farblich markiert. Im [DAT-Sar]<sup>3</sup>CsA ist das (L)-Sarkosin in Position 3 (violett) durch ein (R) $\alpha$ -N,N-Dimethylaminoethylthio-(L)-Sarkosin substituiert. Im [AD-Ser]<sup>8</sup>CsA ist das (D)-Alanin in Position 8 (blau) durch ein 2-Amino-3-[(5-amino-pentylcarbamoyl)-methoxy]-propionyl-(D)-Serin ersetzt. Das [Ac-MeBmt]<sup>1</sup>CsH besitzt ein Methyl-Valin (gelb), das in der für CsH typischen (D)-Konformation vorliegt. Dadurch hat die Acetylierung des MeBmt in Position 1 (orange) einen Einfluß auf die Cyclophilin-Bindung.

In unserer Arbeitsgruppe wurden mehrere Cyclosporin-Derivate synthetisiert, von denen im Rahmen dieser Arbeit die oben erwähnten Derivate [DAT-Sar]<sup>3</sup>CsA, [AD-Ser]<sup>8</sup>CsA, [Ac-MeBmt]<sup>1</sup>CsH und zusätzlich CsA eingehender enzymkinetisch und zellbiologisch charakterisiert wurden. Die wichtigsten Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Abb. 5.4 tabellarisch zusammengefaßt. CsA ist hier das einzige untersuchte Cyclosporin, von dem Literatur-Daten vorliegen.

In einem ersten Test wurden die vier Substanzen auf das Vorhandensein eines inhibitorischen Potentials gegenüber Cyp18 untersucht (Abb. 4.17). Sowohl CsA als auch [DAT-Sar]<sup>3</sup>CsA und [AD-Ser]<sup>8</sup>CsA waren in der Lage, Cyclophilin in nanomolaren Konzentrationen ( $IC_{50}$ = 1.3 bis 10.2 nM) zu inhibieren. Nur hohe Konzentrationen von [Ac-MeBmt]<sup>1</sup>CsH zeigten eine geringfügige Hemmung der PPlase-Aktivität (6 % Aktivitätsverlust bei 10  $\mu$ M [Ac-MeBmt]<sup>1</sup>CsH). Dieses Resultat läßt sich mit der Modifizierung in Position 1 erklären (Abb. 4.16).

Die Position 1 ist zentral in der Kontaktregion zum Cyclophilin lokalisiert und führt nach Acetylierung sowohl bei CsA als auch CsH zu einer Verminderung der Cyp18-Bindung. Im Gegensatz dazu kann aber durch Einführung einer  $\alpha$ -Methylgruppe in Sar<sup>3</sup> des CsH, die Inhibition von Cyp18 erheblich gesteigert werden (persönliche Mitteilung von Dr. Zhang).

Assay	IC <sub>50</sub> -Wert				
	CsA	[DAT-Sar] <sup>3</sup> CsA	[AD-Ser] <sup>8</sup> CsA	[Ac-MeBmt] <sup>1</sup> CsH	
Cyp18-Inhibition	1.3 nM	3.6 nM	10.2 nM	94 %RA bei 10 $\mu$ M	
CaN-Inhibition					
RII-Phosphopeptid als Substrat	+ Cyp18	110 nM	k.l.	k.l.	k.l.
	- Cyp18	k.l.	1 $\mu$ M	k.l.	k.l.
CaN-Inhibition					
pNPP als Substrat	+ Cyp18	Aktivierung	k.l.	k.l.	k.l.
	- Cyp18	k.l.	k.l.	k.l.	k.l.
Reversibilität der CaN-Inhibition	nicht untersucht	vollständig reversibel	nicht untersucht	nicht untersucht	
Hemmtyp	nicht untersucht	nicht-kompetitiv	nicht untersucht	nicht untersucht	
Inhibition der PP1	k.l.*	k.l.	nicht untersucht	nicht untersucht	
Inhibition der PP2A	k.l.*	k.l.	nicht untersucht	nicht untersucht	
Inhibition der PP2C	k.l.*	k.l.	nicht untersucht	nicht untersucht	
NFAT-Reporter-gen-Assay	2 nM	60 nM	k.l.	k.l.	
NF $\kappa$ B-Reporter-gen-Assay	4 nM	1 $\mu$ M	75 nM	100 nM	
AP-1-Reporter-gen-Assay	komplexer Verlauf	komplexer Verlauf	>> 20 $\mu$ M	>> 20 $\mu$ M	
NFAT-EMSA	3 nM	70 nM	k.l.	nicht untersucht	
NF $\kappa$ B-EMSA	15 nM	23 nM	300 nM	500 nM	
AP-1-EMSA	komplexer Verlauf	komplexer Verlauf	> 20 $\mu$ M	50 nM	
ERK1/2	komplexer Verlauf	komplexer Verlauf	> 2 $\mu$ M	k.l.	
JNK	200 nM	1 $\mu$ M	k.l.	k.l.	
p38	200 nM	1 $\mu$ M	k.l.	k.l.	

\* als CsA/Cyp18-Komplex

Abb. 5.4: Daten der enzymkinetischen und zellbiologischen Charakterisierung von CsA, [DAT-Sar]<sup>3</sup>CsA, [AD-Ser]<sup>8</sup>CsA und [Ac-MeBmt]<sup>1</sup>CsH.

Der Einfluß auf die Phosphatase-Aktivität von CaN wurde im Standard-Phosphatase-Assay mit RII-Phosphopeptid als Substrat bestimmt (Abb. 4.18). Dabei wurde die Enzym-Aktivität des CaN zum einen in Abhängigkeit von der Cyclosporin-Konzentration und zum

anderen in Abhängigkeit von der Cyclophilin-Konzentration bei einer konstanten Cyclosporin-Konzentration gemessen. Während [AD-Ser]<sup>8</sup>CsA und [Ac-MeBmt]<sup>1</sup>CsH in den Meßreihen keine Inhibition der Phosphatase-Aktivität zeigten, konnte für CsA nur in Anwesenheit von Cyclophilin eine drastische Senkung der Enzym-Aktivität beobachtet werden ( $IC_{50} = 110 \text{ nM}$ ), welche auch von anderen Arbeitsgruppen beschrieben worden ist (Liu et al., 1991). Überraschenderweise konnte das CsA-Derivat [DAT-Sar]<sup>3</sup>CsA die CaN-Aktivität auch ohne Mitwirkung von Cyp18 hemmen ( $IC_{50} = 1 \text{ } \mu\text{M}$ ). Dieser Umstand stellt ein neues Wirkprinzip eines Cyclosporin-Derivates dar, da alle bisher bekannten Cyclosporine nur im Komplex mit Cyclophilin, als *Matchmaker*-Protein, in einer als *gain of function* bezeichneten Weise CaN inhibieren konnten. Die Inhibitionskonstante konnte durch unabhängige Messungen mit dem Substrat Phospho-Casein bestätigt werden.

Im Phosphatase-Test mit dem unphysiologischen Substrat pNPP konnte für keine der Substanzen eine Inhibition nachgewiesen werden. Dieses war auch dann nicht der Fall, wenn Cyclophilin dem Meßansatz zugesetzt wurde. Die von LIU et al. und SWANSON et al. bereits erwähnte Aktivierung der CaN-Aktivität um den Faktor 3-4 durch den CsA/Cyclophilin-Komplex konnte auch in unseren Versuchsreihen bestätigt werden (Abb. 4.18 A) (Liu et al., 1991; Swanson et al., 1992). Eine eindeutige Erklärung für dieses Phänomen ist bislang noch nicht gefunden worden. Es ist überhaupt überraschend, daß CaN als Ser/Thr-Proteinphosphatase das pNPP, welches von seiner chemischen Struktur mehr einem Phospho-Tyrosin als einem Phospho-Serin oder -Threonin ähnelt, dephosphorylieren kann. Einige Autoren vertreten jedoch die Auffassung, daß CaN auch eine intrinsische Tyr-Proteinphosphatase-Aktivität besitzt, die durch eine Konformationsänderung des Proteins noch zusätzlich verstärkt wird (Pallen und Wang, 1983; Kincaid et al., 1986; Donella-Deana et al., 1994). Das [DAT-Sar]<sup>3</sup>CsA ist nur ein CaN-Inhibitor für die Dephosphorylierung von Phosphopeptiden und Phosphoproteinen, nicht jedoch für die des artifiziellen Phosphatase-Substrates pNPP. Ein Grund dafür könnte die im Vergleich zu Peptiden und Proteinen geringere Größe des pNPP sein, die dem Substrat den Zugang zum aktiven Zentrum erleichtert.

Mißt man die CaN-Aktivität gegenüber RII-Phosphopeptid in Anwesenheit variabler [DAT-Sar]<sup>3</sup>CsA-Konzentrationen und variabler Substrat-Konzentrationen ergibt der Dixon-Plot einen  $K_i$ -Wert von  $1.1 \text{ } \mu\text{M}$  und einen nicht-kompetitiven Hemmtyp (Abb. 4.20).

Um zu überprüfen, ob [DAT-Sar]<sup>3</sup>CsA/Cyp18-Komplexe auch CaN-inhibierend sind, wurden Konkurrenzexperimente durchgeführt. Dabei wurde gemessen, inwieweit steigende Mengen an Cyclophilin die Phosphatase-Aktivität von partiell [DAT-Sar]<sup>3</sup>CsA-inhibiertem CaN beeinflussen (Abb. 4.21).

Das an die Phosphatase gebundene [DAT-Sar]<sup>3</sup>CsA konnte durch steigende Konzentrationen an Cyclophilin kompetitiert und CaN somit reaktiviert werden. Das bestätigt den Befund, daß nur das freie [DAT-Sar]<sup>3</sup>CsA in der Lage ist, CaN zu hemmen, der [DAT-Sar]<sup>3</sup>CsA/Cyp18-Komplex jedoch nicht. In Kopräzipitationsexperimenten wurde ein immobilisiertes GST-Cyp18-Fusionsprotein mit CsA bzw. [DAT-Sar]<sup>3</sup>CsA und CaN präinkubiert. Nach intensivem Waschen der Matrix wurden die gebundenen Proteine abgelöst und im Western Blot analysiert (Abb. 4.22). Nur in dem CsA-haltigen Probe war CaN nachweisbar. Deshalb kann man davon ausgehen, daß sich nur mit CsA ein Inhibitor/Cyp18/CaN-Ternärkomplex ausbilden kann.

Die Spezifität der CaN-Inhibition mußte in einem weiteren Versuch abgeklärt werden, da sowohl die PP1 als auch die PP2A und CaN im aktiven Zentrum ein sogenanntes „Phosphoesterase-Motiv“ mit einem binukleären Zentrum besitzen (Cohen, 1989). Dazu wurde ein prototypischer Vertreter jeder dieser Phosphatase-Typen und die PP2C als weitere Ser/Thr-Proteinphosphatase mit zwei [DAT-Sar]<sup>3</sup>CsA-Konzentrationen und einem äquimolaren CsA/Cyp18-Gemisch inkubiert und die Restaktivität gegenüber Phosphorylase a bzw. Phospho-Casein ermittelt (Abb. 4.23). Nur die PP2B (CaN) konnte durch [DAT-Sar]<sup>3</sup>CsA und das CsA/Cyp18-Gemisch inhibiert werden. Alle anderen drei Phosphatasen blieben unbeeinflusst.

Um abzuklären, ob die [DAT-Sar]<sup>3</sup>CsA-Bindungsstelle des CaN mit der des FK506/FKBP12-Komplexes identisch ist, wurden enzymkinetische Messungen durchgeführt. Die Auswertung der Daten erfolgte nach einem Modell von KELETI (Abb. 4.24) (Keleti, 1986). Der mathematische und enzymkinetische Hintergrund ist im Kapitel Material und Methoden näher erläutert. Der Kurvenverlauf der Meßwert-Auftragung ähnelte dem einer simulierten Inhibitionskurve, bei der beide Inhibitoren die gleiche Bindungsstelle am CaN beanspruchen. Obwohl die Inhibition von CaN durch [DAT-Sar]<sup>3</sup>CsA *in vitro* hinreichend untersucht wurde, mußte noch der Beweis erbracht werden, daß diese Phosphatase auch *in vivo* durch [DAT-Sar]<sup>3</sup>CsA gehemmt wird.

Die Verwendung von humanen T-Lymphozyten als Untersuchungsobjekt für *in vivo* CaN-Experimente hat den entscheidenden Vorteil, daß die gesammelten Daten die physiologischen Zusammenhänge besser widerspiegeln können als Zell-Linien. Die Reaktion von Signalwegen artifizierlicher Zell-Linien, wie z.B. Jurkat-Zellen, können sich zum Teil grundlegend von denen primärer Zellen unterscheiden (Manger et al., 1986; Kreideweiss et al., 1999).

Die phosphorylierte Form des Transkriptionsfaktors NFAT ist als typisches *in vivo*-Substrat für CaN bekannt und bereits in vielen Zell-Typen nachgewiesen worden (Jain et al., 1993; Luo et al., 1996b).

Er wird deshalb exemplarisch von zahlreichen Wissenschaftlern zum Nachweis einer CaN-Aktivierung bzw. -Inhibierung verwendet (Swoap et al., 2000; Masuda et al., 1997). CaN bindet am NFATc1 an die hochkonservierten Aminosäuren 118 bis 129 einer Pro-X-Ile-X-Ile-Thr-Konsensussequenz (Aramburu et al., 1999b). Durch Mutationsanalysen konnten die phosphorylierten Reste Ser<sup>172</sup> und Ser<sup>187</sup> der Serin-reichen Domäne als potentielle Substrate für CaN identifiziert werden (Porter et al., 2000).

Als Methode der Wahl zur Bestimmung der NFAT-Transkriptionsaktivität wurde ein Reporter-gen-System angewandt, welches in Abhängigkeit von der Aktivität des NFAT das Reporter-Enzym Luciferase exprimiert. Zur Überprüfung des Systems wurde CsA untersucht, da diese Substanz *in vivo* als CaN-inhibierend bekannt ist. Das zur Ausbildung eines CaN/Inhibitor/Cyclophilin-Komplexes notwendige Cyclophilin kommt in den T-Lymphozyten in einer Konzentration von bis zu 850 nM vor (Ryffel et al., 1991). Außerdem ist CsA ein *tight binding*-Inhibitor, so daß nur die CsA-Konzentration als Limitierung anzusehen ist und die Konzentration des Inhibitor/Cyclophilin-Komplexes mit der des intrazellulären CsA nahezu identisch ist. Im Versuch war schon eine geringe CsA-Konzentration ausreichend, um die Transkriptionsaktivität des NFAT zu senken (Abb. 4.25). Es wurde ein IC<sub>50</sub>-Wert von 2 nM bestimmt. Dieser scheinbare Widerspruch zu dem *in vitro* ermittelten Wert von 100 nM für die CaN-Inhibition kann damit erklärt werden, daß vermutlich schon eine geringe Abnahme der CaN-Aktivität zu einer drastischen Abnahme der NFAT-Transkriptionsaktivität und damit zu einer verminderten Luciferase-Expression führt. Ähnliche Berichte wurden bereits in der Literatur gefunden (Dolmetsch et al., 1997; Feske et al., 2001). Aber auch ARAMBURU et al. fanden in ihren *in vivo*-Experimenten für CsA einen IC<sub>50</sub>-Wert im unteren nanomolaren Bereich (Aramburu et al., 1999b). Dieses Ergebnis wurde in diesem Artikel jedoch nicht diskutiert.

Das CsA ist ein relativ hydrophobes Molekül und kann deshalb die Zellmembran gut durchdringen und sich aufgrund des relativ hohen Cyclophilin-Gehaltes in der Zelle anreichern (Harding et al., 1986; Hohman und Hultsch, 1990). Neben dem passiven Transport durch Diffusion könnten auch spezielle Transportsysteme diese CsA-Akkumulation vermitteln. Von ALLAIN et al. wurde das Cyp 21 als ein Transportprotein identifiziert, welches für die Inkorporation von CsA in T-Lymphozyten verantwortlich ist (Allain et al., 1996). Der gleiche Anreicherungseffekt sollte auch bei [DAT-Sar]<sup>3</sup>CsA zum Tragen kommen, jedoch mit dem Unterschied, daß der gebildete [DAT-Sar]<sup>3</sup>CsA/Cyclophilin-Komplex das CaN nicht inhibieren kann. Für [DAT-Sar]<sup>3</sup>CsA wurde *in vivo* ein IC<sub>50</sub>-Wert von 60 nM bestimmt, der - im Vergleich zum CsA - um den Faktor 30 schlechter ist. Dies stellt eine Diskrepanz zu den *in vitro*-Daten dar, weil CaN in diesen Versuchen durch [DAT-Sar]<sup>3</sup>CsA nur 10fach schlechter als CsA inhibiert wurde.

Zu den pharmakokinetischen Eigenschaften, wie z.B. Aufnahme und Verteilung von [DAT-Sar]<sup>3</sup>CsA in der Zelle, liegen keine Daten vor. In Anlehnung an CsA sollte entsprechend den eingesetzten Konzentrationen und dem Massenwirkungsgesetz nach Anreicherung in der Zelle aber nur ein geringer Teil des [DAT-Sar]<sup>3</sup>CsA an das zytosolische Cyp18 gebunden sein. Möglicherweise hat [DAT-Sar]<sup>3</sup>CsA neben den Cyclophilinen noch andere Bindungspartner, welche die intrazelluläre Konzentration an [DAT-Sar]<sup>3</sup>CsA beeinflussen können. In eukaryontischen Zellen sind z.B. mehrere CsA-bindende Proteine beschrieben, die mit dem Cyclophilin 18 um eine Bindung konkurrieren (Ziegler et al., 1990; Demeule et al., 1998; Ziegler und Frimmer, 1986). Eine alternative Erklärung für dieses Phänomen könnte sein, daß sowohl der IC<sub>50</sub>-Wert der *in vitro* CaN-Inhibition als auch der Cyp18-Inhibition mit rekombinanten Proteinen gemessen wurde. Unter Umständen ist [DAT-Sar]<sup>3</sup>CsA im Komplex mit authentischem Cyp18 oder anderen zellulären Cyclophilinen doch in der Lage, an authentisches CaN zu binden. Vielleicht werden durch das [DAT-Sar]<sup>3</sup>CsA auch andere Signalwege effektiert, die dem Ca<sup>2+</sup>/CaN-Signalweg übergeordnet sind oder es werden Kinasen, welche NFAT im Kern rephosphorylieren, direkt oder indirekt gehemmt und somit das dynamische Gleichgewicht gestört. Die beiden Substanzen [AD-Ser]<sup>8</sup>CsA und [Ac-MeBmt]<sup>1</sup>CsH hatten keinen Einfluß auf die NFAT-kontrollierte Expression der Luciferase.

Zur Verifizierung der Reportergen-Ergebnisse wurde ein NFAT-Gelshift-Experiment durchgeführt. Als Probenmaterial wurde Kernextrakt von CsA- und [DAT-Sar]<sup>3</sup>CsA-behandelten T-Zellen verwendet. In diesem Test wird zum einen die Translokation des durch Dephosphorylierung aktivierten NFAT und zum anderen die durch Dephosphorylierung erhöhte Affinität des Transkriptionsfaktors zur einer DNA-Sequenz aus dem distalen Bereich des humanen IL-2-Promotors erfaßt. Es wurde bereits in zahlreichen Veröffentlichungen beschrieben, daß die Applikation von CaN-Inhibitoren das Bindevermögen von NFAT an diese Sequenzen vermindern kann (Randak et al., 1990; Brabletz et al., 1991).

Im NFAT-Gelshift-Experiment wurde für CsA ein IC<sub>50</sub>-Wert von 3 nM ermittelt (Abb. 4.26). In der Literatur ist ein NFAT-Gelshift beschrieben, in dem CsA in Jurkat-Zellen zu einer Inhibition der NFAT/DNA-Interaktion mit einem IC<sub>50</sub>-Wert von 7 nM führt (Batiuk et al., 1997). Für [DAT-Sar]<sup>3</sup>CsA konnte ebenfalls eine konzentrationsabhängige Abnahme der NFAT/DNA-Interaktion (IC<sub>50</sub>-Wert= 70 nM) beobachtet werden. Die in den Gelshift-Versuchen bestimmten Werte korrelieren gut mit den Daten aus den NFAT-Reportergen-Assays. Weder für [AD-Ser]<sup>8</sup>CsA noch für [Ac-MeBmt]<sup>1</sup>CsH konnte ein Einfluß beobachtet werden, so daß die Abnahme der NFAT/DNA-Interaktion vermutlich auf eine CaN-Inhibition zurückzuführen ist.

Da die Aktivierung von NFAT in T-Zellen als ein Schlüsselereignis der IL-2-Produktion anzusehen ist, können sowohl CsA als auch [DAT-Sar]<sup>3</sup>CsA die Proliferation und Expression von IL-2 in stimulierten T-Lymphozyten unterbinden (persönliche Mitteilung von Dr. R. Baumgräß).

CaN ist auch in den NF $\kappa$ B-Signalweg involviert. Wie ARAMBURU et al. zeigen konnten, führt die Inkubation von Jurkat-Zellen mit CsA im Reporter-gen-Assay zu einer Verminderung der Aktivität des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B (Aramburu et al., 1999b).

Im NF $\kappa$ B-Reporter-gen-Assay wurde überprüft, ob auch [DAT-Sar]<sup>3</sup>CsA diesen Effekt verursachen kann (Abb. 4.28). Als Kontrollen dienten [AD-Ser]<sup>8</sup>CsA und [Ac-MeBmt]<sup>1</sup>CsH, da beide die CaN-Aktivität und letztere Substanz auch die Cyp18-Aktivität nicht vermindern. Durch steigende CsA-Konzentrationen konnte die NF $\kappa$ B-Transkriptionsaktivität gesenkt werden ( $IC_{50}$  = 4 nM), ohne aber zu einer vollständigen Inhibition zu führen. In den Experimenten von ARAMBURU et al. konnte durch CsA auch keine vollständige Inhibition ( $IC_{50}$  = 3 nM) der NF $\kappa$ B-Transkriptionsaktivität erzielt werden (Aramburu et al., 1999b). Für [DAT-Sar]<sup>3</sup>CsA wurde im Vergleich mit CsA eine 250fach schlechtere Hemmung ( $IC_{50}$  = 1  $\mu$ M) gemessen. Aber auch [AD-Ser]<sup>8</sup>CsA und [Ac-MeBmt]<sup>1</sup>CsH waren in der Lage, die Reporter-gen-Expression mit  $IC_{50}$ -Werten von 75 nM bzw. 100 nM zu vermindern. Das Verhalten dieser beiden Substanzen im Reporter-gen-Assay schließt einen distinkten CaN-Einfluß auf den NF $\kappa$ B-Signalweg aus. Vielmehr wirken noch andere unbekannte CaN- und Cyclophilin-unabhängige Faktoren mit. Die große Diskrepanz zwischen dem  $IC_{50}$ -Wert von [DAT-Sar]<sup>3</sup>CsA und dem von CsA, [AD-Ser]<sup>8</sup>CsA und [Ac-MeBmt]<sup>1</sup>CsH könnte damit erklärt werden, daß [DAT-Sar]<sup>3</sup>CsA als einzige der untersuchten Substanzen in Position 3 modifiziert ist. Dadurch könnte [DAT-Sar]<sup>3</sup>CsA bevorzugt mit einem putativen Bindungspartner interagieren, welcher dann einen Einfluß auf die Regulation des NF $\kappa$ B-Signalweges ausübt.

Analog zu den NFAT-Versuchen wurden die Resultate des NF $\kappa$ B-Reporter-gen-Assays auch im p65-Gelshift-Experiment verifiziert. Dabei zeigte sich, daß CsA die p65/DNA-Interaktion mit einem  $IC_{50}$ -Wert von 15 nM hemmen konnte, das CsA-Derivat [DAT-Sar]<sup>3</sup>CsA aber mit einem  $IC_{50}$ -Wert 23 nM (Abb. 4.29). Die Abweichungen von den Resultaten des NF $\kappa$ B-Reporter-gen-Assays könnten zur Ursache haben, daß ein Oligonukleotid benutzt wurde, welches nur p65-Homodimere bzw. -Heterodimere binden kann. Somit werden Veränderungen der Transkriptionsaktivität anderer NF $\kappa$ B-Proteine nicht mitdetektiert. Des Weiteren werden in diesem Versuch auch Wechselwirkungen zwischen DNA und transkriptionell inaktiven NF $\kappa$ B-Komplexen erfaßt.

[AD-Ser]<sup>8</sup>CsA und [Ac-MeBmt]<sup>1</sup>CsH zeigten beide auch eine konzentrationsabhängige Verminderung der DNA-Bindung (Abb. 4.30). Obwohl [Ac-MeBmt]<sup>1</sup>CsH weder CaN noch Cyp18 inhibieren kann, wurde eine Beeinflussung des NFκB-Signalweges gemessen. [Ac-MeBmt]<sup>1</sup>CsH wurde durch chemische Modifizierung des CsH erhalten.

Wie WENZEL-SEIFERT et al. im Jahre 1991 feststellten, ist CsH ein potenter Inhibitor (IC<sub>50</sub>= 40 nM) der durch FMLP (Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin) stimulierten Superoxid-Bildung in neutrophilen Granulozyten (Wenzel-Seifert et al., 1991). Der Inhibitionsmechanismus des CsH ist vermutlich eine Stabilisierung der inaktiven Form des Formyl-Peptid-Rezeptors (Wenzel-Seifert et al., 1998). Diese Wirkung ist spezifisch für CsH, da die Inhibition nach Applikation anderer Cyclosporine, wie z.B. CsA, CsB, CsC oder CsD nicht beobachtet werden konnte (Wenzel-Seifert und Seifert, 1993). Ein weiterer biologischer Effekt ist die Verminderung des Keratinozyten-Wachstums nach Applikation von CsH bei hyperproliferativen Erkrankungen der Epidermis (Amsellem et al., 1992). Außerdem kann CsH die Phorbol-Ester-induzierten biologischen Effekte in der Haut von Mäusen und die Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-abhängige Dephosphorylierung des Elongationsfaktors 2 verhindern (Gschwendt et al., 1988). Das Methyl-Valin in der D-Konfiguration scheint für diese hohe Spezifität verantwortlich zu sein, da es einzigartig für CsH ist.

Da die AP-1-vermittelte Transkription einen wichtigen Schritt für die Proliferation und Differenzierung in T-Zellen darstellt, wurde sie in die Untersuchungen einbezogen (Wisdom, 1999; Macian et al., 2001). Während sowohl [AD-Ser]<sup>8</sup>CsA als auch [Ac-MeBmt]<sup>1</sup>CsH in der Lage waren, die AP-1-Transkriptionsaktivität im Reporteragen-Assay konzentrationsabhängig zu inhibieren, zeigten CsA- und [DAT-Sar]<sup>3</sup>CsA-Konzentrationen von 10 nM eine Aktivierung der Transkriptionsaktivität (Abb. 4. 31). Bei einer weiteren Erhöhung der Konzentration ist eine geringe Inhibition zu beobachten. Konzentrationen > 500 nM konnten die Inhibition aufheben und führten wieder zu einer Aktivierung der AP-1-Transkriptionsaktivität. Der Verlauf der Luciferase-Expression in Abhängigkeit von der CsA- bzw. [DAT-Sar]<sup>3</sup>CsA-Konzentration ist sehr komplex und könnte auf die Überlagerung mehrerer gegenläufiger Effekte zurückzuführen sein.

Die Stimulation der AP-1-Transkriptionsaktivität durch CsA wurde von SU et al. erstmals beschrieben und steht im Zusammenhang mit einer Steigerung der c-fos-Expression (Su et al., 1996). Eine ähnliche Beobachtung konnten auch NAVARRO-ANTOLIN et al. machen, als sie den Einfluß von CsA auf die AP-1-abhängige Induktion der endothelialen NOS untersuchten (Navarro-Antolin et al., 2000). Diese Effekte sind aber erst ab CsA-Konzentrationen  $\geq 1 \mu\text{M}$  untersucht und beschrieben worden.



Die Aktivierung durch geringe CsA-Konzentrationen wurde bislang noch nicht in der Literatur erwähnt. Ursache für die Aktivierung könnten Veränderungen in der Zusammensetzung des AP-1-Komplexes oder eine Modifikation der c-fos- bzw. c-jun-Proteine sein (Pyrzynska et al., 2000). Mit einer hohen Wahrscheinlichkeit kann man davon ausgehen, daß CaN an diesem Aktivierungseffekt beteiligt ist, da er nur bei der *in vivo* CaN-inhibierenden Substanz CsA und [DAT-Sar]<sup>3</sup>CsA auftrat. Das [AD-Ser]<sup>8</sup>CsA zeigte ebenfalls eine konzentrationsabhängige Inhibition der AP-1-Reporter-Gen-Expression (IC<sub>50</sub>-Wert >> 20 µM) (Abb. 4.31 C). Bei den [Ac-MeBmt]<sup>1</sup>CsH-behandelten T-Zellen war ab 100 nM eine sprunghafte Verminderung der exprimierten Luciferase-Menge um 37 % zu beobachten (IC<sub>50</sub>-Wert >> 20 µM).

Mit Hilfe von AP-1-Gelshift-Assays wurden die Ergebnisse der AP-1-Reporter-Gen-Experimente bestätigt. Bei zunehmenden CsA- und [DAT-Sar]<sup>3</sup>CsA-Konzentrationen ist eine initiale Erhöhung der DNA-Bindung zu verzeichnen, der sich eine Verringerung mit einem nachfolgenden Anstieg der AP-1-gebundenen DNA-Menge anschloß (Abb. 4.32). [AD-Ser]<sup>8</sup>CsA verhielt sich in diesem Untersuchungssystem vollkommen indifferent. Das CsH-Derivat [Ac-MeBmt]<sup>1</sup>CsH zeigte jedoch auch im *in vitro*-Bindungstest einen sprunghaften Rückgang der Luciferase-Expression (Abb. 4.33). Ähnlich wie bei der Inhibition der NFκB-Aktivierung könnten auch bei der Inhibition der AP-1-Aktivierung CaN- und Cyclophilin-unabhängige Cyclosporin-Effekte eine Rolle spielen.

Der AP-1-Signalweg ist maßgeblich an der Proliferation von Zellen und damit auch am Wachstum von entarteten Zellen beteiligt (Lu et al., 2002; Kyo et al., 1997). Möglicherweise könnte die Stimulation der AP-1-Transkriptionsaktivität durch hohe CsA-Konzentrationen eine Ursache für das Auftreten von benignen und malignen Tumoren im Laufe einer immunsuppressiven Therapie sein.

Die Vertreter der drei Haupt-MAPK-Module ERK1/2, JNK und p38 spielen nicht nur in Zellen des Immunsystems eine große Rolle, sondern auch in anderen Zellen, da sie maßgeblich an inflammatorischen und proliferativen Prozessen beteiligt sind (Ip und Davis, 1998; Crawley et al., 1997; Jones et al., 2001). Da die MAP-Kinasen durch Phosphorylierung eines Thr-X-Tyr-Motives aktiviert werden, könnte CaN als Proteinphosphatase direkt oder indirekt einen Einfluß auf den Aktivierungsgrad ausüben. Es existieren zahlreiche Studien, die eine Verbindung zwischen den MAP-Kinase-Signalwegen und dem Ca<sup>2+</sup>/CaN-Signalweg herstellen (De Windt et al., 2000; Lim et al., 2001a).

Die Menge an aktivierter MAP-Kinase in humanen T-Lymphozyten wurde mit Hilfe eines phosphospezifischen Antikörpers detektiert, welcher nur die aktivierte MAP-Kinase erkennt.

Während in [AD-Ser]<sup>8</sup>CsA-behandelten Zellen eine geringe Abnahme der p-ERK1/2-Konzentration von 20 % zu detektieren war, zeigte die [Ac-MeBmt]<sup>1</sup>CsH-Applikation keine Auswirkungen auf die Aktivität des ERK1/2-Signalweges (Abb. 4.35). Die Abnahme des p-ERK1/2-Gehaltes in den Zellen durch [AD-Ser]<sup>8</sup>CsA könnte ein Cyclophilin-spezifischer Effekt sein, da er bei [Ac-MeBmt]<sup>1</sup>CsH nicht auftrat. Im Gegensatz dazu zeigten geringe Konzentrationen an CsA bzw. [DAT-Sar]<sup>3</sup>CsA eine anfänglichen Zunahme der p-ERK1/2-Menge mit nachfolgender partieller Inhibierung (Abb. 4.34). Die ERK1/2-Aktivierung könnte ein CaN-vermitteltes Ereignis sein, da sie nur bei den *in vivo* CaN-inhibierenden Substanzen CsA und [DAT-Sar]<sup>3</sup>CsA gemessen wurde. Da der ERK1/2-Signalweg über die Phosphorylierung von c-fos mit dem AP-1-Signalweg verknüpft ist, könnte die initiale Aktivierung von AP-1 auf eine ERK1/2-Aktivierung zurückgeführt werden (Kristof et al., 2001; Seternes et al., 1998; Hipskind et al., 1994). Weiterführende Studien müssen klären, ob Inhibitoren des ERK1/2-Signalweges in der Lage sind, die beobachtete AP-1-Aktivierung zu verhindern.

Die Lysate von Cyclosporin-behandelten T-Zellen wurden zusätzlich mit einem anti-p-JNK-Ab untersucht. Während CsA und [DAT-Sar]<sup>3</sup>CsA in humanen T-Zellen zu einer Abnahme der p-JNK-Menge führten (Abb. 4.36), konnte für [AD-Ser]<sup>8</sup>CsA und [Ac-MeBmt]<sup>1</sup>CsH kein Einfluß nachgewiesen werden (Abb. 4.37). Für CsA ist in der Literatur bereits eine Blockade der JNK-Aktivierung in humanen Fibroblasten beschrieben (Sugano et al., 1998). Diese Wirkung von CsA und [DAT-Sar]<sup>3</sup>CsA auf den JNK-Signalweg könnte CaN-spezifisch sein, da sie bei [AD-Ser]<sup>8</sup>CsA und [Ac-MeBmt]<sup>1</sup>CsH nicht auftrat. Ein ähnliches Ergebnis wurde erhalten, als die Zell-Lysate mit einem anti-p-p38-Ab untersucht wurden. Durch steigende Konzentrationen an CsA bzw. [DAT-Sar]<sup>3</sup>CsA nahm die Menge an p-p38 stetig ab (Abb. 4.38), während die Inkubation mit [AD-Ser]<sup>8</sup>CsA und [Ac-MeBmt]<sup>1</sup>CsH zu keinen Veränderungen führte (Abb. 4.39).

In der Literatur ist eine CsA-induzierte Inhibition des JNK- und p38-Signalweges in T-Lymphozyten von MATSUDA und KOYASU bereits erwähnt worden, die sich auch mit unseren Beobachtungen deckt (Matsuda und Koyasu, 2000). Ebenso konnten KREIDeweISS et al. in humanen PBMC eine Inhibierung des p38-Signalweges durch CsA nachweisen (Kreideweiss et al., 1999). Dabei wurde die MKK6 als Vermittler dieses inhibitorischen Effektes identifiziert. Da die MKK6 in den JNK- und in den p38-Signalweg involviert ist, könnte damit auch die simultane Inhibition des JNK-Signalweges durch CsA erklärt werden. Es ist aber auch möglich, daß die Hemmung der JNK-Aktivität über andere Glieder der Signalkette erfolgt, da MATSUDA et al. die MKK7 oder andere signalaufwärts liegende Elemente als putative Mediatoren der CsA-vermittelten Inhibition vorschlägt (Matsuda et al., 1998).

---

Vermutlich ist die hohe Effizienz der immunsuppressiven Therapie mit CsA nicht nur auf eine Inhibition des NFAT- bzw. NF $\kappa$ B-Signalweges, sondern auch auf eine Hemmung der kostimulatorischen JNK- und p38-Signalwege zurückzuführen. Demzufolge könnte der kombinierte Wirkmechanismus von CaN-inhibierenden Substanzen vorteilhafter gegenüber direkten NFAT-Inhibitoren sein (Aramburu et al., 1999a; Liu et al., 2001; Trevisan et al., 2001). Seit April dieses Jahres ist der CaN-Inhibitor FK506 in Deutschland als Protopic<sup>®</sup> zur lokalen Behandlung von atopischen Erkrankungen, wie z.B. Neurodermitis zugelassen. Die Wirksamkeit dieses Medikamentes könnte unter anderem auch auf die partielle Inhibition der proinflammatorischen JNK- und p38-Signalwege zurückzuführen sein, obwohl ein Einfluß von FK506 auf die MAPK-Signalwege bislang noch nicht detailliert untersucht wurde. Aber auch das Auftreten von Nebenwirkungen während der immunsuppressiven Therapie kann im Zusammenhang mit einer Hemmung der JNK- oder p38-Aktivität stehen. Ein Indiz dafür könnte unter anderem sein, daß durch die Verminderung der oral applizierten CsA-Menge die CsA-Konzentration im Blut auf 100 nM gesenkt und so eine Reduzierung der Nebenwirkungen erzielt werden konnte (Altaca et al., 2002).

Das [DAT-Sar]<sup>3</sup>CsA stellt ein neues CsA-Derivat dar, welches ohne die Mitwirkung eines *Matchmaker*-Proteins die Phosphatase-Aktivität von CaN inhibieren kann. Leider wird durch diese Substanz auch die PPlase-Aktivität von Cyclophilin gehemmt, so daß *in vivo* noch immer keine klare Abgrenzung von CaN- und Cyclophilin-Effekten möglich ist. Zukünftige Arbeiten müssen klären, ob durch Modifizierung der [DAT-Sar]<sup>3</sup>CsA-Struktur neue Derivate geschaffen werden können, die gezielt nur die Proteinphosphatase CaN inhibieren können. Neben der großen klinischen Relevanz einer solchen Substanz existiert auch auf der Seite der Grundlagenforschung ein großes Interesse. Mit dieser Substanz wäre es möglich, die Involvierung von CaN in das komplizierte Signal-Netzwerk der Zelle schrittweise aufzuklären.

## 6 Zusammenfassung

- Das polyphenolische Aldehyd Gossypol wurde in einem Phosphatase-Assay als reversibler und nicht-kompetitiver CaN-Inhibitor identifiziert.
- Mit RII-Phosphopeptid als Substrat wurde für die CaN-Inhibition durch Gossypol ein  $IC_{50}$ -Wert von 17  $\mu$ M ermittelt. Das Gossypol-Derivat Gossypolon inhibiert die CaN-Aktivität mit einem  $IC_{50}$ -Wert von 9  $\mu$ M, während das strukturähnliche Apogossypol hexaazetat keinen Einfluß auf die Phosphatase-Aktivität zeigte.
- Mit pNPP als Substrat wurde für die CaN-Inhibition durch Gossypol ein  $IC_{50}$ -Wert von 14  $\mu$ M ermittelt. Das Gossypol-Derivat Gossypolon inhibiert die CaN-Aktivität mit einem  $IC_{50}$ -Wert von 6  $\mu$ M, während das strukturähnliche Apogossypol hexaazetat auch in diesem Phosphatase-Assay keinen Einfluß auf die Phosphatase-Aktivität zeigte.
- Zusätze von Calmodulin, DTT oder Ammoniumeisen(II)-sulfat konnten die Inhibition des CaN durch Gossypol nicht beeinflussen, was einen Inhibitionsmechanismus über Calmodulin oder redoxsensitive Elemente ausschließt.
- Gossypol bindet am CaN vermutlich an oder in der Nähe der Bindungsstelle für den CsA/Cyclophilin-Komplex, wie sowohl enzymkinetische Messungen als auch Konkurrenzexperimente belegen.
- Gossypol inhibiert spezifisch CaN, während die Phosphatasen PP1, PP2A bzw. PP2C und die PPlasen hCyp18, hFKBP12 bzw. hParv18 nur geringfügig beeinflusst werden.
- Gossypol ist in der Lage, in aktivierten T-Zellen die Translokation von NFAT in den Zellkern in einer konzentrationsabhängigen Weise zu verhindern.
- Gossypol konnte in einer konzentrationsabhängigen Weise die NFAT-vermittelte Expression des Reportergens Luciferase und die Affinität des NFAT zu einem Fragment des IL-2-Promotors vermindern.

\*\*

- CsA, [DAT-Sar]<sup>3</sup>CsA und [AD-Ser]<sup>8</sup>CsA hemmen die PPlase-Aktivität von Cyp18, während [Ac-MeBmt]<sup>1</sup>CsH inaktiv ist.
- Im Phosphatase-Assay mit RII-Phosphopeptid als Substrat können [AD-Ser]<sup>8</sup>CsA und [Ac-MeBmt]<sup>1</sup>CsH die CaN-Aktivität weder allein noch in Anwesenheit von Cyclophilin inhibieren. Im Gegensatz dazu kann CsA nur im Komplex mit Cyp18 und [DAT-Sar]<sup>3</sup>CsA nur unkomplexiert die CaN-Aktivität mit  $IC_{50}$ -Werten von 100 nM bzw. 1  $\mu$ M hemmen.
- Im Phosphatase-Assay mit pNPP als Substrat können CsA, [DAT-Sar]<sup>3</sup>CsA, [AD-Ser]<sup>8</sup>CsA und [Ac-MeBmt]<sup>1</sup>CsH die CaN-Aktivität weder allein noch in Anwesenheit von Cyp18 inhibieren.

- [DAT-Sar]<sup>3</sup>CsA kann als einziges bisher bekanntes Cyclosporin die CaN-Aktivität ohne Cyclophilin-Zusatz hemmen, wenn Phosphopeptide und Phosphoproteine als Substrate verwendet werden. [DAT-Sar]<sup>3</sup>CsA ist ein reversibler nicht-kompetitiver CaN-Inhibitor, für den ein K<sub>i</sub>-Wert von 1.1 μM bestimmt wurde.
- [DAT-Sar]<sup>3</sup>CsA inhibiert spezifisch CaN, ohne die Phosphatasen PP1, PP2A und PP2C zu beeinflussen. [DAT-Sar]<sup>3</sup>CsA bindet am CaN wahrscheinlich an oder in der Nähe der Bindungsstelle des FK506/FKBP12-Komplexes.
- In einem NFAT-Reporter-Gen-Assay konnten nur CsA und [DAT-Sar]<sup>3</sup>CsA die Expression der Luciferase in stimulierten T-Lymphozyten vermindern. Die Bindung von NFAT an ein Fragment des humanen IL-2-Promotors wurde auch nur von CsA und [DAT-Sar]<sup>3</sup>CsA in einer konzentrationsabhängigen Weise beeinflusst.
- In einem NFκB-Reporter-Gen-Assay konnte für CsA eine stärkere Inhibition der Transkriptionsaktivität nachgewiesen werden als für [DAT-Sar]<sup>3</sup>CsA. [AD-Ser]<sup>8</sup>CsA und [Ac-MeBmt]<sup>1</sup>CsH zeigten aber auch eine Senkung der NFκB-Transkriptionsaktivität, was auf einen unspezifischen Cyclosporin-Effekt hindeuten könnte.
- In einem AP-1-Reporter-Gen-Assay zeigten CsA und [DAT-Sar]<sup>3</sup>CsA bei einer Konzentration von 10 nM eine zusätzliche Aktivierung der AP-1-vermittelten Transkription, die auf eine Aktivierung der ERK1/2 zurückgeführt werden könnte.
- CsA und [DAT-Sar]<sup>3</sup>CsA führen bei einer Konzentration von 10 nM zu einer zusätzlichen Aktivierung des ERK1/2-Signalweges in stimulierten T-Lymphozyten.
- CsA und [DAT-Sar]<sup>3</sup>CsA inhibieren sowohl die Aktivierung der MAP-Kinase JNK als auch die der MAP-Kinase p38 in einer konzentrationsabhängigen Weise, während [AD-Ser]<sup>8</sup>CsA und [Ac-MeBmt]<sup>1</sup>CsH keinen Einfluß zeigten.

\*\*\*\*\*

## 7 Anhang

### Literatur

**Abe MK, Kuo WL, Hershenson MB und Rosner MR** (1999) Extracellular signal-regulated kinase 7 (ERK7), a novel ERK with a C-terminal domain that regulates its activity, its cellular localization, and cell growth. *Molecular & Cellular Biology* **19**, 1301-1312.

**Abe MK, Saelzler MP, Espinosa R, Kahle KT, Hershenson MB, Le Beau MM und Rosner MR** (2002) ERK-8, a new member of the mitogen-activated protein kinase family. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 16733-16743.

**Adi S, Bin-Abbas B, Wu NY und Rosenthal SM** (2002) Early stimulation and late inhibition of extracellular signal-regulated kinase 1/2 phosphorylation by IGF-I: a potential mechanism mediating the switch in IGF-I action on skeletal muscle cell differentiation. *Endocrinology* **143**, 511-6.

**Adlakha RC, Ashorn CL, Chan D und Zwelling LA** (1989) Modulation of 4'-(9-acridinylamino)methanesulfon-m-anisidide-induced, topoisomerase II-mediated DNA cleavage by gossypol [published erratum appears in *Cancer Res* 1989 Jun 1;49(11):3142]. *Cancer Research* **49**, 2052-8.

**Adler V, Schaffer A, Kim J, Dolan L und Ronai Z** (1995) UV irradiation and heat shock mediate JNK activation via alternate pathways. *Journal of Biological Chemistry* **270**, 26071-7.

**Adu D, Turney J, Michael J und McMaster P** (1983) Hyperkalaemia in cyclosporin-treated renal allograft recipients. *Lancet* **2**, 370-2.

**Ahlers C, Kreideweiss S, Nordheim A und Ruhlmann A** (1999) Cyclosporin A inhibits Ca<sup>2+</sup>-mediated upregulation of the DNA repair enzyme DNA polymerase beta in human peripheral blood mononuclear cells. *European Journal of Biochemistry* **264**, 952-9.

**Aitken A, Klee CB und Cohen P** (1984) The structure of the B subunit of CaN. *European Journal of Biochemistry* **139**, 663-71.

**Alcazar A, Rivera J, Gomezalcerrada M, Munoz F, Salinas M und Fando JL** (1996) Changes in the Phosphorylation of Eukaryotic Initiation Factor 2-Alpha, Initiation Factor 2b Activity and Translational Rates in Primary Neuronal Cultures under Different Physiological Growing Conditions. *Molecular Brain Research* **38**, 101-108.

**Aldape RA, Futer O, DeCenzo MT, Jarrett BP, Murcko MA und Livingston DJ** (1992) Charged surface residues of FKBP12 participate in formation of the FKBP12-FK506-CaN complex. *Journal of Biological Chemistry* **267**, 16029-32.

**Alessi DR, Saito Y, Campbell DG, Cohen P, Sithanandam G, Rapp U, Ashworth A, Marshall CJ und Cowley S** (1994) Identification of the sites in MAP kinase kinase-1 phosphorylated by p74raf-1. *EMBO Journal* **13**, 1610-9.

**Alexander DR, Hexham JM und Crumpton MJ** (1988) The association of type 1, type 2A and type 2B phosphatases with the human T lymphocyte plasma membrane. *Biochemical Journal* **256**, 885-92.

**Allain F, Denys A und Spik G** (1996) Cyclophilin B mediates cyclosporin A incorporation in human blood T-Lymphocytes through the specific binding of complexed drug to the cell surface. *Biochemical Journal* **317**, 565-570.

**Altaca G, Berber I, Aydin C und Titiz I** (2002) Effect of low-dose CaN inhibitors on acute rejection and graft survival. *Transplantation Proceedings* **34**, 2079-2080.

**Amsellem C, Haftek M, Kanitakis J und Thivolet J** (1992) Effect of cyclosporins A, G, and H on normal and ichthyotic keratinocyte growth in culture. *Archives of Dermatological Research* **284**, 173-8.

**Anderson C und Groth O** (1985) Suppression of the allergic contact reaction in the guinea pig by cyclosporin A. *International Archives of Allergy & Applied Immunology* **78**, 396-400.

**anonymous** (1994) Randomised trial comparing tacrolimus (FK506) and cyclosporin in prevention of liver allograft rejection. European FK506 Multicentre Liver Study Group [see comments]. *Lancet* **344**, 423-8.

**Antoni FA, Barnard RJ, Shipston MJ, Smith SM, Simpson J und Paterson JM** (1995) CaN feedback inhibition of agonist-evoked cAMP formation. *Journal of Biological Chemistry* **270**, 28055-61.

**Antoni FA, Smith SM, Simpson J, Rosie R, Fink G und Paterson JM** (1998) Calcium control of adenylyl cyclase: the CaN connection. *Advances in Second Messenger & Phosphoprotein Research* **32**, 153-72.

**Antoniw JF und Cohen P** (1976) Separation of two phosphorylase kinase phosphatases from rabbit skeletal muscle. *European Journal of Biochemistry* **68**, 45-54.

**Aramburu J, Yaffe MB, Lopez-Rodriguez C, Cantley LC, Hogan PG und Rao A** (1999) Affinity-driven peptide selection of an NFAT inhibitor more selective than cyclosporin A. *Science* **285**, 2129-33.

**Arditi M, Zhou J, Torres M, Durden DL, Stins M und Kim KS** (1995) Lipopolysaccharide stimulates the tyrosine phosphorylation of mitogen-activated protein kinases p44, p42, and p41 in vascular endothelial cells in a soluble CD14-dependent manner. Role of protein tyrosine phosphorylation in lipopolysaccharide-induced stimulation of endothelial cells. *Journal of Immunology* **155**, 3994-4003.

**Asai A, Qiu J, Narita Y, Chi S, Saito N, Shinoura N, Hamada H, Kuchino Y und Kirino T** (1999) High level CaN activity predisposes neuronal cells to apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* **274**, 34450-8.

**Atherfold PA, Norris MS, Robinson PJ, Gelfand EW und Franklin RA** (1999) Calcium-induced ERK activation in human T lymphocytes. *Molecular Immunology* **36**, 543-9.

**Avraham A, Jung S, Samuels Y, Seger R und Ben-Neriah Y** (1998) Co-stimulation-dependent activation of a JNK-kinase in T lymphocytes. *European Journal of Immunology* **28**, 2320-30.

**Badger AM, Bradbeer JN, Votta B, Lee JC, Adams JL und Griswold DE** (1996) Pharmacological profile of SB 203580, a selective inhibitor of cytokine suppressive binding protein/p38 kinase, in animal models of arthritis, bone resorption, endotoxin shock and immune function. *Journal of Pharmacology & Experimental Therapeutics* **279**, 1453-61.

**Baeuerle PA und Baltimore D** (1989) A 65-Kd subunit of active Nf-Kappa-B is required for inhibition of Nf-Kappa-B by I-Kappa-B. *Genes & Development* **3**, 1689-1698.

**Band V, Hoffer AP, Band H, Rhinehardt AE, Knapp RC, Matlin SA und Anderson DJ** (1989) Antiproliferative effect of gossypol and its optical isomers on human reproductive cancer cell lines. *Gynecologic Oncology* **32**, 273-7.

**Barford D** (1996) Molecular mechanisms of the protein serine/threonine phosphatases. *Trends in Biochemical Sciences* **21**, 407-12.

**Barford D** (1999) Structural studies of reversible protein phosphorylation and protein phosphatases. *Biochemical Society Transactions* **27**, 751-766.

**Batiuk TD, Kung L und Halloran PF** (1997) Evidence that CaN is rate-limiting for primary human lymphocyte activation. *Journal of Clinical Investigation* **100**, 1894-901.

**Baughman G, Wiederrecht GJ, Campbell NF, Martin MM und Bourgeois S** (1995) FKBP51, a novel T-cell-specific immunophilin capable of CaN inhibition. *Molecular & Cellular Biology* **15**, 4395-402.

**Baughman G, Wiederrecht GJ, Chang F, Martin MM und Bourgeois S** (1997) Tissue distribution and abundance of human FKBP51, and FK506-binding protein that can mediate CaN inhibition. *Biochemical & Biophysical Research Communications* **232**, 437-43.

**Baukal AJ, Hunyady L, Catt KJ und Balla T** (1994) Evidence for participation of CaN in potentiation of agonist-stimulated cyclic AMP formation by the calcium-mobilizing hormone, angiotensin II. *Journal of Biological Chemistry* **269**, 24546-9.

**Beg AA, Ruben SM, Scheinman RI, Haskill S, Rosen CA und Baldwin AS, Jr.** (1992) I kappa B interacts with the nuclear localization sequences of the subunits of NF-kappa B: a mechanism for cytoplasmic retention. [erratum appears in *Genes Dev* 1992 Dec;6(12B):2664-5.]. *Genes & Development* **6**, 1899-913.

**Bell A, Roberts HC und Chappell LH** (1996) The antiparasite effects of cyclosporin A: possible drug targets and clinical applications. *General Pharmacology* **27**, 963-71.

**Ben-Levy R, Hooper S, Wilson R, Paterson HF und Marshall CJ** (1998) Nuclear export of the stress-activated protein kinase p38 mediated by its substrate MAPKAP kinase-2. *Current Biology* **8**, 1049-57.

**Bennett PC, Zhao W, Lawen A und Ng KT** (1996) Cyclosporin A, an inhibitor of CaN, impairs memory formation in day-old chicks. *Brain Research* **730**, 107-17.

**Berg KJ, Forre O, Bjerkhoel F, Amundsen E, Djoseland O, Rugstad HE und Westre B** (1986) Side effects of cyclosporin A treatment in patients with rheumatoid arthritis. *Kidney International* **29**, 1180-7.

**Bernal-Mizrachi E, Wen W, Srinivasan S, Klenk A, Cohen D und Permutt MA** (2001) Activation of Elk-1, an Ets transcription factor, by glucose and EGF treatment of insulinoma cells. *American Journal of Physiology - Endocrinology & Metabolism* **281**, E1286-99.

**Berridge MJ** (1998) Neuronal calcium signaling. *Neuron* **21**, 13-26.

**Berridge MJ, Lipp P und Bootman MD** (2000) The versatility and universality of calcium signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **1**, 11-21.

**Bigard X, Sanchez H, Zoll J, Mateo P, Rousseau V, Veksler V und Ventura-Clapier R** (2000) CaN co-regulates contractile and metabolic components of slow muscle phenotype. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 19653-19660.

**Birnboim HC und Doly J** (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research* **7**, 1513-23.

**Bisotto S, Minorgan S und Rehfuss RP** (1996) Identification and characterization of a novel transcriptional activation domain in the Creb-binding protein. *Journal of Biological Chemistry* **271**, 17746-17750.

**Bito H, Deisseroth K und Tsien RW** (1996) CREB phosphorylation and dephosphorylation: a Ca(2+)- and stimulus duration-dependent switch for hippocampal gene expression. *Cell* **87**, 1203-14.

**Black AR, Jensen D, Lin SY und Azizkhan JC** (1999) Growth/cell cycle regulation of Sp1 phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry* **274**, 1207-1215.



**Blackstaffe L, Shelley MD und Fish RG** (1997) Cytotoxicity of gossypol enantiomers and its quinone metabolite gossypolone in melanoma cell lines. *Melanoma Research* **7**, 364-72.

**Bogumil R, Namgaladze D, Schaarschmidt D, Schmachtel T, Hellstern S, Mutzel R und Ullrich V** (2000) Inactivation of CaN by hydrogen peroxide and phenylarsine oxide. Evidence for a dithiol-disulfide equilibrium and implications for redox regulation. *European Journal of Biochemistry* **267**, 1407-15.

**Bolton C, Borel JF, Cuzner ML, Davison AN und Turner AM** (1982) Immunosuppression by cyclosporin A of experimental allergic encephalomyelitis. *Journal of the Neurological Sciences* **56**, 147-53.

**Bonnefoy-Berard N, Genestier L, Flacher M und Revillard JP** (1994) The phosphoprotein phosphatase CaN controls calcium-dependent apoptosis in B cell lines. *European Journal of Immunology* **24**, 325-9.

**Borel JF, Feurer C, Gubler HU und Stahelin H** (1976) Biological effects of cyclosporin A: A new antilymphocytic Agent. *Agents & Actions* **6**, 468-75.

**Boulton TG und Cobb MH** (1991) Identification of multiple extracellular signal-regulated kinases (ERKs) with antipeptide antibodies. *Cell Regulation* **2**, 357-71.

**Brabletz T, Pietrowski I und Serfling E** (1991) The immunosuppressives FK-506 and cyclosporin-A inhibit the generation of protein factors binding to the 2 purine boxes of the interleukin-2 enhancer. *Nucleic Acids Research* **19**, 61-67.

**Bradford MM.** (1976) *Analytical Biochemistry* **12**, 248-254.

**Bram RJ, Hung DT, Martin PK, Schreiber SL und Crabtree GR** (1993) Identification of the immunophilins capable of mediating inhibition of signal transduction by cyclosporin A and FK506: roles of CaN binding and cellular location. *Molecular & Cellular Biology* **13**, 4760-9.

**Brazin KN, Mallis RJ, Fulton DB und Andreotti AH** (2002) Regulation of the tyrosine kinase Itk by the peptidyl-prolyl isomerase cyclophilin A. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 1899-1904.

**Breslin MB und Vedeckis WV** (1996) The glucocorticoid receptor and c-jun promoters contain AP-1 sites that bind different AP-1 transcription factors. *Endocrine* **5**, 15-22.

**Brill GM, Premachandran U, Karwowski JP, Henry R, Cwik DK, Traphagen LM, Humphrey PE, Jackson M, Clement JJ und Burrens NS** (1996) Dibefurin, a novel fungal metabolite inhibiting CaN phosphatase activity. *Journal of Antibiotics* **49**, 124-128.

**Bueno OF, van Rooij E, Molkentin JD, Doevendans PA und De Windt LJ** (2002) CaN and hypertrophic heart disease: novel insights and remaining questions. *Cardiovascular Research* **53**, 806-821.

**Bull P, Morley KL, Hoekstra MF, Hunter T und Verma IM** (1990) The mouse c-rel protein has an N-terminal regulatory domain and a C-terminal transcriptional transactivation domain. *Molecular & Cellular Biology* **10**, 5473-85.

**Bushel P, Kim JH, Chang W, Catino JJ, Ruley HE und Kumar CC** (1995) Two serum response elements mediate transcriptional repression of human smooth muscle alpha-Actin promoter in ras-transformed cells. *Oncogene* **10**, 1361-1370.

**Buttini M, Limonta S, Luyten M und Boddeke H** (1995) Distribution of CaN A isoenzyme mRNAs in rat thymus and kidney. *Histochemical Journal* **27**, 291-9.

**Caccavo D, Lagana B, Mitterhofer AP, Ferri GM, Afeltra A, Amoroso A und Bonomo L** (1997) Long-term treatment of systemic lupus erythematosus with cyclosporin A. *Arthritis & Rheumatism* **40**, 27-35.

**Calne RY, Rolles K, White DJ, Thiru S, Evans DB, McMaster P, Dunn DC, Craddock GN, Henderson RG und Aziz S** (1979) Cyclosporin A initially as the only immunosuppressant in 34 recipients of cadaveric organs: 32 kidneys, 2 pancreases, and 2 livers. *Lancet* **2**, 1033-6.

**Cameron, AM, Steiner, JP, Sabatini, DM, Kaplin, AI und Walensky LD** (1995a) Immunophilin FK506 binding protein associated with inositol 1, 4,5-trisphosphate receptor modulates calcium flux. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**, 1784-1788.

**Cameron AM, Steiner JP, Roskams AJ, Ali SM, Ronnett GV und Snyder SH** (1995b) CaN associated with the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-FKBP12 complex modulates Ca<sup>2+</sup> flux. *Cell* **83**, 463-72.

**Campbell PM, Pimm J, Ramassar V und Halloran PF** (1996) Identification of a calcium-inducible, cyclosporine sensitive element in the IFN-gamma promoter that is a potential NFAT binding site. *Transplantation* **61**, 933-9.

**Canagarajah BJ, Khokhlatchev A, Cobb MH und Goldsmith EJ** (1997) Activation mechanism of the MAP kinase Erk2 by dual phosphorylation. *Cell* **90**, 859-869.

**Casas C, Martinez S, Pritchard MA, Fuentes JJ, Nadal M, Guimera J, Arbones M, Florez J, Soriano E und Estivill X** (2001) Dscr1, a novel endogenous inhibitor of CaN signaling, is expressed in the primitive ventricle of the heart and during neurogenesis. *Mechanisms of Development* **101**, 289-92.

**Castigli E, Chatila TA und Geha RS** (1993) A protein of the AP-1 family is a component of nuclear factor of activated T cells. *Journal of Immunology* **150**, 3284-90.

**Chan CP, Gallis B, Blumenthal DK, Pallen CJ, Wang JH und Krebs EG** (1986) Characterization of the phosphotyrosyl protein phosphatase activity of calmodulin-dependent protein phosphatase. *Journal of Biological Chemistry* **261**, 9890-5.

**Chatani Y, Tanaka E, Tobe K, Hattori A, Sato M, Tamemoto H, Nishizawa N, Nomoto H, Takeya T und Kadowaki T** (1992) Mitogen-induced tyrosine-phosphorylated 41- and 43-kDa proteins are family members of extracellular signal-regulated kinases/microtubule-associated protein 2 kinases. *Journal of Biological Chemistry* **267**, 9911-6.

**Chatterjee TK, Eapen AK und Fisher RA** (1997) A truncated form of RGS3 negatively regulates G protein-coupled receptor stimulation of adenylyl cyclase and phosphoinositide phospholipase C. *Journal of Biological Chemistry* **272**, 15481-7.

**Chen CY, Forman LW und Faller DV** (1996a) Calcium-dependent immediate-early gene induction in lymphocytes is negatively regulated by p21Ha-ras. *Molecular & Cellular Biology* **16**, 6582-92.

**Chen L, Rao A und Harrison SC** (1999) Signal integration by transcription-factor assemblies: interactions of NF-AT1 and AP-1 on the IL-2 promoter. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* **64**, 527-31.

**Chen RH, Juo PCH, Curran T und Blenis J** (1996b) Phosphorylation of c-fos at the C-terminus enhances its transforming activity. *Oncogene* **12**, 1493-1502.

**Cheng JK, Yang JH, Xia Y, Karin M und Su B** (2000) Synergistic interaction of MEK kinase 2, c-Jun N-terminal kinase (JNK) kinase 2, and JNK1 results in efficient and specific JNK1 activation. *Molecular & Cellular Biology* **20**, 2334-2342.

**Cheung WY, Lynch TJ, Wallace RW und Tallant EA** (1981) cAMP renders Ca<sup>2+</sup>-dependent phosphodiesterase refractory to inhibition by a calmodulin-binding protein (CaN). *Journal of Biological Chemistry* **256**, 4439-43.

**Chinkers M** (2001) Protein phosphatase 5 in signal transduction. *Trends in Endocrinology & Metabolism* **12**, 28-32.

**Choe ES und McGinty JF** (2000) N-Methyl-D-aspartate receptors and p38 mitogen-activated protein kinase are required for cAMP-dependent cyclase response element binding protein and Elk-1 phosphorylation in the striatum. *Neuroscience* **101**, 607-17.

**Chow CW, Dong C, Flavell RA und Davis RJ** (2000) c-Jun NH(2)-terminal kinase inhibits targeting of the protein phosphatase CaN to NFATc1. *Molecular & Cellular Biology* **20**, 5227-34.

**Chow CW, Rincon M, Cavanagh J, Dickens M und Davis RJ** (1997a) Nuclear accumulation of NFAT4 opposed by the JNK signal transduction pathway. *Science* **278**, 1638-1641.

**Clerk A, Harrison JG, Long CS und Sugden PH** (1999) Pro-inflammatory cytokines stimulate mitogen-activated protein kinase subfamilies, increase phosphorylation of c-Jun and ATF2 and upregulate c-Jun protein in neonatal rat ventricular myocytes. *Journal of Molecular & Cellular Cardiology* **31**, 2087-2099.

**Clipstone NA und Crabtree GR** (1992) Identification of CaN as a key signalling enzyme in T-lymphocyte activation. *Nature* **357**, 695-7.

**Clipstone NA und Crabtree GR** (1993) CaN is a key signaling enzyme in T lymphocyte activation and the target of the immunosuppressive drugs cyclosporin A and FK506. *Annals of the New York Academy of Sciences* **696**, 20-30.

**Coghlan VM, Perrino BA, Howard M, Langeberg LK, Hicks JB, Gallatin WM und Scott JD** (1995) Association of protein kinase A and protein phosphatase 2B with a common anchoring protein. *Science* **267**, 108-111.

**Cohen P** (1989) The structure and regulation of protein phosphatases. *Annual Review of Biochemistry* **58**, 453-508.

**Collins JH** (1991) Sequence analysis of the ryanodine receptor: possible association with a 12K, FK506-binding immunophilin/protein kinase C inhibitor. *Biochemical Biophysical Research Communication* **178**, 1288-1290.

**Coyle T, Levante S, Shetler M und Winfield J** (1994) In vitro and in vivo cytotoxicity of gossypol against central nervous system tumor cell lines. *Journal of Neuro-Oncology* **19**, 25-35.

**Crabtree GR und Olson EN** (2002) NFAT signaling: Choreographing the social lives of cells [Review]. *Cell* **109**, S67-S79.

**Crawley JB, Rawlinson L, Lali FV, Page TH, Saklatvala J und Foxwell BM** (1997) T cell proliferation in response to interleukins 2 and 7 requires p38MAP kinase activation. *Journal of Biological Chemistry* **272**, 15023-7.

**Crews CM, Alessandrini A und Erikson RL** (1992) The primary structure of MEK, a protein kinase that phosphorylates the ERK gene product. *Science* **258**, 478-80.

**Csonga R, Prieschl EE, Jaksche D, Novotny V und Baumruker T** (1998) Common and distinct signaling pathways mediate the induction of TNF-alpha and IL-5 in IgE plus antigen-stimulated mast cells. *Journal of Immunology* **160**, 273-83.

- Dahmus ME** (1996) Reversible phosphorylation of the C-terminal domain of RNA polymerase II. *Journal of Biological Chemistry* **271**, 19009-19012.
- Darpa P und Liu LF** (1995) Cell cycle-specific and transcription-related phosphorylation of mammalian topoisomerase I. *Experimental Cell Research* **217**, 125-131.
- Davis MJ, Wu X, Nurkiewicz TR, Kawasaki J, Gui PC, Hill MA und Wilson E** (2001) Regulation of ion channels by protein tyrosine phosphorylation. *American Journal of Physiology - Heart & Circulatory Physiology* **281**, H1835-H1862.
- Dawson TM, Steiner JP, Dawson VL, Dinerman JL, Uhl GR und Snyder SH** (1993) Immunosuppressant FK506 enhances phosphorylation of nitric oxide synthase and protects against glutamate neurotoxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**, 9808-12.
- de la Pompa JL, Timmerman LA, Takimoto H, Yoshida H, Elia AJ, Samper E, Potter J, Wakeham A, Marengere L und Langille BL** (1998) Role of the NF-ATc transcription factor in morphogenesis of cardiac valves and septum. *Nature* **392**, 182-6.
- de Paulis A, Ciccarelli A, de Crescenzo G, Cirillo R, Patella V und Marone G** (1996) Cyclosporin H is a potent and selective competitive antagonist of human basophil activation by N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine. *Journal of Allergy & Clinical Immunology* **98**, 152-64.
- de Prost Y, Bodemer C und Teillac D** (1989) Randomised double-blind placebo-controlled trial of local cyclosporin in atopic dermatitis. *Acta Dermato-Venereologica. Supplementum* **144**, 136-8.
- De Windt LJ, Lim HW, Haq S, Force T und Molkentin JD** (2000) CaN promotes protein kinase C and c-Jun NH2-terminal kinase activation in the heart. Cross-talk between cardiac hypertrophic signaling pathways. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 13571-9.
- Dean DJ und Cartee GD** (2000) Calorie restriction increases insulin-stimulated tyrosine phosphorylation of insulin receptor and insulin receptor substrate-1 in rat skeletal muscle. *Acta Physiologica Scandinavica* **169**, 133-139.
- Decker EL, Skerka C und Zipfel PF** (1998) The early growth response protein (EGR-1) regulates interleukin-2 transcription by synergistic interaction with the nuclear factor of activated T cells. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 26923-30.
- Delling U, Tureckova J, Lim HW, De Windt LJ, Rotwein P und Molkentin JD** (2000) A CaN-NFATc3-dependent pathway regulates skeletal muscle differentiation and slow myosin heavy-chain expression. *Molecular & Cellular Biology* **20**, 6600-11.
- Demeule M, Laplante A, Murphy GF, Wenger RM und Beliveau R** (1998) Identification of the cyclosporin-binding site in P-glycoprotein. *Biochemistry* **37**, 18110-8.
- Derijard B, Hibi M, Wu IH, Barrett T, Su B, Deng T, Karin M und Davis RJ** (1994) JNK1: a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain. *Cell* **76**, 1025-37.
- Ding B, Price RL, Borg TK, Weinberg EO, Halloran PF und Lorell BH** (1999) Pressure overload induces severe hypertrophy in mice treated with cyclosporine, an inhibitor of CaN. *Circulation Research* **84**, 729-34.
- Dolmetsch RE, Lewis RS, Goodnow CC und Healy JI** (1997) Differential activation of transcription factors induced by Ca<sup>2+</sup> response amplitude and duration. *Nature* **386**, 855-8.
- Donella-Deana A, Krinks MH, Ruzzene M, Klee C und Pinna LA** (1994) Dephosphorylation of phosphopeptides by CaN (protein phosphatase 2B). *European Journal of Biochemistry* **219**, 109-17.

**Douville E und Downward J** (1997) EGF induced SOS phosphorylation in PC12 cells involves P90 RSK-2. *Oncogene* **15**, 373-383.

**du Toit DF und Heydenrych JJ** (1986) The application, mechanism of action and side-effects of immunosuppressive agents in clinical transplantation. *South African Medical Journal* **70**, 687-91.

**Duckett CS, Perkins ND, Kowalik TF, Schmid RM, Huang ES, Baldwin AS, Jr. und Nabel GJ** (1993) Dimerization of NF- $\kappa$ B2 with RelA(p65) regulates DNA binding, transcriptional activation, and inhibition by an I kappa B-alpha (MAD-3). *Molecular & Cellular Biology* **13**, 1315-22.

**Dunn SE, Burns JL und Michel RN** (1999) CaN is required for skeletal muscle hypertrophy. *Journal of Biological Chemistry* **274**, 21908-12.

**Edlund T, Walker MD, Barr PJ und Rutter WJ** (1985) Cell-specific expression of the rat insulin gene: evidence for role of two distinct 5' flanking elements. *Science* **230**, 912-6.

**Ellingerziegelbauer H, Brown K, Kelly K und Siebenlist U** (1997) Direct Activation of the Stress-Activated Protein Kinase (Sapk) and Extracellular Signal-Regulated Protein Kinase (Erk) Pathways by an Inducible Mitogen-Activated Protein Kinase/Erk Kinase Kinase 3 (MEKK) Derivative. *Journal of Biological Chemistry* **272**, 2668-2674.

**Enslin H, Raingeaud J und Davis RJ** (1998) Selective activation of p38 mitogen-activated protein (MAP) kinase isoforms by the MAP kinase kinases MKK3 and MKK6. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 1741-8.

**Enz A, Shapiro G, Chappuis A und Dattler A** (1994) Nonradioactive assay for protein phosphatase 2B (CaN) activity using a partial sequence of the subunit of cAMP-dependent protein kinase as substrate. *Analytical Biochemistry* **216**, 147-53.

**Enz A, Zenke G und Pombovillar E** (1997) 7-Oxa[2.2.1]Bicycloheptane-2,3-Dicarboxylic Acid Derivatives as Phosphatase Inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **7**, 2513-2518.

**Errede B, Cade RM, Yashar BM, Kamada Y, Levin DE, Irie K und Matsumoto K** (1995) Dynamics and Organization of Map Kinase Signal Pathways. *Molecular Reproduction and Development* **42**, 477-485.

**Eto Y, Yonekura K, Sonoda M, Arai N, Sata M, Sugiura S, Takenaka K, Gualberto A, Hixon ML und Wagner MW** (2000) CaN is activated in rat hearts with physiological left ventricular hypertrophy induced by voluntary exercise training. *Circulation* **101**, 2134-7.

**Etzkorn FA, Chang ZY, Stolz LA und Walsh CT** (1994) Cyclophilin residues that affect noncompetitive inhibition of the protein serine phosphatase activity of CaN by the cyclophilin.cyclosporin A complex. *Biochemistry* **33**, 2380-8.

**Eyster KM** (1998) Introduction to signal transduction - a primer for untangling the web of intracellular messengers. *Biochemical Pharmacology* **55**, 1927-1938.

**Felipo V, Hermenegildo C, Montoliu C, Llansola M und Minana MD** (1998) Neurotoxicity of ammonia and glutamate: molecular mechanisms and prevention. *Neurotoxicology* **19**, 675-81.

**Ferreira A, Kincaid R und Kosik KS** (1993) CaN is associated with the cytoskeleton of cultured neurons and has a role in the acquisition of polarity. *Molecular Biology of the Cell* **4**, 1225-38.

**Feske S, Giltnane J, Dolmetsch R, Staudt LM und Rao A** (2001) Gene regulation mediated by calcium signals in T lymphocytes. *Nature Immunology* **2**, 316-324.

**Fischer G und Bang H** (1985) The refolding of urea-denatured ribonuclease A is catalyzed by peptidyl-prolyl cis-trans isomerase. *Biochimica et Biophysica Acta* **828**, 39-42.

**Fischer G, Bang H, Berger E und Schellenberger A** (1984a) Conformational specificity of chymotrypsin toward proline-containing substrates. *Biochimica et Biophysica Acta* **791**, 87-97.

**Fischer G, Bang H und Mech C** (1984b) Determination of enzymatic catalysis for the *cis-trans*-isomerization of peptide bonds in proline-containing peptides. *Biomedica et Biochimica Acta* **43**, 1101-1111.

**Fischer G, Wittmann-Liebold B, Lang K, Kiefhaber T und Schmid FX** (1989) Cyclophilin and peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase are probably identical proteins. *Nature* **337**, 476-8.

**Flack MR, Pyle RG, Mullen NM, Lorenzo B, Wu YW, Knazek RA, Nisula BC und Reidenberg MM** (1993) Oral gossypol in the treatment of metastatic adrenal cancer. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **76**, 1019-24.

**Frick J und Aulitzky W** (1988) Male contraception. *Human Reproduction* **3**, 147-51.

**Frick J, Aulitzky W und Kalla NR** (1988) Clinical microdose study of gossypol: effect on sperm motility and renal function. *Contraception* **37**, 153-62.

**Friday BB, Horsley V und Pavlath GK** (2000) CaN activity is required for the initiation of skeletal muscle differentiation. *Journal of Cell Biology* **149**, 657-66.

**Frost JA, Steen H, Shapiro P, Lewis T, Ahn N, Shaw PE und Cobb MH** (1997) Cross-cascade activation of ERKs and ternary complex factors by Rho family proteins. *EMBO Journal* **16**, 6426-38.

**Fruman DA, Bierer BE, Benes JE, Burakoff SJ, Austen KF und Katz HR** (1995) The complex of FK506-binding protein 12 and FK506 inhibits CaN phosphatase activity and IgE activation-induced cytokine transcripts, but not exocytosis, in mouse mast cells. *Journal of Immunology* **154**, 1846-51.

**Fruman DA, Klee CB, Bierer BE und Burakoff SJ** (1992a) CaN phosphatase activity in T lymphocytes is inhibited by FK 506 and cyclosporin A. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**, 3686-90.

**Fruman DA, Mather PE, Burakoff SJ und Bierer BE** (1992b) Correlation of CaN phosphatase activity and programmed cell death in murine T cell hybridomas. *European Journal of Immunology* **22**, 2513-7.

**Fujita T, Nolan GP, Ghosh S und Baltimore D** (1992) Independent modes of transcriptional activation by the p50 and p65 subunits of NF-kappa B. *Genes & Development* **6**, 775-87.

**Fukunaga R und Hunter T** (1997) MNK1, a new MAP kinase-activated protein kinase, isolated by a novel expression screening method for identifying protein kinase substrates. *EMBO Journal* **16**, 1921-33.

**Garcia-Rodriguez C und Rao A** (2000) Requirement for integration of phorbol 12-myristate 13-acetate and calcium pathways is preserved in the transactivation domain of NFAT1. *European Journal of Immunology* **30**, 2432-36.

**Gerwins P, Blank JL und Johnson GL** (1997) Cloning of a novel mitogen-activated protein kinase kinase kinase, MEKK4, that selectively regulates the c-Jun amino terminal kinase pathway. *Journal of Biological Chemistry* **272**, 8288-95.

**Gilbert NE, O'Reilly JE, Chang CJ, Lin YC und Brueggemeier RW** (1995) Antiproliferative activity of gossypol and gossypolone on human breast cancer cells. *Life Sciences* **57**, 61-7.

**Gill SC und von Hippel PH** (1989) Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Analytical Biochemistry* **182**, 319-326.

**Glynn R, Akkaraju S, Healy JI, Rayner J, Goodnow CC und Mack DH** (2000) How self-tolerance and the immunosuppressive drug FK506 prevent B-cell mitogenesis. *Nature* **403**, 672-6.

**Gomez del Arco P, Martinez-Martinez S, Maldonado JL, Ortega-Perez I und Redondo JM** (2000) A role for the p38 MAP kinase pathway in the nuclear shuttling of NFATp. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 13872-8.

**Gomez MS, Piper RC, Hunsaker LA, Royer RE, Deck LM, Makler MT und Jagt DLV** (1997) Substrate and cofactor specificity and selective inhibition of lactate dehydrogenase from the malarial parasite *P. falciparum*. *Molecular and Biochemical Parasitology* **90**, 235-246.

**Gong CX, Singh TJ, Grundke-Iqbal I und Iqbal K** (1994) Alzheimer's disease abnormally phosphorylated tau is dephosphorylated by protein phosphatase-2B (CaN). *Journal of Neurochemistry* **62**, 803-6.

**Goto S, Yamamoto H, Fukunaga K, Iwasa T, Matsukado Y und Miyamoto E** (1985) Dephosphorylation of microtubule-associated protein 2, tau factor, and tubulin by CaN. *Journal of Neurochemistry* **45**, 276-83.

**Greengard P, Allen PB und Nairn AC** (1999) Beyond the dopamine receptor: the DARPP-32/protein phosphatase-1 cascade. *Neuron* **23**, 435-47.

**Griffith JP, Kim JL, Kim EE, Sintchak MD, Thomson JA, Fitzgibbon MJ, Fleming MA, Caron PR, Hsiao K und Navia MA** (1995) X-ray structure of CaN inhibited by the immunophilin-immunosuppressant FKBP12-FK506 complex. *Cell* **82**, 507-22.

**Grilli M, Goffi F, Memo M und Spano P** (1996) Interleukin-1beta and glutamate activate the NF-kappaB/Rel binding site from the regulatory region of the amyloid precursor protein gene in primary neuronal cultures. *Journal of Biological Chemistry* **271**, 15002-7.

**Gschwendt M, Kittstein W und Marks F** (1988) The weak immunosuppressant cyclosporine D as well as the immunologically inactive cyclosporine H are potent inhibitors in vivo of phorbol ester TPA-induced biological effects in mouse skin and of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin dependent EF-2 phosphorylation in vitro. *Biochemical & Biophysical Research Communications* **150**, 545-51.

**Gualberto A, Marquez G, Carballo M, Youngblood GL, Hunt SW, 3rd, Baldwin AS und Sobrino F** (1998) p53 transactivation of the HIV-1 long terminal repeat is blocked by PD 144795, a CaN-inhibitor with anti-HIV properties. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 7088-93.

**Gupta S, Barrett T, Whitmarsh AJ, Cavanagh J, Sluss HK, Derijard B und Davis RJ** (1996) Selective interaction of JNK protein kinase isoforms with transcription factors. *EMBO Journal* **15**, 2760-70.

**Gustin MC, Albertyn J, Alexander M und Davenport K** (1998) MAP kinase pathways in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology & Molecular Biology Reviews* **62**, 1264-300.

**Han J, Richter B, Li Z, Kravchenko V und Ulevitch RJ** (1995) Molecular cloning of human p38 MAP kinase. *Biochimica et Biophysica Acta* **1265**, 224-7.

**Hanahan D** (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology* **166**, 557-80.

**Handschumacher RE, Harding MW, Rice J, Drugge RJ und Speicher DW** (1984) Cyclophilin: a specific cytosolic binding protein for cyclosporin A. *Science* **226**, 544-7.

**Hanley RM, Dedman JR und Shenolikar S** (1987) Identification of high-affinity calmodulin-binding proteins in rat liver. *American Journal of Physiology* **252**, C277-84.

**Harding MW, Handschumacher RE und Speicher DW** (1986) Isolation and amino acid sequence of cyclophilin. *Journal of Biological Chemistry* **261**, 8547-55.

**Harris KA, Oyler GA, Doolittle GM, Vincent I, Lehman RA, Kincaid RL und Billingsley ML** (1993) Okadaic acid induces hyperphosphorylated forms of tau protein in human brain slices. *Annals of Neurology* **33**, 77-87.

**Hashimoto Y, Perrino BA und Soderling TR** (1990) Identification of an autoinhibitory domain in CaN. *Journal of Biological Chemistry* **265**, 1924-7.

**Hashimoto Y und Soderling TR** (1989) Regulation of CaN by phosphorylation. Identification of the regulatory site phosphorylated by Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II and protein kinase C. *Journal of Biological Chemistry* **264**, 16524-9.

**Henkel T, Zabel U, van Zee K, Muller JM, Fanning E und Baeuerle PA** (1992) Intramolecular masking of the nuclear location signal and dimerization domain in the precursor for the p50 NF-kappa B subunit. *Cell* **68**, 1121-33.

**Hennig L, Christner C, Kipping M, Schelbert B, Rucknagel KP, Grabley S, Kullertz G und Fischer G** (1998) Selective inactivation of parvulin-like peptidyl-prolyl *cis/trans* isomerases by juglone. *Biochemistry* **37**, 5953-60.

**Hill JA, Karimi M, Kutschke W, Davisson RL, Zimmerman K, Wang Z, Kerber RE und Weiss RM** (2000) Cardiac hypertrophy is not a required compensatory response to short-term pressure overload. *Circulation* **101**, 2863-9.

**Hipskind RA, Baccarini M und Nordheim A** (1994) Transient activation of RAF-1, MEK, and ERK2 coincides kinetically with ternary complex factor phosphorylation and immediate-early gene promoter activity in vivo. *Molecular & Cellular Biology* **14**, 6219-31.

**Ho AM, Jain J, Rao A und Hogan PG** (1994) Expression of the transcription factor NFATp in a neuronal cell line and in the murine nervous system. *Journal of Biological Chemistry* **269**, 28181-6.

**Hoey T, Sun YL, Williamson K und Xu X** (1995) Isolation of two new members of the NF-AT gene family and functional characterization of the NF-AT proteins. *Immunity* **2**, 461-72.

**Hohman RJ und Hultsch T** (1990) Cyclosporin A: new insights for cell biologists and biochemists. *New Biologist* **2**, 663-72.

**Hojo M, Morimoto T, Maluccio M, Asano T, Morimoto K, Lagman M, Shimbo T und Suthanthiran M** (1999) Cyclosporine induces cancer progression by a cell-autonomous mechanism. *Nature* **397**, 530-534.

**Honkanen RE, Zwiller J, Moore RE, Daily SL, Khatra BS, Dukelow M und Boynton AL** (1990) Characterization of microcystin-LR, a potent inhibitor of type 1 and type 2A protein phosphatases. *Journal of Biological Chemistry* **265**, 19401-4.

**Huai Q, Kim HY, Liu Y, Zhao Y, Mondragon A, Liu JO und Ke H** (2002) Crystal structure of CaN-cyclophilin-cyclosporin shows common but distinct recognition of immunophilin-drug complexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 12037-12042.

**Ingebritsen TS und Cohen P** (1983) Protein phosphatases: properties and role in cellular regulation. *Science* **221**, 331-8.

**Ip YT und Davis RJ** (1998) Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase (JNK)--from inflammation to development. *Current Opinion in Cell Biology* **10**, 205-19.



**Isenberg DA, Snaith ML, Morrow WJ, Al-Khader AA, Cohen SL, Fisher C und Mowbray J** (1981) Cyclosporin A for the treatment of systemic lupus erythematosus. *International Journal of Immunopharmacology* **3**, 163-9.

**Izumo S und Aoki H** (1998) CaN - the missing link in cardiac hypertrophy. *Nature Medicine* **4**, 661-2.

**Jain J, Burgeon E, Badalian TM, Hogan PG und Rao A** (1995a) A similar DNA-binding motif in NFAT family proteins and the Rel homology region. *Journal of Biological Chemistry* **270**, 4138-45.

**Jain J, Loh C und Rao A** (1995b) Transcriptional regulation of the IL-2 gene. *Current Opinion in Immunology* **7**, 333-42.

**Jain J, McCaffrey PG, Miner Z, Kerppola TK, Lambert JN, Verdine GL, Curran T und Rao A** (1993) The T-cell transcription factor NFATp is a substrate for CaN and interacts with Fos and Jun. *Nature* **365**, 352-5.

**Jiang H, Xiong F, Kong S, Ogawa T, Kobayashi M und Liu JO** (1997) Distinct tissue and cellular distribution of two major isoforms of CaN. *Molecular Immunology* **34**, 663-9.

**Jin ZG, Melaragno MG, Liao DF, Yan C, Haendeler J, Suh YA, Lambeth JD und Berk BC** (2000) Cyclophilin A is a secreted growth factor induced by oxidative stress. *Circulation Research* **87**, 789-796.

**Jinsart W, Ternai B und Polya GM** (1991) Inhibition of wheat embryo calcium-dependent protein kinase and avian myosin light chain kinase by flavonoids and related compounds. *Biological Chemistry Hoppe-Seyler* **372**, 819-27.

**Jones NC, Fedorov YV, Rosenthal RS und Olwin BB** (2001) ERK1/2 is required for myoblast proliferation but is dispensable for muscle gene expression and cell fusion. *Journal of Cellular Physiology* **186**, 104-15.

**June CH, Ledbetter JA, Lindsten T und Thompson CB** (1989) Evidence for the involvement of three distinct signals in the induction of IL-2 gene expression in human T lymphocytes. *Journal of Immunology* **143**, 153-61.

**Kakalis LT, Kennedy M, Sikkink R, Rusnak F und Armitage IM** (1995) Characterization of the calcium-binding sites of CaN B. *FEBS Letters* **362**, 55-8.

**Kallunki T, Su B, Tsigelny I, Sluss HK, Derijard B, Moore G, Davis R und Karin M** (1994) JNK2 contains a specificity-determining region responsible for efficient c-Jun binding and phosphorylation. *Genes & Development* **8**, 2996-3007.

**Kang SM, Tran AC, Grilli M und Lenardo MJ** (1992) NF-kappa B subunit regulation in nontransformed CD4+ T lymphocytes. *Science* **256**, 1452-6.

**Kanno T und Siebenlist U** (1996) Activation of nuclear factor-kappaB via T cell receptor requires a Raf kinase and Ca<sup>2+</sup> influx. Functional synergy between Raf and CaN. *Journal of Immunology* **157**, 5277-83.

**Kaufmann WK** (1998) Human Topoisomerase II Function, Tyrosine Phosphorylation and Cell Cycle Checkpoints. *Proceedings of the Society for Experimental Biology & Medicine* **217**, 327-334.

**Keesler GA, Bray J, Hunt J, Johnson DA, Gleason T, Yao Z, Wang SW, Parker C, Yamane H und Cole C** (1998) Purification and activation of recombinant p38 isoforms alpha, beta, gamma, and delta. *Protein Expression & Purification* **14**, 221-8.

**Kel A, Kel-Margoulis O, Babenko V und Wingender E** (1999) Recognition of NFATp/AP-1 composite elements within genes induced upon the activation of immune cells. *Journal of Molecular Biology* **288**, 353-76.

**Keleti T** (1986). *Basic Enzyme Kinetics*: Akademia Kiado, Budapest, Hungary.

**Kennedy MT, Brockman H und Rusnak F** (1996) Contributions of myristoylation to CaN structure/function. *Journal of Biological Chemistry* **271**, 26517-21.

**Keyse SM** (2000) Protein phosphatases and the regulation of mitogen-activated protein kinase signalling. *Current Opinion in Cell Biology* **12**, 186-92.

**Khandelwal RL, Vandenheede JR und Krebs EG** (1976) Purification, properties, and substrate specificities of phosphoprotein phosphatase(s) from rabbit liver. *Journal of Biological Chemistry* **251**, 4850-8.

**Kieffer LJ, Seng TW, Li W, Osterman DG und Handschumacher RE** (1993) Cyclophilin-40, a protein with homology to the P59 component of the steroid receptor complex - cloning of the cDNA and further characterization. *Journal of Biological Chemistry* **268**, 12303-12310.

**Kim IC, Waller DP, Marcelle GB, Cordell GA, Fong HH, Pirkle WH, Pilla L und Matlin SA** (1984) Comparative in vitro spermicidal effects of (+/-)-gossypol, (+)-gossypol, (-)-gossypol and gossypolone. *Contraception* **30**, 253-9.

**Kimura K, Sakurada K und Katoh N** (1985) Inhibition by gossypol of phospholipid-sensitive Ca<sup>2+</sup>-dependent protein kinase from pig testis. *Biochimica et Biophysica Acta* **839**, 276-80.

**Kincaid RL, Martensen TM und Vaughan M** (1986) Modulation of CaN phosphotyrosyl protein phosphatase activity by calmodulin and protease treatment. *Biochemical & Biophysical Research Communications* **140**, 320-8.

**Kincaid RL, Takayama H, Billingsley ML und Sitkovsky MV** (1987) Differential expression of calmodulin-binding proteins in B, T lymphocytes and thymocytes. *Nature* **330**, 176-8.

**King MM und Huang CY** (1984) The calmodulin-dependent activation and deactivation of the phosphoprotein phosphatase, CaN, and the effect of nucleotides, pyrophosphate, and divalent metal ions. Identification of CaN as a Zn and Fe metalloenzyme. *Journal of Biological Chemistry* **259**, 8847-56.

**King RH, Craggs RI, Gross ML, Tompkins C und Thomas PK** (1983) Suppression of experimental allergic neuritis by Cyclosporin-A. *Acta Neuropathologica* **59**, 262-8.

**Kirby JA, Parfett GJ, Reader JA und Pepper JR** (1988) Lung transplantation in the rat: a model for study of the cellular mechanisms of allograft rejection. *Immunology* **63**, 369-72.

**Kirkland TN und Fierer J** (1983) Cyclosporin A inhibits *Coccidioides immitis* in vitro and in vivo. *Antimicrobial Agents & Chemotherapy* **24**, 921-4.

**Kipping M, Zarnt T, Kiessig S, Reimer U, Fischer G und Bayer P** (2001) Increased backbone flexibility in threonine(45)-phosphorylated hirudin upon pH change. *Biochemistry* **40**, 7957-7963.

**Kishi H, Nakagawa K, Matsumoto M, Suga M, Ando M, Taya Y und Yamaizumi M** (2001) Osmotic shock induces G(1) arrest through p53 phosphorylation at Ser(33) by activated p38(MAPK) without phosphorylation at Ser(15) and Ser(20). *Journal of Biological Chemistry* **276**, 39115-39122.

**Klee CB, Crouch TH und Krinks MH** (1979) CaN: a calcium- and calmodulin-binding protein of the nervous system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **76**, 6270-3.

**Klee CB und Haiech J** (1980) Concerted role of calmodulin and CaN in calcium regulation. *Annals of the New York Academy of Sciences* **356**, 43-54.

**Klee CB, Krinks MH, Manalan AS, Cohen P und Stewart AA** (1983) Isolation and characterization of bovine brain CaN: a calmodulin-stimulated protein phosphatase. *Methods in Enzymology* **102**, 227-44.

**Klumpp S und Krieglstein J** (2002) Phosphorylation and dephosphorylation of histidine residues in proteins. *European Journal of Biochemistry* **269**, 1067-1071.

**Kopp EB und Ghosh S** (1995) NF-kappa B and rel proteins in innate immunity. *Advances in Immunology* **58**, 1-27.

**Kosako H, Gotoh Y, Matsuda S, Ishikawa M und Nishida E** (1992) Xenopus MAP kinase activator is a serine/threonine/tyrosine kinase activated by threonine phosphorylation. *EMBO Journal* **11**, 2903-8.

**Kovacs KJ** (1998) c-fos as a transcription factor - a stressful (re)view from a functional map. *Neurochemistry International* **33**, 287-297.

**Krebs EG, Kent AB und Fischer EH** (1958) Muscle phosphorylase-B kinase reaction. *Journal of Biological Chemistry* **231**, 73-83.

**Kreideweiss S, Ahlers C, Nordheim A und Ruhlmann A** (1999) Ca<sup>2+</sup>-induced p38/SAPK signalling inhibited by the immunosuppressant cyclosporin A in human peripheral blood mononuclear cells. *European Journal of Biochemistry* **265**, 1075-84.

**Kristof AS, Marks-Konczalik J und Moss J** (2001) Mitogen-activated protein kinases mediate activator protein-1-dependent human inducible nitric-oxide synthase promoter activation. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 8445-52.

**Kyo S, Klumpp DJ, Inoue M, Kanaya T und Laimins LA** (1997) Expression of AP1 during cellular differentiation determines human papillomavirus E6/E7 expression in stratified epithelial cells. *Journal of General Virology* **78**, 401-411.

**Kyriakis JM und Avruch J** (1990) pp54 microtubule-associated protein 2 kinase. A novel serine/threonine protein kinase regulated by phosphorylation and stimulated by poly-L-lysine. *Journal of Biological Chemistry* **265**, 17355-63.

**Kyriakis JM, Banerjee P, Nikolakaki E, Dai T, Rubie EA, Ahmad MF, Avruch J und Woodgett JR** (1994) The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases. *Nature* **369**, 156-60.

**Laemmli UK** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.

**Lai MM, Burnett PE, Wolosker H, Blackshaw S und Snyder SH** (1998) Cain, a novel physiologic protein inhibitor of CaN. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 18325-31.

**Lam E, Martin MM, Timerman AP, Sabers C und Fleischer S** (1995) A novel FK506 binding protein can mediate the immunosuppressive effects of FK506 and is associated with the cardiac ryanodine receptor. *Journal of Biological Chemistry* **270**, 26511-26522.

**Lang K, Schmid FX und Fischer G** (1987) Catalysis of protein folding by prolyl isomerase. *Nature* **329**, 268-70.

**Larner AJ, Sturman SG, Hawkins JB und Anderson M** (1994) Myopathy with ragged red fibres following renal transplantation: possible role of cyclosporin-induced hypomagnesaemia. *Acta Neuropathologica* **88**, 189-92.

**Lawen A und Traber R** (1993) Substrate specificities of cyclosporin synthetase and peptolide SDZ 214-103 synthetase. Comparison of the substrate specificities of the related multifunctional polypeptides. *Journal of Biological Chemistry* **268**, 20452-65.

**Lebihan S, Marsaud V, Mercierbodard C, Baulieu EE, Mader S, White JH und Renoir JM** (1998) Calcium/calmodulin kinase inhibitors and immunosuppressant macrolides rapamycin and FK506 inhibit progesterin- and glucocorticosteroid receptor-mediated transcription in human breast cancer T47d cells. *Molecular Endocrinology* **12**, 986-1001.

**Lee W, Haslinger A, Karin M und Tjian R** (1987) Activation of transcription by two factors that bind promoter and enhancer sequences of the human metallothionein gene and SV40. *Nature* **325**, 368-72.

**Leonardi A, Chariot A, Claudio E, Cunningham K und Siebenlist U** (2000) CIKS, a connection to I $\kappa$ B kinase and stress-activated protein kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 10494-9.

**Leppa S, Saffrich R, Ansorge W und Bohmann D** (1998) Differential regulation of c-Jun by ERK and JNK during PC12 cell differentiation. *EMBO Journal* **17**, 4404-13.

**Lernbecher T, Muller U und Wirth T** (1993) Distinct NF- $\kappa$ B/Rel transcription factors are responsible for tissue-specific and inducible gene activation. *Nature* **365**, 767-70.

**Lewis TS, Shapiro PS und Ahn NG** (1998) Signal transduction through MAP kinase cascades. *Advances in Cancer Research*, Vol **74 74**, 49-139.

**Li W und Handschumacher RE** (1996) Regulation of the nuclear factor of activated T cells in stably transfected Jurkat cell clones. *Biochemical & Biophysical Research Communications* **219**, 96-9.

**Ligueros M, Jeoung D, Tang B, Hochhauser D, Reidenberg MM und Sonenberg M** (1997) Gossypol inhibition of mitosis, cyclin D1 and Rb protein in human mammary cancer cells and cyclin-D1 transfected human fibrosarcoma cells. *British Journal of Cancer* **76**, 21-8.

**Lim HW, De Windt LJ, Mante J, Kimball TR, Witt SA, Sussman MA und Molkenin JD** (2000) Reversal of cardiac hypertrophy in transgenic disease models by CaN inhibition. *Journal of Molecular & Cellular Cardiology* **32**, 697-709.

**Lim HW, New L, Han J und Molkenin JD** (2001a) CaN enhances MAPK phosphatase-1 expression and p38 MAPK inactivation in cardiac myocytes. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 15913-9.

**Lin K, Hwang PK und Fletterick RJ** (1997) Distinct phosphorylation signals converge at the catalytic center in glycogen phosphorylases. *Structure* **5**, 1511-1523.

**Lin R, Gewert D und Hiscott J** (1995) Differential transcriptional activation in vitro by NF- $\kappa$ B/Rel proteins. *Journal of Biological Chemistry* **270**, 3123-31.

**Lin T, Murono EP, Osterman J, Nankin HR und Coulson PB** (1981) Gossypol inhibits testicular steroidogenesis. *Fertility & Sterility* **35**, 563-6.

**Lin X, Sikkink RA, Rusnak F und Barber DL** (1999) Inhibition of CaN phosphatase activity by a CaN B homologous protein. *Journal of Biological Chemistry* **274**, 36125-31.

**Liu GZ** (1981) Clinical study of gossypol as a male contraceptive. *Reproduccion* **5**, 189-93.

**Liu J, Albers MW, Wandless TJ, Luan S, Alberg DG, Belshaw PJ, Cohen P, MacKintosh C, Klee CB und Schreiber SL** (1992) Inhibition of T cell signaling by immunophilin-ligand complexes correlates with loss of CaN phosphatase activity. *Biochemistry* **31**, 3896-901.

**Liu J, Farmer JD, Jr., Lane WS, Friedman J, Weissman I und Schreiber SL** (1991) CaN is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell* **66**, 807-15.

**Liu J, Arai K und Arai N** (2001) Inhibition of NFAT $\alpha$  activation by an oligopeptide: Disrupting the interaction of NFAT $\alpha$  with CaN. *Journal of Immunology* **167**, 2677-2687.

**Livingstone C, Patel G und Jones N** (1995) ATF-2 contains a phosphorylation-dependent transcriptional activation domain. *EMBO Journal* **14**, 1785-97.

**Loh C, Shaw KT, Carew J, Viola JP, Luo C, Perrino BA und Rao A** (1996a) CaN binds the transcription factor NFAT1 and reversibly regulates its activity. *Journal of Biological Chemistry* **271**, 10884-91.

**Lopez-Illasaca M, Schiene C, Kullertz G, Tradler T, Fischer G und Wetzker R** (1998) Effects of FK506-binding protein 12 and FK506 on autophosphorylation of epidermal growth factor receptor. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 9430-4.

**Luo C, Burgeon E, Carew JA, McCaffrey PG, Badalian TM, Lane WS, Hogan PG und Rao A** (1996a) Recombinant NFAT1 (NFATp) is regulated by CaN in T cells and mediates transcription of several cytokine genes. *Molecular & Cellular Biology* **16**, 3955-66.

**Luo C, Shaw KT, Raghavan A, Aramburu J, Garcia-Cozar F, Perrino BA, Hogan PG und Rao A** (1996b) Interaction of CaN with a domain of the transcription factor NFAT1 that controls nuclear import. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**, 8907-12.

**Luo ZH, Zheng JH, Lu Y und Bregman DB** (2001) Ultraviolet radiation alters the phosphorylation of RNA polymerase II large subunit and accelerates its proteasome-dependent degradation. *Mutation Research - DNA Repair* **486**, 259-274.

**Macian F, Lopez-Rodriguez C und Rao A** (2001) Partners in transcription: NFAT and AP-1. *Oncogene* **20**, 2476-89.

**Manalan AS, Krinks MH und Klee CB** (1984) CaN: a member of a family of calmodulin-stimulated protein phosphatases. *Experimental Biology & Medicine* **177**, 12-6.

**Manger K, Kalden JR und Manger B** (1996) Cyclosporin A in the treatment of systemic lupus erythematosus: results of an open clinical study. *British Journal of Rheumatology* **35**, 669-75.

**Mansour SJ, Resing KA, Candi JM, Hermann AS, Gloor JW, Herskind KR, Wartmann M, Davis RJ und Ahn NG** (1994) Mitogen-activated protein (MAP) kinase phosphorylation of MAP kinase kinase: determination of phosphorylation sites by mass spectrometry and site-directed mutagenesis. *Journal of Biochemistry* **116**, 304-14.

**Marie-Cardine A und Schraven B** (1999) Coupling the TCR to downstream signalling pathways: the role of cytoplasmic and transmembrane adaptor proteins. *Cellular Signalling* **11**, 705-12.

**Marienfeld R, Neumann M, Chuvpilo S, Escher C, Kneitz B, Avots A, Schimpl A und Serfling E** (1997) Cyclosporin A interferes with the inducible degradation of Nf-Kappa-B inhibitors, but not with the processing of P105/Nf-Kappa-B1 in T cells. *European Journal of Immunology* **27**, 1601-1609.

**Martin BL** (1998) Inhibition of CaN by the tyrphostin class of tyrosine kinase inhibitors. *Biochemical Pharmacology* **56**, 483-8.

**Marumo T, Nakaki T, Hishikawa K, Suzuki H, Kato R und Saruta T** (1995) Cyclosporin A inhibits nitric oxide synthase induction in vascular smooth muscle cells. *Hypertension* **25**, 764-8.

**Masuda ES, Imamura R, Amasaki Y, Arai K und Arai N** (1998) Signalling into the T cell nucleus: NFAT regulation. *Cellular Signalling* **10**, 599-611.

**Masuda ES, Liu J, Imamura R, Imai SI, Arai KI und Arai N** (1997) Control of NFATx1 nuclear translocation by a CaN-regulated inhibitory domain. *Molecular & Cellular Biology* **17**, 2066-75.

**Masuda ES, Naito Y, Tokumitsu H, Campbell D, Saito F, Hannum C, Arai K und Arai N** (1995) NFATx, a novel member of the nuclear factor of activated T cells family that is expressed predominantly in the thymus. *Molecular & Cellular Biology* **15**, 2697-706.

**Mata M, Honegger P und Fink DJ** (1997) Modulation of phosphorylation of neuronal cytoskeletal proteins by neuronal depolarization. *Cellular & Molecular Neurobiology* **17**, 129-40.

**Matsuda S, Moriguchi T, Koyasu S und Nishida E** (1998) Tlymphocyte activation signals for interleukin-2 production involve activation of MKK6-p38 and MKK7-SAPK/JNK signaling pathways sensitive to cyclosporin A. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 12378-12382.

**Matsuda S und Koyasu S** (2000) Mechanisms of action of cyclosporine. *Immunopharmacology* **47**, 119-25.

**May MJ. und Gosh S** (1997) Rel/NFkappaB and IkappaB proteins:an overview. *Seminars in Cancer Biology* **8**, 63-73.

**Mayrleitner M, Timerman AP, Wiederrecht G und Fleischer S** (1994) The calcium release channel of sarcoplasmic reticulum is modulated by FK506 binding protein - Effect of FKBP-12 on single channel activity of the skeletal muscle ryanodine receptor. *Cell Calcium* **15**, 99-108.

**McCubrey JA, May WS, Duronio V und Mufson A** (2000) Serine/threonine phosphorylation in cytokine signal transduction. *Leukemia* **14**, 9-21.

**McDonald JK und Kadkhodayan S** (1988) Cathepsin L--a latent proteinase in guinea pig sperm. *Biochemical & Biophysical Research Communications* **151**, 827-35.

**Meksongsee LA, Clawson AJ und Smith FH** (1970) The in vivo effect of gossypol on cytochrome oxidase, succinoxidase, and succinic dehydrogenase in animal tissues. *Journal of Agricultural & Food Chemistry* **18**, 917-20.

**Mihatsch MJ, Thiel G und Ryffel B** (1989) Cyclosporin A: action and side-effects. *Toxicology Letters* **46**, 125-39.

**Miskin JE, Abrams CC und Dixon LK** (2000) African swine fever virus protein A238L interacts with the cellular phosphatase CaN via a binding domain similar to that of NFAT. *Journal of Virology* **74**, 9412-9420.

**Mittal CK und Jadhav AL** (1994) Calcium-dependent inhibition of constitutive nitric oxide synthase. *Biochemical & Biophysical Research Communications* **203**, 8-15.

**Molkentin JD, Lu JR, Antos CL, Markham B, Richardson J, Robbins J, Grant SR und Olson EN** (1998) A CaN-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy. *Cell* **93**, 215-28.

**Moll JR, Acharya A, Gal J, Mir AA und Vinson C** (2002) Magnesium is required for specific DNA binding of the CREB B-ZIP domain. *Nucleic Acids Research* **30**, 1240-1246.

**Mondragon A, Griffith EC, Sun L, Xiong F, Armstrong C und Liu JO** (1997) Overexpression and purification of human CaN alpha from Escherichia coli and assessment of catalytic functions of residues surrounding the binuclear metal center. *Biochemistry* **36**, 4934-42.

**Moriya M, Fujinaga K, Yazawa M und Katagiri C** (1995) Immunohistochemical localization of the calcium/calmodulin-dependent protein phosphatase, CaN, in the mouse testis: its unique accumulation in spermatid nuclei. *Cell & Tissue Research* **281**, 273-81.

**Morooka H, Bonventre JV, Pombo CM, Kyriakis JM und Force T** (1995) Ischemia and reperfusion enhance ATF-2 and c-Jun binding to cAMP response elements and to an AP-1 binding site from the c-jun promoter. *Journal of Biological Chemistry* **270**, 30084-92.

**Mosior M und Newton AC** (1995) Mechanism of interaction of protein kinase C with phorbol esters - reversibility and nature of membrane association. *Journal of Biological Chemistry* **270**, 25526-25533.

**Mosmann T** (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival - Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* **65**, 55-63.

**Mullis KB und Faloona FA** (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology* **155**, 335-50.

**Musaro A, McCullagh KJ, Naya FJ, Olson EN und Rosenthal N** (1999) IGF-1 induces skeletal myocyte hypertrophy through CaN in association with GATA-2 and NF-ATc1. *Nature* **400**, 581-5.

**Nabel G und Baltimore D** (1987) An inducible transcription factor activates expression of human immunodeficiency virus in T cells. *Nature* **326**, 711-3.

**Nakayama GR, Nova MP und Parandoosh Z** (1998) A scintillating microplate assay for the assessment of protein kinase activity. *Journal of Biomolecular Screening* **3**, 43-48.

**Namgaladze D, Hofer HW und Ullrich V** (2002) Redox control of CaN by targeting the binuclear Fe<sup>2+</sup>-Zn<sup>2+</sup> center at the enzyme active site. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 5962-5969.

**Navarro-Antolin J, Rey-Campos J und Lamas S** (2000) Transcriptional induction of endothelial nitric oxide gene by cyclosporine A - A role for activator protein-1. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 3075-3080.

**Negulescu PA, Shastri N und Cahalan MD** (1994) Intracellular calcium dependence of gene expression in single T lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**, 2873-7.

**Noble A, Truman JP, Vyas B, Vukmanovic-Stejic M, Hirst WJ und Kemeny DM** (2000) The balance of protein kinase C and calcium signaling directs T cell subset development. *Journal of Immunology* **164**, 1807-13.

**Northrop JP, Ho SN, Chen L, Thomas DJ, Timmerman LA, Nolan GP, Admon A und Crabtree GR** (1994) NF-AT components define a family of transcription factors targeted in T-cell activation. *Nature* **369**, 497-502.

**Ochiai T, Nakajima K, Nagata M, Hori S, Asano T und Isono K** (1987) Studies of the induction and maintenance of long-term graft acceptance by treatment with FK506 in heterotopic cardiac allotransplantation in rats. *Transplantation* **44**, 734-8.

**Offner G, Hoyer PF, Brodehl J und Pichlmayr R** (1987) Cyclosporin A in paediatric kidney transplantation. *Pediatric Nephrology* **1**, 125-30.

**Ohnishi H, Ledbetter JA, Kanner SB, Linsley PS, Tanaka T, Geller AM und Kotb M** (1995) CD28 cross-linking augments TCR-mediated signals and costimulates superantigen responses. *Journal of Immunology* **154**, 3180-93.

**Okamura H, Aramburu J, Garcia-Rodriguez C, Viola JP, Raghavan A, Tahiliani M, Zhang X, Qin J, Hogan PG und Rao A** (2000) Concerted dephosphorylation of the transcription factor NFAT1 induces a conformational switch that regulates transcriptional activity. *Molecular Cell* **6**, 539-50.

**Olgiati KL, Toscano DG, Atkins WM und Toscano WA, Jr.** (1984) Gossypol inhibition of adenylate cyclase. *Archives of Biochemistry & Biophysics* **231**, 411-5.

**Olson EN und Williams RS** (2000) CaN signaling and muscle remodeling. *Cell* **101**, 689-92.

**Omura M, Kurota H und Yamaguchi M** (1998) Inhibitory effect of regucalcin on  $Ca^{2+}$ /calmodulin-dependent phosphatase activity in rat renal cortex cytosol. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* **21**, 440-3.

**Ono T, Yamamoto H, Tashima K, Nakashima H, Okumura E, Yamada K, Hisanaga S, Kishimoto T, Miyakawa T und Miyamoto E** (1995) Dephosphorylation of abnormal sites of tau factor by protein phosphatases and its implication for Alzheimer's disease. *Neurochemistry International* **26**, 205-15.

**Pallen CJ, Valentine KA, Wang JH und Hollenberg MD** (1985) CaN-mediated dephosphorylation of the human placental membrane receptor for epidermal growth factor urogastrone. *Biochemistry* **24**, 4727-30.

**Pallen CJ und Wang JH** (1983) Calmodulin-stimulated dephosphorylation of p-nitrophenyl phosphate and free phosphotyrosine by CaN. *Journal of Biological Chemistry* **258**, 8550-3.

**Pan S, Koyano-Nakagawa N, Tsuruta L, Amasaki Y, Yokota T, Mori S, Arai N und Arai K** (1997) Molecular cloning and functional characterization of murine cDNA encoding transcription factor NFATc. *Biochemical & Biophysical Research Communications* **240**, 314-23.

**Papadopoulos V, Brown AS und Hall PF** (1990) Calcium-calmodulin-dependent phosphorylation of cytoskeletal proteins from adrenal cells. *Molecular & Cellular Endocrinology* **74**, 109-23.

**Papageorgiou C, Kallen J, France J und French R** (1997) Conformational control of cyclosporin through substitution of the N-5 position. A new class of cyclosporin antagonists. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **5**, 187-92.

**Paprica PA, Margaritis A und Petersen NO** (1992) Preparation of novel cyclosporin A derivatives. *Bioconjugate Chemistry* **3**, 32-6.

**Park J, Yaseen NR, Hogan PG, Rao A und Sharma S** (1995) Phosphorylation of the transcription factor NFATp inhibits its DNA binding activity in cyclosporin A-treated human B and T cells. *Journal of Biological Chemistry* **270**, 20653-9.

**Park JH und Levitt L** (1993) Overexpression of mitogen-activated protein kinase (ERK1) enhances T cell cytokine gene expression: role of AP1, NF-AT, and NF-KB. *Blood* **82**, 2470-7.

**Payne DM, Rossomando AJ, Martino P, Erickson AK, Her JH, Shabanowitz J, Hunt DF, Weber MJ und Sturgill TW** (1991) Identification of the regulatory phosphorylation sites in pp42/mitogen-activated protein kinase (MAP kinase). *EMBO Journal* **10**, 885-92.

**Pearce S, Sufi SB, O'Shaughnessy PJ, Donaldson A und Jeffcoate SL** (1986) Inhibition by gossypol of cyclic AMP production in mouse Leydig cells. *Contraception* **34**, 639-46.

**Pearson G, Robinson F, Gibson TB, Xu BE, Karandikar M, Berman K und Cobb MH** (2001) Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: Regulation and physiological functions. *Endocrine Reviews* **22**, 153-183.



**Pelech S und Cohen P** (1985) The protein phosphatases involved in cellular regulation. 1. Modulation of protein phosphatases-1 and 2A by histone H1, protamine, polylysine and heparin. *European Journal of Biochemistry* **148**, 245-51.

**Pestell RG, Hollenberg AN, Albanese C und Jameson JL** (1994) C-Jun represses transcription of the human chorionic gonadotropin alpha and beta genes through distinct types of CREs. *Journal of Biological Chemistry* **269**, 31090-31096.

**Plaksin D, Baeuerle PA und Eisenbach L** (1993) KBF1 (p50 NF-kappa B homodimer) acts as a repressor of H-2Kb gene expression in metastatic tumor cells. *Journal of Experimental Medicine* **177**, 1651-62.

**Pons S und Torres-Aleman I** (2000) Insulin-like growth factor-I stimulates dephosphorylation of ikappa B through the serine phosphatase CaN (protein phosphatase 2B). *Journal of Biological Chemistry* **275**, 38620-5.

**Porter CM, Havens MA und Clipstone NA** (2000) Identification of amino acid residues and protein kinases involved in the regulation of NFATc subcellular localization. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 3543-51.

**Poso H, Wichmann K, Janne J und Luukkainen T** (1980) Gossypol, a powerful inhibitor of human spermatozoal metabolism. *Lancet* **1**, 885-6.

**Pyrzynska B, Mosieniak G und Kaminska B** (2000) Changes of the trans-activating potential of AP-1 transcription factor during cyclosporin A-induced apoptosis of glioma cells are mediated by phosphorylation and alterations of AP-1 composition. *Journal of Neurochemistry* **74**, 42-51.

**Qi DF, Turner RS und Kuo JF** (1984) S-100 and other acidic proteins promote Ca<sup>2+</sup>-independent phosphorylation of protamine catalyzed by a new protein kinase from brain. *Journal of Neurochemistry* **42**, 458-65.

**Raingaud J, Gupta S, Rogers JS, Dickens M, Han J, Ulevitch RJ und Davis RJ** (1995) Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine. *Journal of Biological Chemistry* **270**, 7420-6.

**Randak C, Brabletz T, Hergenrother M, Sobotta I und Serfling E** (1990) Cyclosporin A suppresses the expression of the interleukin 2 gene by inhibiting the binding of lymphocyte-specific factors to the IL-2 enhancer. *EMBO Journal* **9**, 2529-36.

**Ranger AM, Grusby MJ, Hodge MR, Gravalles EM, de la Brousse FC, Hoey T, Mickanin C, Baldwin HS und Glimcher LH** (1998) The transcription factor NF-ATc is essential for cardiac valve formation. *Nature* **392**, 186-90.

**Rao A, Luo C und Hogan PG** (1997) Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. *Annual Review of Immunology* **15**, 707-47.

**Reiter TA, Abraham RT, Choi M und Rusnak F** (1999) Redox regulation of CaN in T lymphocytes. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* **4**, 632-44.

**Rippmann JF, Hobbie S, Daiber C, Guilliard B, Bauer M, Birk J, Nar H, Garin-Chesa P, Rettig WJ und Schnapp A** (2000) Phosphorylation-dependent proline isomerization catalyzed by Pin1 is essential for tumor cell survival and entry into mitosis. *Cell Growth & Differentiation* **11**, 409-416.

**Roilides E, Robinson T, Sein T, Pizzo PA und Walsh TJ** (1994) In vitro and ex vivo effects of cyclosporin A on phagocytic host defenses against *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrobial Agents & Chemotherapy* **38**, 2883-8.

**Rondinone CM, Zarnowski MJ, Londos C und Smith UPG** (1996) The Inhibitory Effect of Staurosporine on Insulin Action Is Prevented by Okadaic Acid - Evidence for an Important Role of Serine/Threonine Phosphorylation in Eliciting Insulin-Like Effects. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* **1314**, 49-56.

**Rooney JW, Sun YL, Glimcher LH und Hoey T** (1995) Novel NFAT sites that mediate activation of the interleukin-2 promoter in response to T-cell receptor stimulation. *Molecular & Cellular Biology* **15**, 6299-310.

**Rosen MK, Standaert RF, Galat A, Nakatsuka M und Schreiber SL** (1990) Inhibition of FKBP rotamase activity by immunosuppressant FK506: twisted amide surrogate. *Science* **248**, 863-6.

**Rossomando AJ, Dent P, Sturgill TW und Marshak DR** (1994) Mitogen-activated protein kinase kinase 1 (MKK1) is negatively regulated by threonine phosphorylation. *Molecular & Cellular Biology* **14**, 1594-602.

**Ruff VA und Leach KL** (1995) Direct demonstration of NFATp dephosphorylation and nuclear localization in activated HT-2 cells using a specific NFATp polyclonal antibody. *Journal of Biological Chemistry* **270**, 22602-7.

**Rusnak F und Mertz P** (2000) CaN: form and function. *Physiological Reviews* **80**, 1483-521.

**Rutgeerts P** (1998) Medical therapy of inflammatory bowel disease. *Digestion* **59**, 453-69.

**Ryffel B, Woerly G, Greiner B, Haendler B, Mihatsch MJ und Foxwell BM** (1991) Distribution of the cyclosporine binding protein cyclophilin in human tissues. *Immunology*, 399-404.

**Ryseck RP, Bull P, Takamiya M, Bours V, Siebenlist U, Dobrzanski P und Bravo R** (1992) RelB, a new Rel family transcription activator that can interact with p50-NF-kappa B. *Molecular & Cellular Biology* **12**, 674-84.

**Sablinski T, Gianello PR, Bailin M, Bergen KS, Emery DW, Fishman JA, Foley A, Hatch T, Hawley RJ und Kozlowski T** (1997) Pig to monkey bone marrow and kidney xenotransplantation. *Surgery* **121**, 381-91.

**Sagoo JK, Fruman DA, Wesselborg S, Walsh CT und Bierer BE** (1996) Competitive inhibition of CaN phosphatase activity by its autoinhibitory domain. *Biochemical Journal* **320**, 879-84.

**Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB und Erlich HA** (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487-91.

**Schiaffonati L, Maroni P, Bendinelli P, Tiberio L und Piccoletti R** (2001) Hyperthermia induces gene expression of heat shock protein 70 and phosphorylation of mitogen activated protein kinases in the rat cerebellum. *Neuroscience Letters* **312**, 75-78.

**Schiene-Fischer C und Yu C** (2001) Receptor accessory folding helper enzymes: the functional role of peptidyl prolyl cis/trans isomerases. *FEBS Letters* **495**, 1-6.

**Schmitz ML, Stelzer G, Altmann H, Meisterernst M und Baeuerle PA** (1995) Interaction of the COOH-terminal transactivation domain of p65 NF-kappa B with TATA-binding protein, transcription factor IIB, and coactivators. *Journal of Biological Chemistry* **270**, 7219-26.

**Schreiber SL, und Crabtree GR** (1992) The mechanism of action of cyclosporin A and FK506. *Immunology today* **13**, 136-142.

**Schutte J, Viallet J, Nau M, Segal S, Fedorko J und Minna J** (1989) jun-B inhibits and c-fos stimulates the transforming and trans-activating activities of c-jun. *Cell* **59**, 987-97.

**Scott JE, Ruff VA und Leach KL** (1997) Dynamic equilibrium between CaN and kinase activities regulates the phosphorylation state and localization of the nuclear factor of activated T cells. *Biochemical Journal* **324**, 597-603.

**Seger R, Seger D, Lozeman FJ, Ahn NG, Graves LM, Campbell JS, Ericsson L, Harrylock M, Jensen AM und Krebs EG** (1992) Human T cell mitogen-activated protein kinase kinases are related to yeast signal transduction kinases. *Journal of Biological Chemistry* **267**, 25628-31.

**Sen R und Baltimore D** (1986) Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell* **46**, 705-16.

**Serfling E, Berberich-Siebelt F, Chuvpilo S, Jankevics E, Klein-Hessling S, Twardzik T und Avots A** (2000) The role of NF-AT transcription factors in T cell activation and differentiation. *Biochimica et Biophysica Acta* **1498**, 1-18.

**Seternes OM, Sorensen R, Johansen B, Loennechen T, Aarbakke J und Moens U** (1998) Synergistic increase in c-fos expression by simultaneous activation of the ras/raf/map kinase- and protein kinase A signaling pathways is mediated by the c-fos AP-1 and SRE sites. *Biochimica et Biophysica Acta* **1395**, 345-60.

**Shannon MF, Himes SR und Coles LS** (1995) GM-CSF and IL-2 share common control mechanisms in response to costimulatory signals in T cells. *Journal of Leukocyte Biology* **57**, 767-73.

**Sharkey J und Butcher SP** (1994) Immunophilins mediate the neuroprotective effects of FK506 in focal cerebral ischaemia. *Nature* **371**, 336-9.

**Sharkey J, Jones PA, McCarter JF und Kelly JS** (2000) CaN inhibitors as neuroprotectants - Focus of tacrolimus and cyclosporin. *Cns Drugs* **13**, 1-13.

**Shaw JP, Utz PJ, Durand DB, Toole JJ, Emmel EA und Crabtree GR** (1988) Identification of a putative regulator of early T cell activation genes. *Science* **241**, 202-5.

**Shaw KTY, Ho AM, Raghavan A, Kim J, Jain JN, Park JC, Sharma S, Rao A und Hogan PG** (1995) Immunosuppressive drugs prevent a rapid dephosphorylation of transcription factor NFAT1 in stimulated immune cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**, 11205-11209.

**Sheng M und Greenberg ME** (1990) The regulation and function of c-fos and other immediate early genes in the nervous-system. *Neuron* **4**, 477-485.

**Shibasaki F, Kondo E, Akagi T und McKeon F** (1997) Suppression of signalling through transcription factor NF-AT by interactions between CaN and Bcl-2. *Nature* **386**, 728-31.

**Shibasaki F, Price ER, Milan D und McKeon F** (1996) Role of kinases and the phosphatase CaN in the nuclear shuttling of transcription factor NF-AT4. *Nature* **382**, 370-3.

**Shidaifat F, Canatan H, Kulp SK, Sugimoto Y, Zhang Y, Brueggemeier RW, Somers WJ, Chang WY, Wang HC und Lin YC** (1997) Gossypol arrests human benign prostatic hyperplastic cell growth at G0/G1 phase of the cell cycle. *Anticancer Research* **17**, 1003-9.

**Shimoyama M, Hayashi D, Takimoto E, Zou Y, Oka T, Uozumi H, Kudoh S, Shibasaki F, Yazaki Y und Nagai R** (1999) CaN plays a critical role in pressure overload-induced cardiac hypertrophy. *Circulation* **100**, 2449-54.

**Sica A, Dorman L, Viggiano V, Cippitelli M, Ghosh P, Rice N und Young HA** (1997) Interaction of NF-kappaB and NFAT with the interferon-gamma promoter. *Journal of Biological Chemistry* **272**, 30412-20.

- Singh TJ und Wang JH** (1987) Phosphorylation of CaN by glycogen synthase (casein) kinase-1. *Biochemistry & Cell Biology* **65**, 917-21.
- Sitlani A und Crothers DM** (1996) Fos and Jun do not bend the AP-1 recognition site. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**, 3248-52.
- Snyder SH und Sabatini DM** (1995) Immunophilins and the nervous system. *Nature Medicine* **1**, 32-7.
- Soncin F, Asea A, Zhang X, Stevenson MA und Calderwood SK** (2000) Role of calcium activated kinases and phosphatases in heat shock factor-1 activation. *International Journal of Molecular Medicine* **6**, 705-10.
- Spannaus-Martin DJ und Martin BL** (2000) In vitro effect of retinoids on CaN activity. In *Biochemical Pharmacology*, vol. **60** (ed., pp. 803-8).
- Srivastava AK und StLouis J** (1997) Smooth muscle contractility and protein tyrosine phosphorylation. *Molecular & Cellular Biochemistry* **176**, 47-51.
- Staddon JM, Herrenknecht K, Smales C und Rubin LL** (1995) Evidence that tyrosine phosphorylation may increase tight junction permeability. *Journal of Cell Science* **108**, 609-19.
- Steff AM, Carillo S, Pariat M und Piechaczyk M** (1997) Decreased susceptibility to calpains of V-Fos(Fbr) but not of V-Fos(Fbj) or V-Jun(Asv17) retroviral proteins compared with their cellular counterparts. *Biochemical Journal* **323**, 685-692.
- Steinmuller L, Cibelli G, Moll JR, Vinson C und Thiel G** (2001) Regulation and composition of activator protein 1 (AP-1) transcription factors controlling collagenase and c-Jun promoter activities. *Biochemical Journal* **360**, 599-607.
- Stevenson AS, Gomez MF, Hill-Eubanks DC und Nelson MT** (2001) NFAT4 movement in native smooth muscle. A role for differential Ca(2+) signaling. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 15018-24.
- Stewart AA, Ingebritsen TS, Manalan A, Klee CB und Cohen P** (1982) Discovery of a Ca<sup>2+</sup>- and calmodulin-dependent protein phosphatase: probable identity with CaN (CaM-BP80). *FEBS Letters* **137**, 80-4.
- Stocco CO, Lau LF und Gibori G** (2002) A calcium/calmodulin-dependent activation of ERK1/2 mediates JunD phosphorylation and induction of nur77 and 20 alpha-hsd genes by prostaglandin F-2 alpha in ovarian cells. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 3293-3302.
- Strack S, Wadzinski BE und Ebner FF** (1996) Localization of the calcium/calmodulin-dependent protein phosphatase, CaN, in the hindbrain and spinal cord of the rat. *Journal of Comparative Neurology* **375**, 66-76.
- Studier FW und Moffatt BA** (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *Journal of Molecular Biology* **189**, 113-30.
- Su B, Cheng J, Yang J und Guo Z** (2001) MEKK2 is required for Tcell receptor signals in JNK activation and interleukin-2 gene expression. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 14784-90.
- Su Q, Zhao M, Weber E, Eugster HP und Ryffel B** (1995) Distribution and activity of CaN in rat tissues. Evidence for post-transcriptional regulation of testis-specific CaN B. *European Journal of Biochemistry* **230**, 469-74.
- Su QX, Eugster HP, Ryffel B und Dumont FJ** (1996) Cyclosporin a enhances the calcium-dependent induction of AP-1 complex and c-fos mRNA in a T cell lymphoma. *Biochemical & Biophysical Research Communications* **229**, 249-256.

- Sugano N, Ito K und Murai S** (1998) Cyclosporin A inhibits collagenase gene expression via AP-1 and JNK suppression in human gingival fibroblasts. *Journal of Periodontal Research* **33**, 448-52.
- Sugiura R, Sio SO, Shuntoh H und Kuno T** (2001) Molecular genetic analysis of the CaN signaling pathways. *Cellular & Molecular Life Sciences* **58**, 278-88.
- Sugiura R, Toda T, Dhut S, Shuntoh H und Kuno T** (1999) The MAPK kinase Pek1 acts as a phosphorylation-dependent molecular switch. *Nature* **399**, 479-83.
- Sullivan E, Hemsley P und Pickard A** (1997) Development of a scintillation proximity assay for CaN phosphatase activity. *Journal of Biomolecular Screening* **2**, 19-23.
- Sun L, Youn HD, Loh C, Stolow M, He W und Liu JO** (1998) Cabin 1, a negative regulator for CaN signaling in T lymphocytes. *Immunity* **8**, 703-11.
- Swanson SK, Born T, Zydowsky LD, Cho H, Chang HY, Walsh CT und Rusnak F** (1992) Cyclosporin-mediated inhibition of bovine CaN by cyclophilins A and B. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**, 3741-5.
- Swoap SJ, Hunter RB, Stevenson EJ, Felton HM, Kansagra NV, Lang JM, Esser KA und Kandarian SC** (2000) The CaN-NFAT pathway and muscle fiber-type gene expression. *American Journal of Physiology - Cell Physiology* **279**, C915-24.
- Szucs K, Ledesma MD, Dombradi V, Gergely P, Avila J und Friedrich P** (1994) Dephosphorylation of tau protein from Alzheimer's disease patients. *Neuroscience Letters* **165**, 175-8.
- Thomas M, von Hagen V, Moustafa Y, Montmasson MP und Monet JD** (1991) Effects of gossypol on the cell cycle phases in T-47D human breast cancer cells. *Anticancer Research* **11**, 1469-75.
- Thompson JE, Phillips RJ, Erdjument-Bromage H, Tempst P und Ghosh S** (1995) I kappa B-beta regulates the persistent response in a biphasic activation of NF-kappa B. *Cell* **80**, 573-82.
- Thomson AW und Cameron ID** (1981) Immune suppression with cyclosporin A-optimism and caution. *Scottish Medical Journal* **26**, 139-44.
- Tian J und Karin M** (1999) Stimulation of Elk1 transcriptional activity by mitogen-activated protein kinases is negatively regulated by protein phosphatase 2B (CaN). *Journal of Biological Chemistry* **274**, 15173-80.
- Tokuda M und Hatase O** (1998) Regulation of neuronal plasticity in the central nervous system by phosphorylation and dephosphorylation. *Molecular Neurobiology* **17**, 137-56.
- Tonks NK und Cohen P** (1983) CaN is a calcium ion-dependent, calmodulin-stimulated protein phosphatase. *Biochimica et Biophysica Acta* **747**, 191-3.
- Trevillyan JM, Chiou XG, Chen YW, Ballaron SJ, Sheets MP, Smith ML, Wiedeman PE, Warrior U, Wilkins J, Gubbins EJ et al.** (2001) Potent inhibition of NFAT activation and T cell cytokine production by novel low molecular weight pyrazole compounds. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 48118-48126.
- Trushin SA, Pennington KN, Algeciras-Schimnich A und Paya CV** (1999) Protein kinase C and CaN synergize to activate I $\kappa$ B kinase and NF- $\kappa$ B in T lymphocytes. *Journal of Biological Chemistry* **274**, 22923-31.
- Tso WW und Lee CS** (1982) Lactate dehydrogenase-X: an isozyme particularly sensitive to gossypol inhibition. *International Journal of Andrology* **5**, 205-9.

**Tuszynski GP und Cossu G** (1984) Differential cytotoxic effect of gossypol on human melanoma, colon carcinoma, and other tissue culture cell lines. *Cancer Research* **44**, 768-71.

**Van Poznak C, Seidman AD, Reidenberg MM, Moasser MM, Sklarin N, Van Zee K, Borgen P, Gollub M, Bacotti D und Yao TJ** (2001) Oral gossypol in the treatment of patients with refractory metastatic breast cancer: A phase I/II clinical trial. *Breast Cancer Research & Treatment* **66**, 239-248.

**van Rijthoven AW, Dijkmans BA, Goei The HS, Hermans J, Montnor-Beckers ZL, Jacobs PC und Cats A** (1986) Cyclosporin treatment for rheumatoid arthritis: a placebo controlled, double blind, multicentre study. *Annals of the Rheumatic Diseases* **45**, 726-31.

**Vander Jagt DL, Deck LM und Royer RE** (2000) Gossypol: Prototype of inhibitors targeted to dinucleotide folds. *Current Medicinal Chemistry* **7**, 479-498.

**Villafranca JE, Kissinger CR und Parge HE** (1996) Protein serine/threonine phosphatases. *Current Opinion in Biotechnology* **7**, 397-402.

**Waelkens E, Goris J, Di Salvo J und Merlevede W** (1984) Inhibitor-1 phosphatase activity in vascular smooth muscle. *Biochemical & Biophysical Research Communications* **120**, 397-404.

**Wang TW, Donahoe PK und Zervos AS** (1994) Specific interaction of type I receptors of the TGF-beta family with the immunophilin FKBP-12. *Science* **265**, 674-676.

**Wang BS, Heacock EH, Collins KH, Hutchinson IF, Tilney NL und Mannick JA** (1981) Suppressive effects of cyclosporin A on the induction of alloreactivity *in vitro* and *in vivo*. *Journal of Immunology* **127**, 89-93.

**Wang X, Culotta VC und Klee CB** (1996) Superoxide dismutase protects CaN from inactivation. *Nature* **383**, 434-7.

**Wang X, Diener K, Tan TH und Yao ZB** (1998) MAPKKK6, a novel mitogen-activated protein kinase kinase kinase, that associates with MAPKKK5. *Biochemical & Biophysical Research Communications* **253**, 33-37.

**Waskiewicz AJ, Flynn A, Proud CG und Cooper JA** (1997) Mitogen-activated protein kinases activate the serine/threonine kinases Mnk1 and Mnk2. *EMBO Journal* **16**, 1909-20.

**Weinblatt ME, Coblyn JS, Fraser PA, Anderson RJ, Spragg J, Trentham DE und Austen KF** (1987) Cyclosporin A treatment of refractory rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism* **30**, 11-7.

**Weiss A und Littman DR** (1994) Signal transduction by lymphocyte antigen receptors. *Cell* **76**, 263-74.

**Wenzel-Seifert K, Grunbaum L und Seifert R** (1991) Differential inhibition of human neutrophil activation by cyclosporins A, D, and H. Cyclosporin H is a potent and effective inhibitor of formyl peptide-induced superoxide formation. *Journal of Immunology* **147**, 1940-6.

**Wenzel-Seifert K und Seifert R** (1993) Cyclosporin H is a potent and selective formyl peptide receptor antagonist. Comparison with N-t-butoxycarbonyl-L-phenylalanyl-L-leucyl-L-phenylalanyl-L-leucyl-L-phenylalanine and cyclosporins A, B, C, D, and E. *Journal of Immunology* **150**, 4591-9.

**Wenzel-Seifert K, Hurt CM und Seifert R** (1998) High constitutive activity of the human formyl peptide receptor. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 24181-9.

**Wera S und Hemmings BA** (1995) Serine/threonine protein phosphatases. *Biochemical Journal* **311**, 17-29.

- Werlen G, Jacinto E, Xia Y und Karin M** (1998) CaN preferentially synergizes with PKC-theta to activate JNK and IL-2 promoter in T lymphocytes. *EMBO Journal* **17**, 3101-11.
- Wesselborg S, Fruman DA, Sagoo JK, Bierer BE und Burakoff SJ** (1996) Identification of a physical interaction between CaN and nuclear factor of activated T cells (NFATp). *Journal of Biological Chemistry* **271**, 1274-7.
- Winkler KE, Swenson KI, Kornbluth S und Means AR** (2000) Requirement of the prolyl isomerase Pin1 for the replication checkpoint. *Science* **287**, 1644-1647.
- Wisdom R** (1999) AP-1: One switch for many signals. *Experimental Cell Research* **253**, 180-185.
- Wolvetang EJ, Larm JA, Moutsoulas P und Lawen A** (1996) Apoptosis induced by inhibitors of the plasma membrane NADH-oxidase involves Bcl-2 and CaN. *Cell Growth & Differentiation* **7**, 1315-25.
- Xia Y, Wu ZG, Su B, Murray B und Karin M** (1998) JNKK1 organizes a MAP kinase module through specific and sequential interactions with upstream and downstream components mediated by its amino-terminal extension. *Genes & Development* **12**, 3369-3381.
- Xiao DM, Zhou WH, Zhang YH, Wang XL, Zhu B, Zhang JB, Yang GD und Chen HC** (1993) Comparison between the effects of (-)- and (+)-gossypol on protein kinase C and protein kinase A. *Yao Hsueh Hsueh Pao - Acta Pharmaceutica Sinica* **28**, 494-8.
- Xu X, Raber J, Yang DS, Su B und Mucke L** (1997) Dynamic regulation of c-Jun N-terminal kinase activity in mouse brain by environmental stimuli. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**, 12655-12660.
- Yang SD, Tallant EA und Cheung WY** (1982) CaN is a calmodulin-dependent protein phosphatase. *Biochemical & Biophysical Research Communications* **106**, 1419-25.
- Yanisch-Perron C, Vieira J und Messing J** (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**, 103-19.
- Ye WS, Liang JC und Hsu TC** (1983) Toxicity of a male contraceptive, gossypol, in mammalian cell cultures. *In Vitro* **19**, 53-7.
- Yu BZ, Rogers J, Ranadive G, Baker S, Wilton DC, Apitz-Castro R und Jain MK** (1997a) Gossypol modification of Ala-1 of secreted phospholipase A2: a probe for the kinetic effects of sulfate glycoconjugates. *Biochemistry* **36**, 12400-11.
- Yu L, Golbeck J, Yao J und Rusnak F** (1997b) Spectroscopic and enzymatic characterization of the active site dinuclear metal center of CaN: implications for a mechanistic role. *Biochemistry* **36**, 10727-34.
- Zabel U, Henkel T, Silva MS und Baeuerle PA** (1993) Nuclear uptake control of NF-kappa B by MAD-3, an I kappa B protein present in the nucleus. *EMBO Journal* **12**, 201-11.
- Zhang LH und Liu JO** (2001) Sanglifehrin A, a novel cyclophilin-binding immunosuppressant, inhibits IL-2-dependent T cell proliferation at the G(1) phase of the cell cycle. *Journal of Immunology* **166**, 5611-5618.
- Zhang LH, Youn HD und Liu JO** (2001) Inhibition of cell cycle progression by the novel cyclophilin ligand sanglifehrin A is mediated through the NF kappa B-dependent activation of p53. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 43534-43540.
- Zheng CF und Guan KL** (1994) Activation of MEK family kinases requires phosphorylation of two conserved Ser/Thr residues. *EMBO Journal* **13**, 1123-31.

**Zhu D, Cardenas ME und Heitman J** (1995) Myristoylation of CaN B is not required for function or interaction with immunophilin-immunosuppressant complexes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry* **270**, 24831-8.

**Zhu J und McKeon F** (1999) NF-AT activation requires suppression of Crm1-dependent export by CaN. *Nature* **398**, 256-60.

**Zhu J, Shibasaki F, Price R, Guillemot JC, Yano T, Dotsch V, Wagner G, Ferrara P und McKeon F** (1998a) Intramolecular masking of nuclear import signal on NF-AT4 by casein kinase I and MEKK1. *Cell* **93**, 851-61.

**Zhu T, Goh EL, LeRoith D und Lobie PE** (1998b) Growth hormone stimulates the formation of a multiprotein signaling complex involving p130(Cas) and CrkII. Resultant activation of c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase (JNK/SAPK). *Journal of Biological Chemistry* **273**, 33864-75.

**Ziegler K und Frimmer M** (1986) Identification of cyclosporin binding sites in rat liver plasma membranes, isolated hepatocytes, and hepatoma cells by photoaffinity labeling using [<sup>3</sup>H]cyclosporin-diaziridine. *Biochimica et Biophysica Acta* **855**, 147-56.

**Ziegler K, Frimmer M, Fritzsche G und Koepsell H** (1990) Cyclosporin binding to a protein component of the renal Na(+)-D-glucose cotransporter. *Journal of Biological Chemistry* **265**, 3270-7.



## Lebenslauf

### persönliche Daten:

Name: Frank Erdmann  
geboren am: 30.08.1971 in Merseburg  
Familienstand: ledig

### Schulbildung:

Sept. 1978 bis Jul. 1988 Allgemeinbildende Polytechnische Oberschule in Merseburg  
Abschluß: Mittlere Reife (Jun. 1988)

Sept. 1988 bis Jun. 1991 Abiturklasse an der Berufsschule Leuna  
Abschluß: Abitur (Jun. 1991)

### Berufsausbildung:

Sept. 1988 bis Jul. 1992 Lehre zum Energieelektroniker an der Berufsschule Leuna  
Abschluß: Energieelektroniker (Jul. 1992)

### Zivildienst:

Okt. 1992 bis Dez. 1993 Deutsche Rote Kreuz, Kreisverband Merseburg  
Abschluß: Rettungssanitäter (Aug. 1998)

### akademische Bildung:

Sept. 1993 bis Jul. 1998 Studium der Biochemie am der Martin-Luther-Universität  
Halle -Wittenberg

Jun. 1997 bis Jul. 1998 Anfertigung einer Diplomarbeit mit dem Thema:  
*„Identifizierung endogener Liganden von humanen  
Cyclophilinen mit Hilfe affinitätschromatographischer und  
massenspektrometrischer Techniken“*  
in der MPG-Forschungsstelle für Enzymologie der  
Proteinfaltung Halle

Abschluß: Diplom-Biochemiker (Jul. 1998)

seit Sep. 1998 Anfertigung einer Promotionsarbeit in der  
MPG-Forschungsstelle für Enzymologie der Proteinfaltung Halle

## Danksagung

Hiermit möchte ich mich recht herzlich bei all denen bedanken, die etwas zu dieser Arbeit direkt oder indirekt beigetragen habe.

Ganz besonders danke ich Herrn Prof. Fischer für die Überlassung dieser interessanten Aufgabenstellung und für die stete Diskussionsbereitschaft trotz seines vollen Terminkalenders. Frau Dr. Ria Baumgraß bin ich dankbar für die große Hilfe bei der Einarbeitung in diese Thematik und für ihre Vorarbeiten, ohne die diese Arbeit nicht entstanden wäre. Mit Rat und Tat stand sie mir fortwährend zur Seite. Dem Direktor Herrn Prof. Radbruch danke ich für die freundliche Aufnahme am Deutschen Rheuma-Forschungszentrum in Berlin und der Möglichkeit mehrerer Arbeitsaufenthalte. Unseren Peptid-Chemikern, insbesondere Herrn Dr. Jahreis und Herrn Dipl.-Chem. Mario Drewello, danke ich für die Synthese und Aufreinigung der zahlreichen Peptide. Frau Dr. Hernandez-Alvarez gilt mein Dank für die vielen wertvollen Mobi-Tips, die mir das berufliche Leben leichter machten. Aber ganz besonders möchte ich mich bei Frau Heidler für ihre sehr gewissenhafte und engagierte (Zu-)Arbeit bedanken und für die Unterweisung in der Kultivierung von Zell-Linien. Allen früheren und jetzigen Mitarbeitern der MPG-Forschungsstelle danke ich für das angenehme Arbeitsklima.

Der „Besatzung“ unseres Labors A 1.31 danke ich für die vielen lebhaften Stunden der vergangenen Jahre und für den Spaß, den wir oft zusammen hatten.

Der meiste Dank gilt aber meiner Familie, die mich in der ganzen Zeit sehr unterstützt und nach so manchem Tiefschlag wieder aufgebaut hat. Außerdem hat sie mir wenn nötig „den Rücken freigehalten“, so daß ich mich voll der Arbeit widmen konnte.

## **Selbständigkeitserklärung**

Hiermit erkläre ich, daß ich diese Arbeit selbständig und nur unter Benutzung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel erstellt habe. Ich versichere weiterhin, daß alle wörtlich oder inhaltlich aus anderen Werken entnommenen Stellen als solche gekennzeichnet wurden.

Halle,