

**Medizinische Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg**

**Einfluss der katalytischen Untereinheit von Calcineurin auf Signalwege und Funktion in  
Gefäßen**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Doktorgrades für Medizinwissenschaften  
doctor rerum medicarum (Dr. rer. med.)

für das Fachgebiet

medizinische Physiologie

vorgelegt

der Medizinischen Fakultät  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Frau Conny Köhler

geb. am: 03.04.1986 in Leipzig

Betreuerin:

Prof. Dr. Dr. C. Grossmann, Julius-Bernstein Institut für Physiologie

Gutachter/Gutachterin:

Ort:

1. PU U. Gergs

2. Prof. S. Rohrbach

Gießen

16.06.2020

02.03.2021

## Referat

In der vorgelegten Dissertation wurde der Einfluss der katalytischen  $\beta$ -Untereinheit von Calcineurin (PPP3CB) hinsichtlich ihrer Signalwege und Funktion in Gefäßen, anhand eines transgenen PPP3CB Knockout Mausmodells, untersucht. Bisher war bekannt, dass Calcineurin bei der Entstehung kardialer Hypertrophie über Stimuli, wie beispielsweise Angiotensin II, eine wichtige Rolle einnimmt. Im Mausmodell konnte eine kardiale Hypertrophie durch Verwendung von Calcineurin Inhibitoren verhindert werden. Es ist jedoch wenig über den Effekt von PPP3C auf das vaskuläre System bekannt. Im Rahmen der basalen Charakterisierung von PPP3CB Knockout Mäusen wurden cDNA und Proteinlysate aus glatten Gefäßmuskelzellen (VSMCs) und der murinen Aorta, zur Quantifizierung mittels qPCR und Western Blot, hergestellt. Basal sind das Protein als auch das Transkript von PPP3CB in VSMCs und in der Aorta aus PPP3CB KO Tieren nicht nachweisbar. In VSMCs aus der Aorta von PPP3CB KO Mäusen wurde eine reduzierte Expression des Entzündungsmarkers PAI-1 detektiert, was eine erhöhte Neigung zur Thrombenbildung vermuten lässt. Der Nachweis von Calcineurin abhängigen Transkriptionsfaktoren in Aortenlysaten mittels Western Blot zeigte eine signifikant reduzierte NFaT4-Proteinexpression. Die Inhibierung des Calcineurin-Interaktionspartners NFaT4 könnte eine Hypertrophieentwicklung verhindern. Zur weiteren Charakterisierung von VSMCs wurde die Caspaseaktivität, als Marker für Apoptose, unter verschiedenen Stimuli gemessen. Bei Inkubation von VSMCs mit Vehikel, 250  $\mu$ M und 500  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, besaßen VSMCs aus PPP3CB KO Mäusen eine marginal reduzierte Laktatdehydrogenase (LDH)-Aktivität. Für die Untersuchung der schädigenden Wirkung von Angiotensin II wurde PPP3CB KO Tieren akut, mittels Millar-Katheterisierung und chronisch über osmotische Minipumpen, Angiotensin II appliziert. Bei akuter Gabe von Ang II zeigten PPP3CB KO Mäuse einen geringeren Anstieg des systolischen Blutdrucks, im Vergleich zu WT Tieren. Im Rahmen der Langzeit-Blutdruckmessung war in männlichen PPP3CB KO Mäusen ein geringerer Anstieg des systolischen Blutdrucks, im Vergleich zu WT, messbar. In weiblichen PPP3CB Mäusen führte Angiotensin II zu einem geringeren Blutdruckanstieg als bei männlichen Tieren, jedoch gab es keine Unterschiede zwischen WT und KO Mäusen. Anschließend erfolgte die Entnahme der Aorten beider Versuchsgruppen und die Anfertigung von Paraffinschnitten, die nach Sirius-Red Färbung quantifiziert wurden. Die Gabe von Angiotensin II führte in der Aorta von männlichen PPP3CB WT Mäusen zu vaskulärem Remodeling. Die Wanddicke, Lumen- und Mediafläche von Aorten aus PPP3CB KO Tieren blieben, im Vergleich zur WT-Gruppe, unverändert. In weiblichen PPP3CB WT Tieren nahm unter Einfluss von Ang II das Verhältnis von Mediafläche zu Lumenfläche, aufgrund eines kleineren Lumens, zu. PPP3CB KO Mäuse wiesen im Illumina bead array unter chronischem Einfluss von Ang II, im Vergleich zu WT Tieren, keinen Anstieg der Expression von Proteinbindung-assoziierten Genen wie beispielsweise Col4a1, Col4a2 und Col18a1, auf. Der Knockout von PPP3CB führte in männlichen PPP3CB KO Mäusen zu keinem Angiotensin II induzierten Bluthochdruck und vaskulärem Remodeling. Der Knockout erwies sich als förderlich.

Köhler, Conny: Einfluss der katalytischen  $\beta$ -Untereinheit von Calcineurin auf Signalwege und Funktion in Gefäßen, Halle (Saale), Univ., Med.Fak., Dissertation, 78 Seiten, 2020

# I Inhaltsverzeichnis

	Seite
<b>1. Einleitung</b>	
1.1. Charakterisierung der Protein-Phosphatase Calcineurin	5
1.1.1. Aufbau und Struktur	6
1.1.2. Interaktionspartner von Calcineurin	8
1.1.3. Calcineurinwirkung in Mausmodellen	10
1.2. Gefäßaufbau und funktionelle Eigenschaften	13
1.3. Vaskuläres Remodeling	15
1.3.1. Calcineurin und Angiotensin II induzierte Gefäßmorphologie	15
<b>2. Zielstellung - Charakterisierung von PPP3CB Knockout Mäusen</b>	16
<b>3. Methoden</b>	
3.1. Puffer	17
3.2. PCR und qPCR-Primer	18
3.3. Verwendete Lösungen und Chemikalien	19
3.4. Zellkultur	19
3.4.1. Isolation glatter Gefäßmuskelzellen aus der murinen Aorta	19
3.4.2. $\alpha$ -Smooth Muscle Actin ( $\alpha$ -SMA)-Immunfluoreszenzfärbung	20
3.5. molekularbiologische Methoden	20
3.5.1. Isolierung genomischer DNA	20
3.5.2. PCR– Neomycin und Wildtyp	20
3.5.3. Auftrennung der DNA-Fragmente mittels Agarose-Gelelektrophorese	21
3.5.4. RNA-Isolierung aus Organen, Gewebe und Zellen	22
3.5.5. Reverse Transkription und quantitative Real-time PCR (qPCR)	22
3.5.6. Transkriptom-Analyse mit Illumina-Bead Array	23
3.5.7. Proteinbiochemische Methoden	24
3.5.8. Proteinbestimmung (BCA)	24
3.5.9. SDS-Page und Western Blot	25
3.6. enzymatische Messungen	27
3.6.1. Caspasemessung	27
3.6.2. Lactatdehydrogenasemessung	27
3.6.3. Glucose-6-phosphatdehydrogenasemessung	28

3.7.	Tierexperimentelle Untersuchungen	28
3.7.1.	Tiermodell - PPP3CB KO Mäuse	28
3.7.2.	Implantation osmotischer Minipumpen	28
3.7.3.	Tail-cuff Messung des systolischen Blutdrucks mit chronischer Angiotensin II-Applikation	29
3.7.4.	Intravasale Blutdruckmessung	29
3.7.5.	Quantifizierung von Aortenringen mittels Sirius-Red-Färbung	30
3.8.	Statistik	30
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse</b>	
4.1.	Basale Charakterisierung von PPP3CB KO Mäusen	30
4.1.1.	Basales Trinkvolumen und Körpergewicht von PPP3CB WT und KO Mäusen	30
4.1.2.	Nachweis der mRNA von PPP3CA und PPP3CB in Organen von WT und KO Mäusen	31
4.1.3.	Basale mRNA-Expression von Fibrose-, Entzündungsmarkern in Aorten von PPP3CB WT und KO Mäusen	33
4.1.4.	Basale Protein-Expression von pCREB und CREB in Aortenlysaten von PPP3CB WT und KO Mäusen unter basalen Bedingungen	33
4.2.	Basale Untersuchungen von VSMCs aus Aorten von WT und KO Mäusen	34
4.2.1.	Morphologie von VSMCs aus Aorten von WT und KO Mäusen	34
4.2.2.	Nachweis von PPP3CA und PP3CB in der mRNA aus VSMCs von PPP3CB WT und KO Mäusen	35
4.2.3.	Nachweis von PPP3CA und PP3CB in Proteinlysaten aus VSMCs von PPP3CB WT und KO Mäusen	35
4.2.4.	Basaler Nachweis der Proteinexpression der Transkriptionsfaktoren pCREB und pNFaT4 in VSMCs	36
4.2.5.	Caspase- und Lactatdehydrogenase-Aktivität bei Stimulation von VSMCs	38
4.2.6.	Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase-Aktivität bei Stimulation von VSMCs	39
4.3.	Akute Angiotensin II-Stimulation in PPP3CB WT und KO Mäusen	40
4.3.1.	Basale Blutdruckparameter	40
4.3.2.	Blutdruckparameter von PPP3CB WT und KO Mäusen nach Vehikel-Applikation	41
4.3.3.	Blutdruckparameter von PPP3CB WT und KO Mäusen nach Angiotensin II-Applikation	42

4.4.	Chronische Angiotensin II-Stimulation von PPP3CB WT und KO Mäusen	44
4.4.1.	Trinkvolumen und Körpergewicht von PPP3CB WT und KO Mäusen bei chronischer Angiotensin II-Stimulation	44
4.4.2.	Organgewichte bei chronischer Angiotensin II-Stimulation von PPP3CB WT und KO Mäusen	45
4.4.3.	Verlauf des systolischen Blutdrucks von WT und KO Mäusen unter Einfluss chronischer Angiotensin II-Stimulation	46
4.4.4.	Gefäßveränderungen in Aorten von PPP3CB WT und KO Mäusen nach chronischer Angiotensin II-Applikation	47
4.4.5.	Geschlechtsspezifische Gefäßveränderungen von PPP3CB WT und KO Mäusen nach chronischer Angiotensin II Applikation	48
4.4.6.	Transkriptomanalyse von PPP3CB WT und KO Tieren mittels Illumina Bead array	50
<b>5.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>53</b>
5.1.	Vergleich der PPP3CB KO Mäuse mit WT unter basalen Bedingungen	54
5.2.	Vergleich von aVSMCs aus PPP3CB KO Mäusen mit WT unter basalen Bedingungen	56
5.3.	Vergleich von aVSMCs aus PPP3CB KO Mäusen mit WT bei Stimulation mit Vehikel, Wasserstoffperoxid, Forskolin und Aldosteron	57
5.4.	Vergleich der PPP3CB KO Mäuse mit WT bei Stimulation mit Angiotensin II	58
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>61</b>

## II Abkürzungsverzeichnis

AC-DEVD-AFC	Ac-Asp-Glu-Val-Asp-7-Amino-4-trifluoromethylcoumarin
AID	Autoinhibitorische Domäne
AT1R/AT2R	Angiotensin Rezeptor Typ 1/Typ 2
APS	Ammoniumperoxodisulfat
bp	Basenpaare
BCA	Bicinchoninsäure
C	C-terminales Ende
CaM	Calmodulin
CREB	<i>cAMP response element binding protein</i>
CsA	Cyclosporin A

DAPI	<i>4',6-diamidino-2-phenylindole</i>
ddH <sub>2</sub> O	Doppelt destilliertem Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Deoxynukleotid
DTT	Dithiothreitol
ECM	Extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N, N, N', N'-tetraessigsäure
EtOH	Ethanol
FK506	Calcineurininhibitor
FOS	AP-1 Transkriptionsfaktor
G6P	Glukose-6-Phosphat
G6PD	Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase
GPx	GSH-Peroxidase
GSH	Glutathion
GSSG	Glutathiondisulfid
HSP90	<i>Heat-shock-protein 90</i>
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
Jun	<i>c-Jun</i> N-terminale Kinase
kDa	Kilo-Dalton
KO	<i>Knockout</i>
LDH	Laktatdehydrogenase
MEF-2	<i>Myocyte enhancer factor 2</i>
N	N-terminales Ende
NADP	oxidiertes Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NADPH	reduziertes Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NFaT	<i>Nuclear factor of activated T-cells</i>
PPP3C	Katalytische Untereinheit von Calcineurin
PPP3R	Regulatorische Untereinheit von Calcineurin
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
6PG	6-Phosphogluconolacton
6PGDH	Phosphogluconatdehydrogenase
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RHR	Rel-Homologie Region
RNA	Ribonukleinsäure
PLC- $\gamma$	Phosphoinositid- <i>Phospholipase C</i>
ROX	X-Rhodamin

ROS	<i>Reactive oxygen species</i> , reaktive Sauerstoffspezies
RP	Reaktionspuffer
SDS	Sodium dodecylsulfate
SP1, SP2, SP3	Serin-Prolin-reiche Regionen
SRR1, SRR2	nukleäre Lokalisationssequenz Serin-reiche Regionen
$\alpha$ -SMA	<i><math>\alpha</math>-smooth muscle actin</i>
TAD	Transaktivierungsdomäne
TAE	Tris-Acetat- Ethylendiamintetraessigsäure
TBS	Tris buffered saline
TBST	Tris buffered saline + Tween 20
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TNF- $\alpha$	<i>Tumor Nekrose Faktor <math>\alpha</math></i>
Tgf- $\beta$	<i>Transforming growth factor <math>\beta</math></i>
UE	Untereinheit
VSMCs	<i>Vascular smooth muscle cells</i>
WT	Wildtyp

<b>III Literaturverzeichnis</b> .....	77
<b>IV Thesen</b> .....	75
<b>V Anhang</b> .....	85

## 1. Einleitung

Calcineurin (PPP3) ist eine Serin/Threonin Phosphatase, die aus einer katalytischen und regulatorischen Untereinheit besteht [1]. Die katalytischen Untereinheiten PPP3CA und PPP3CB werden ubiquitär exprimiert [2]. Durch Dephosphorylierung verschiedener Transkriptionsfaktoren, wie CREB und NF $\kappa$ T, ist Calcineurin in der Lage Immunantwort, Zellproliferation und die Zusammensetzung von extrazellulärer Matrix zu beeinflussen [3]. Molkenkin et al. und Bueno et al. beschrieben den Zusammenhang zwischen Calcineurin und der Entstehung kardialer Hypertrophie über Stimuli, wie beispielsweise Angiotensin II [4]. *In vivo* führt die Aktivierung des Calcineurin/NF $\kappa$ T-Signalweges zur Entwicklung von kardialer Hypertrophie in Mäuseherzen, deren Entstehung durch Inaktivierung von Calcineurin, unter Verwendung von Tacrolimus (FK506) und Cyclosporin A (CsA), verhindert werden kann [5]. Klinische Studien konnten durch Calcineurin-Antagonisten eine Reduktion der Fibrosierung in Lebergewebe feststellen [6]. Histologische Untersuchungen am Tiermodell konnten unter

Einsatz von Calcineurin Inhibitoren eine reduzierte Fibrosierung und Kollagenablagerung im Nierengewebe aufzeigen [7]. Calcineurin ist ebenfalls in der Lage Einfluss auf inflammatorische und apoptotische Signalgebung auf zellulärer Ebene zu nehmen. Es konnte auch gezeigt werden, dass eine verstärkte PPP3CB-Aktivierung proinflammatorische Signalgebung in glatten Gefäßmuskelzellen (VSMCs) und apoptotische Veränderungen in Kardiomyozyten vermittelt [8, 9]. Auch in anderen Zelltypen, wie in Neuronen des Hippocampus, konnte Calcineurin als Vermittler von apoptotischen Veränderungen beschrieben werden [10]. Es ist jedoch wenig über den Effekt von PPP3C auf vaskuläre Komponenten bekannt. Aus diesem Grund wurde in der vorgelegten Arbeit die Relevanz von PPP3CB auf Signalwege und Gefäßfunktionen anhand eines transgenen Mausmodells untersucht.

## 1.1. Charakterisierung der Protein-Phosphatase Calcineurin

### 1.1.1. Aufbau und Struktur

Calcineurin ist eine Calcium/Calmodulin-abhängige Serin/Threonin-Phosphatase. Das Heterodimer besteht aus einer Calmodulin-bindenden katalytischen (PPP3C, 57-61 kDa) und einer regulatorischen  $Ca^{2+}$ -bindenden Untereinheit (PPP3R, 16-19 kDa) [1]. Auf N-terminaler Seite befindet sich die Phosphatase-Domäne. Die katalytische Untereinheit wird durch drei Isoformen PPP3CA, PPP3CB und PPP3CC repräsentiert, während die regulatorische Untereinheit durch zwei Gene *PPP3R1* und *PPP3R2* kodiert wird. Die katalytischen Genprodukte von Calcineurin PPP3CA und PPP3CB werden in Verbindung mit dem regulatorischen Genprodukt von *PPP3R1* koexprimiert, *PPP3R2* hingegen zusammen mit PPP3CC [11, 12].

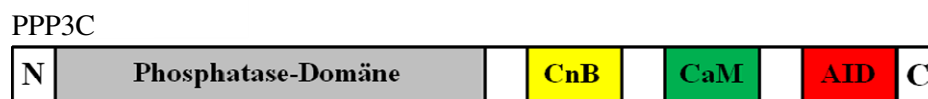


Abb. 1. Aufbau der von PPP3C. N: N-terminales Ende, CnB: PPP3R-Bindestelle, CaM: Calmodulin-Bindestelle, AID: Autoinhibitorische Domäne, C: C-terminales Ende

Die PPP3C Isoformen A und B werden ubiquitär exprimiert, PPP3CC hingegen in Hoden und Gehirn [13-17]. Der C- und N-Terminus weisen zwischen allen katalytischen Calcineurin-Isoformen die größte Variabilität auf, die Funktion dieser Termini ist jedoch unbekannt [1]. Die strukturelle Homologie des restlichen Proteins liegt bei 83-89 % [11].

Strukturell ist PPP3C durch die  $\beta$ -Sandwichfaltung, welche aus zwei zentralen  $\beta$ -Strängen besteht, charakterisiert. Diese sind wiederum von  $\alpha$ -Helices und weiteren  $\beta$ -Strängen umgeben [18, 19]. Die an Reste gebundenen Metallionen, wie Zink und Eisen, befinden sich im



katalytischen Zentrum von PPP3. Dieses Zentrum wird im inaktiven Zustand durch das Pseudosubstrat, der autoinhibitorischen Domäne (AID), blockiert [19-21]. Hervorzuheben ist, dass die katalytische Untereinheit eine Resistenz gegenüber Proteolyse aufweist, die regulatorische Domäne jedoch nicht [22, 23]. Auf subzellulärer Ebene befindet sich PPP3CB vorrangig im Zytosol, während PPP3CA in Zytosol und Nukelus mittels Immunohistochemie nachweisbar ist [24]. Von PPP3CA und PPP3CB existieren drei Spleißvarianten, welche eine hohe Sequenzhomologie aufweisen. Sie unterscheiden sich jedoch in ihrer Substrataffinität [1, 24]. Strukturell besitzt PPP3CB einen konservierten N-terminalen Polyprolinrest, während PPP3CC zusätzlich basische Reste am N-Terminus aufweist.

In Bezug auf die regulatorische Untereinheit ist bekannt, dass PPP3R durch seine hoch konservierte Struktur ein wichtiges stabilisierendes Strukturelement darstellt [25].

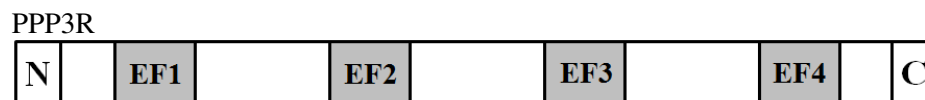


Abb. 2: Aufbau der regulatorischen Untereinheit von Calcineurin (PPP3R). N: N-terminales Ende, EF: EF-Handmotive für Calcium-Bindung, C: C-terminales Ende

PPP3R besteht aus vier EF-Handmotiven, die in der Lage sind  $\text{Ca}^{2+}$  zu binden [26]. Dabei werden zwei dieser Ionen mit geringer Affinität und zwei mit hoher Affinität an den EF-Handmotiven gebunden (Abb. 2) [27, 28]. Es konnte in Rinderprotein gezeigt werden, dass Myristinsäure, die kovalent an den N-terminalen Glycinrest von PPP3R gebunden ist, parallel zu den hydrophoben Seiten der N-terminalen Helix liegt. Gleichzeitig unterliegt der myristylierte N-terminale Teil von PPP3R einer nicht geordneten Struktur [29, 30]. PPP3R ist in der Lage, mittels Bindung von vier  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen durch EF-Handmotive, die Funktionalität von Calcineurin zu regulieren [31]. Bei geringer  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration befindet sich Calcineurin durch Blockade der AID im inaktiven Zustand [20]. Steigt die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration an, kommt es zur Bindung dieser Ionen an niederaffine  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindemotive von PPP3R. Dieser Prozess führt zu einer Konformationsänderung von Calcineurin, wodurch hochaffine  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen freie PPP3R-Bindestellen besetzen können. Dieser Vorgang ermöglicht die Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigem CaM an seine Binderegion von Calcineurin. Dadurch kommt es zu einer erneuten Konformationsänderung, welche die Autoinhibitorische Domäne (AID) aus dem aktiven Zentrum verschiebt, dessen sterische Inhibierung aufhebt und zur Aktivierung von PPP3C führt [11, 20].

### 1.1.2. Interaktionspartner von Calcineurin

Die am besten charakterisierte Gruppe von Interaktionspartnern und Zielgenen von Calcineurin sind *Nuclear factor of activated T-cells* Proteine (NFaT). Diese Gruppe von Transkriptionsfaktoren NFaT1 bis NFaT4 werden durch die Phosphatase Calcineurin reguliert [32-34]. NFaTs weisen als Interaktionsstelle eine PPP3C-abhängige Translokationsdomäne mit PPP3C Bindestellen auf, wie PxIxIxT am N-Terminus und LxVP am C-Terminus [35]. NFaT5 hingegen verfügt über eine trunke Homologie-Region (NHR) und besitzt keine Calcineurin (PPP3)-Bindestelle.

Die Interaktion von PPP3C und NFaTs ist im Nukleus lokalisiert. NFaTs spielen in der Induktion der Transkription diverser Gene eine wichtige Rolle, diese sind an einer Immunantwort beteiligt [32, 34]. Die intrazelluläre Aktivierung kann über Zellmembranrezeptoren wie Immunrezeptoren oder G-Protein gekoppelte Rezeptoren erfolgen [23, 32, 38]. Dabei wird  $Ca^{2+}$  aus dem endoplasmatischen Retikulum durch Proteinlipasen wie PLC- $\gamma$  freigesetzt, welches das Calcium/Calmodulin-abhängige Enzym PPP3C aktivieren kann, das anschließend in der Lage ist NFaTs zu stimulieren [36-41]. Verschiedene Tiermodell- und Zellstudien konnten zeigen, dass eine Calcineurin vermittelte NFaT-Aktivierung zur Entstehung von Hypertrophie beitragen kann [42-46]. In diesem Zusammenhang konnten Molkenin et. al im Myokard zeigen, dass beispielsweise der Transkriptionsfaktor NFaT3 Calcineurin-abhängig bei hypertrophen Prozessen aktiviert wird. Dabei wird nach  $Ca^{2+}$ -abhängiger Calcineurin-Aktivierung NFaT3 dephosphoryliert, transloziert in den Zellkern und nimmt Einfluss auf die Expression Hypertrophie-relevanter Gene [47] (Abb. 5). In transgenen Mäusen, die Calcineurin oder NFaT3 überexprimieren, wurden kardiale Hypertrophie, Fibrosierung bis hin zu Herzversagen nachgewiesen [45]. Dabei wird eine Reihe von NFaT-abhängigen Transkriptionsfaktoren aktiviert. Dazu gehören unter anderem Interleukin 2 (IL-2), Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) oder Interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), deren Expression in Blutproben durch Gabe von Calcineurin Inhibitoren vermindert werden konnte [48, 49]. Ebenfalls konnte in mesangialen Zellen der Niere gezeigt werden, dass Calcineurin über NFaT1 zu einer verstärkten Expression des Fibrosemarkergens Fibronectin (Fn-1) führt [50]. Bei Fn-1 handelt es sich um ein Extrazellulärmatrix (ECM) Glykoprotein, das als Anheftungsfaktor für Zell-Matrix oder Zell-Zell-Interaktionen dient [51]. In transgenen Calcineurin-Mäusen konnte im Zuge des Hypertrophie bedingten Herzversagens eine massive fokale Fibrosierung anhand der Ablagerung von Kollagenen in der linken ventrikulären Herzwand mittels Trichromfärbung nachgewiesen werden [45].

Ein weiterer wichtiger Calcineurin gesteuerter Transkriptionsfaktor ist das *c-AMP response element binding Protein* (CREB). CREB reguliert die Expression einer Vielzahl von Genen, welche zum Beispiel für die Entwicklung des zentralen Nervensystems und bei der ROS-

Abwehr eine relevante Rolle spielen [52]. CREB spielt eine wichtige Rolle während des Zellwachstums sowie während der Zellproliferation und weist antifibrotische und antioxidative Wirkungen auf [53, 54]. Zu Beginn der CREB-Aktivierung wird PPP3  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig durch Calmodulin (CaM) aktiviert, woraufhin die Phosphatase CREB dephosphoryliert und eine CREB-abhängige Änderung der Genexpression stattfindet. Es konnte gezeigt werden, dass eine Calcineurin vermittelte Dephosphorylierung von CREB zu einer reduzierten Glukose-6-phosphatdehydrogenase (G6PD)-Expression führt [53]. Dieses Enzym stellt einen entscheidenden Schritt in der ROS-Inaktivierung dar, welche zu Zellschädigung, wie Zelltod durch Nekrose, führt [55, 56]. ROS werden von der Zelle dauerhaft als metabolisches Nebenprodukt gebildet und aktivieren Angiotensin II-induzierte Signalwege, welche zu Hypertrophie von VSMCs führen [57]. G6PD jedoch sorgt für die Bereitstellung von NADPH, welches für die Aktivität der Glutathion (GSSG) Reduktase benötigt wird. Oxidiertes Glutathion (GSSG) entsteht bei der Abwehr von reaktiven Sauerstoffspezies (Abb. 3, 4). Nur die NADPH-abhängige Glutathion Reduktase kann GSSG wieder in die reduzierte Form (GSH) umwandeln, damit der Zelle für die ROS-Abwehr wieder ausreichende Mengen an GSH zur Verfügung stehen.

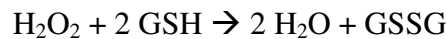


Abb. 3: Oxidation von GSH zu GSSG.  $\text{H}_2\text{O}_2$ : Wasserstoffperoxid, GSH: reduziertes Glutathion, GSSG: oxidiertes Glutathion,  $\text{H}_2\text{O}$ : Wasser



Abb. 4: Schema der zellulären ROS Abwehr. Das CREB-abhängige Enzym Glucose-6-phosphatdehydrogenase (G6PD) sorgt für den Erhalt der NADPH-abhängigen GSSG Reduktase-Aktivität, welche für die Bildung von reduziertem Glutathion (GSH) in der Abwehr gegen radikale Sauerstoffspezies notwendig ist. Die GSH-Peroxidase katalysiert diesen Prozess.

Calcineurin übt somit seine Regulationsfunktion von Transkriptionsfaktoren, wie NFAT oder CREB, über seine Dephosphorylierungsfunktion in Zellkern und Zytoplasma aus. Ein weiterer Interaktionspartner von PPP3 ist das *Monocyte chemoattractant protein-1* (MCP-1). Dabei handelt es sich um ein Peptid, das in Endothel- und glatten Gefäßmuskelzellen exprimiert wird. MCP-1 spielt eine entscheidende Rolle in der Entwicklung der Neointima. MCP-1 beeinflusst dabei die Stimulation der Einwanderung von Makrophagen in Blutgefäße [58-60]. Zur weiteren Wirkung von MCP-1 ist bekannt, dass es an der Entstehung von Gefäßerkrankungen beteiligt ist

[61]. Für die Interaktion von PPP3 und MCP-1 konnte gezeigt werden, dass PPP3 die Expression dieses Peptids in glatten Gefäßmuskelzellen steigern und Entzündungsprozesse in Gefäßen vermitteln kann [62]. Ebenfalls konnte der Einfluss von PPP3 auf die Ausbildung der Neointima in Gefäßen im Tiermodell über die Hochregulation von MCP-1 nach mechanischem Stress nachgewiesen werden [60, 62]. Dabei wiesen normotensive Ratten nach Verletzung der Femoralarterien und hypertensive Tiere eine Hochregulation der mRNA von PPP3 und MCP-1 auf.

### 1.1.3. Calcineurinwirkung in Mausmodellen

Calcineurin übernimmt eine Reihe physiologisch und pathophysiologisch relevanter Funktionen in einer Vielzahl von lebensnotwendigen Organen. Dazu gehört das Gehirn, in dessen Astrozyten nachgewiesen werden konnte, dass Calcineurin eine protektive Rolle nach Verletzung einnimmt. Chen et al. wiesen ein erhöhtes Infarktvolume im Gehirn von PPP3CB-defizienten Mäusen nach Verletzung nach [63]. Damit konnte eine kontroverse Rolle von PPP3 zwischen Zellvitalität nach Hirninfarkt und der bereits etablierten Rolle im neuronalen Zelltod (Apoptose) gezeigt werden [64]. In diesem Zusammenhang konnte ein protektiver PPP3CB Effekt, unabhängig von ihrer Phosphataseaktivität, bestätigt werden [63]. Andere Studien hingegen wiesen durch Inhibierung des PPP3/NF $\kappa$ B-Signalweges protektive Eigenschaften, bezogen auf Synapsenfunktion nach Hirnverletzung, im Rattenmodell nach [65]. In diesem Tiermodell wurde eine verstärkte NF $\kappa$ B Expression in Astrozyten und Axon-Dendrit-Schichten detektiert. Dabei führte eine Blockade des PPP3/NF $\kappa$ B-Signalweges zur Verhinderung eines verletzungsbedingten Verlustes der synaptischen Übertragung und zu einem reduzierten Risiko der Entwicklung einer lang-Zeit-Depression [65]. PPP3 ist in eine Reihe neuronaler und postnataler Entwicklungsprozesse involviert [66, 67]. Dazu gehören unter anderem die Ausprägung von Schizophrenie und eingeschränkter Gedächtnisleistung. Im Rahmen dieser Untersuchung konnte eine reduzierte mRNA-Expression von PPP3 im Hippocampus von Schizophrenie-Patienten detektiert werden [66].

Auch im Herz wird postnatales Wachstum und Herzklappenentwicklung Calcineurin abhängig gesteuert. Eine verminderte Calcineurinaktivität führt im Mausmodell zu einer Reduktion des ventrikulären Gewichtes sowie systolischer und diastolischer Dysfunktion, bis hin zu einer Mortalitätsrate von 100 % innerhalb der ersten sieben Lebensmonate. Während dieser Stadien lag eine hochgradige Fibrosierung und Thrombose im Atrium des Herzmuskels vor. Im Zuge der Untersuchung der Entwicklung der Herzklappen bei Neugeborenen konnte das Gen *Credl1* identifiziert werden, das über den PPP3/NF $\kappa$ B-Signalweg die Heranreifung der Herzklappen steuert [68-70]. Beispielsweise konnte gezeigt werden, dass Herzklappendefekte der Mäuse ohne *Credl1* (Cystein-Rich with EGF-Like Domains 1) zu einer mangelnden Sauerstoffversorgung des Körpers führten, weshalb der Mausembryo circa ab dem 11. Tag seine

Entwicklung einstellt [68]. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass Mäuse in Abwesenheit von NFaT1 keine reifen Herzklappen entwickeln. Der gleiche Effekt wurde in Tieren mit fehlender Calcineurinaktivität im Herzendothel nachgewiesen. Diese führte ebenfalls zu einer Lokalisation von NFaT im Zytoplasma embryonaler Herzen, während NFaT bei den Kontrolltieren im Nukleus lokalisiert war [68].

Die Bedeutung des Calcineurin/NFaT-Signalweges zeigt sich auch in der Entwicklung des Lymphsystems. In NFaT1/2 defizienten Tieren werden T-Lymphozyten während der Thymusentwicklung gebildet, weisen aber Defekte in der Zytokinproduktion und Zelldifferenzierung auf. Diese NFaT doppelt defizienten Mäuse besitzen T-Zellen, die jedoch keine Zytokine generieren können und damit einen Immundefekt aufweisen [71]. Auch die Deletion von NFaT2/3 oder PPP3 führte in Mäusen zu Augenlidentzündungen oder Vernarbungen der Lungenbläschen [72].

Auch für die Nieren konnte mit Hilfe eines Mausmodells gezeigt werden, dass PPP3 eine wichtige Rolle in deren Funktion und postnatalen Entwicklung einnimmt. Bei fehlender PPP3CA-Aktivität kommt es zu einem reduzierten Nierengewicht, verglichen mit WT-Mäusen [73]. Ebenfalls konnte in 18 Tage alten Tieren eine verzögerte Heranreifung nachgewiesen werden, welche sich durch wenig definierte medulläre Markstrahlen und einer verminderten Masse der Nierenrinde zeigte [73]. Auch in ihrer Funktionalität sind die Nieren dieser Tiere eingeschränkt. Beispielsweise konnte eine vermehrte Kollagenablagerung und eine reduzierte Glomeruligröße in diesen Mäusen nachgewiesen werden [73]. Wie bereits beschrieben nimmt Calcineurin eine wichtige physiologische Rolle in der Entwicklung ein, zugleich vermittelt Calcineurin bei inadäquater Aktivierung pathophysiologische Effekte.

Die Untereinheiten von Calcineurin besitzen eine Reihe spezifischer Funktionen im Organismus. Im Tiermodell konnte nachgewiesen werden, dass eine globale Deletion von PPP3R zu embryonaler Letalität führt [3]. Bereits eine reduzierte PPP3R1-Expression führt zu systolischer und diastolischer Dysfunktion, Fibrose und Herzversagen, was zu einer Sterblichkeitsrate der Nachkommen von 100 % bis zum siebten Lebensmonat führt [74]. Auch im Gehirn spielt PPP3R1 eine wichtige Rolle. Mäuse mit einer Vorderhirn spezifischen Deletion von PPP3R1 weisen einen veränderten Phänotyp, bezogen auf das Verhalten bis hin zu Schizophrenie und verminderter Gedächtnisleistung, auf [75, 76]. Die PPP3R2-Domäne wird in Spermatozyten exprimiert und spielt eine wichtige Rolle während der Spermatogenese, so dass bei Fehlen von PPP3R2 die Fertilität und damit die Fortpflanzung beeinträchtigt ist [77-80]. In transgenen Mäusen konnte bei Inaktivierung von PPP3R2 keine Fertilität und Trächtigkeit der Tiere, trotz intakter Oozyten, festgestellt werden [80]. In diesem Tiermodell führte PPP3R2 zu einer verminderten Motilität der Spermatozyten [80]. Es ist ebenfalls bekannt, dass bei Fehlen der PPP3R-Expression PPP3C instabil wird und rasch degradiert [12].

Eine Inaktivierung von PPP3CA hingegen führt im Mausmodell zwar zu keiner Entwicklungsstörung der Lymphozyten, jedoch weisen diese Tiere eine verminderte Antwort im Antigen-Assay auf [81]. Ebenfalls besitzen PPP3CA-defiziente Mäuse eine Akkumulation an hyperphosphorylierten tau Proteinen und weisen Veränderungen im Zytoskellat beispielsweise an Synapsen auf. Eine Langzeit-Weiterleitung synaptischer Signale ist in PPP3CA KO Tieren nicht möglich [82, 83]. Eine PPP3CB-Deletion hingegen bringt vitale und fertile Nachkommen hervor [3]. Aufgrund dessen wurde für die Deletion der Phosphatase-Aktivität von Calcineurin im Mausmodell die PPP3CB-Domäne inaktiviert.

Für Mäuse mit einer Deletion von PPP3CB wurde gezeigt, dass sich diese Tiere, bezogen auf den Phänotyp, nicht wesentlich von den WT Tieren unterscheiden [4, 81]. Jedoch wiesen acht Wochen alte männliche Mäuse ein reduziertes Körpergewicht von 10 % und eine um 12 % verminderte Herzgröße auf. Eine Erhöhung des Herzgewichtes, unter Einfluss von Angiotensin II, war in PPP3CB KO Tieren nicht vorhanden [4]. Eine durch Angiotensin induzierte Hypertrophie des Herzens konnte in PPP3CB defizienten Tieren, verglichen mit WT Mäusen, nicht nachgewiesen werden. Bei der Untersuchung von Myofibrillen aus Herzen von WT und KO Tieren konnte eine Zunahme der Querschnittsfläche festgestellt werden, welche in Myofibrillen von PPP3CB KO Mäusen, im Vergleich zu WT Tieren, vermindert war [4]. Des Weiteren wiesen 12 Wochen alte PPP3CB-defiziente Tiere eine reduzierte insulinabhängige Glukoseaufnahme auf, was auf eine verminderte Insulinsensitivität hindeutet. Bei acht Wochen alten Mäusen hingegen ließen sich keine Unterschiede in der Glukose- und Insulin-Responsivität finden. Dies ließ eine altersabhängige Insulinresistenz vermuten [84]. Ebenfalls wiesen PPP3CB KO Mäuse einen erhöhten Gehalt an Cholesterol und freien Fettsäuren auf. Acht Wochen alte PPP3CB KO Mäuse unterschieden sich dabei nicht von 12 Wochen alten Tieren. Möglicherweise tragen diese Hyperlipidämie-Merkmale zur altersabhängigen Insulin/Glukose-Dysregulation bei [84]. Wahrscheinlich führt der Überschuss an zirkulierenden freien Fettsäuren zu einer Akkumulation von Lipiden in nicht adipösen Gewebe, was zu veränderten Signalkaskaden und zellulärer Dysfunktion führen kann (Lipotoxizität) [85]. Diese beinhalten unter anderem eine verminderte Insulin-Rezeptor-Signalgebung oder Defekte der Glukosetransporter [85]. Im Pankreas führt eine Lipidablagerung in  $\beta$ -Zellen zu einer reduzierten Insulin-Sekretion, die Hyperglykämie oder Insulinresistenz bedingen kann [4]. Lipotoxizität kann weiterhin zu kardiovaskulären Erkrankungen, Leber- oder Nierenversagen führen [86, 87].

In KO Zellen aus der Milz konnte eine 9-fache Reduktion der Calcineurin-Phosphataseaktivität, verglichen mit dem WT, nachgewiesen werden. Die zytosolische NFAT-Proteinexpression in isolierten Thymozyten wies auf einen erhöhten NFAT Phosphorylierungsstatus in PPP3CB KO Mäusen aufgrund der fehlenden Phosphataseaktivität hin. Ebenfalls konnte eine reduzierte transkriptionelle NFAT-Aktivität nach Reperfusion im Tiermodell gezeigt werden [81]. Auch

wurde in adipösem Gewebe PPP3CB defizienter Mäuse gezeigt, dass das Targetgen CREB ebenfalls einem PKA-abhängigen erhöhten Phosphorylierungsgrad unterliegt [84]. Mittels Durchflusszytometrie konnten Defekte in der T-Zellentwicklung und deren Funktion in Thymus, Lymphknoten und PPP3CB-defizienten Mäusen nachgewiesen werden. Dabei wurde die T- und B-Zellen-Verteilung im Gewebe untersucht. Verglichen mit Kontrolltieren besaßen PPP3CB KO Mäuse eine signifikante Reduktion an T-Zellen, während die Anzahl der B-Zellen keine Unterschiede aufwies [81].

## 1.2. Gefäßaufbau und funktionelle Eigenschaften

Ziel dieser Arbeit ist die Untersuchung der Auswirkung der Deletion von PPP3CB auf Gefäße und deren Komponenten. Hierfür ist ein Verständnis für den Grundaufbau von Gefäßen und deren Funktionen notwendig. Die Wand größerer Blutgefäße weist drei verschiedene Schichten auf (Abb. 5). Diese bestehen aus der äußeren Tunica externa (Adventitia), die an das umliegende Gewebe angrenzt und aus Bindegewebszellen, die der Verankerung des Gefäßes in seiner Umgebung dienen. Die Adventitia besteht aus Bindegewebe, Fibroblasten und verschiedenen Zelltypen von Stammzellen mit dem Potential der Differenzierung zu Gefäßzellen oder nicht-vaskulären Zelltypen (z. B. Makrophagen, dendritische Zellen) [88, 89]. Als Begrenzung zur Tunica media dient die elastische Membrana elastica externa. Die Media stellt die mittlere Schicht des Gefäßes dar. Sie besteht aus glatten Gefäßmuskelzellen (*vascular smooth muscle cells* - VSMCs) und Kollagenen und ist für die Widerstandsfähigkeit des Gefäßes auf Druckbelastung verantwortlich. Ein weiterer Bestandteil der Media ist die Extrazellulärmatrix (ECM), die von VSMCs gebildet wird. Angrenzend an die Media befindet sich die Membrana elastica interna, welche die äußere Begrenzung der Tunica intima darstellt [89]. Die Intima bildet die innerste Schicht der Gefäßwand und besteht aus Endothelzellen, die dem Gas- oder Flüssigkeitsaustausch zwischen Blut und umliegenden Gewebe dienen [90].

Die in der Intima vorhandenen SMCs differenzieren zu einem nicht kontraktilem Phänotyp, während aus glatten SMCs mit Ursprung in der Media ein kontraktilem Phänotyp hervorgeht [91]. Im gesunden Gefäß repräsentieren VSMCs der Media einen hoch differenzierten Phänotyp und spielen eine wichtige Rolle in der Regulation von Blutdruck und Gefäßelastizität [92]. Speziell VSMCs von Widerstandsgefäßen sind in der Lage durch Kontraktion zur Aufrechterhaltung des Gefäßtonus beizutragen, welcher für Blutdruckregulation und der Verteilung des zirkulierenden Blutes verantwortlich ist [93]. Während der Entwicklungsphasen produzieren VSMCs Extrazellulärmatrix (EMC), die die Gefäßwand dazu befähigt der hohen Druckbelastung durch den Blutstrom entgegen zu wirken.

Abhängig von der Umgebung der VSMCs können diese durch einen Stimulus wie Hypertrophie und im Verlauf von arteriosklerotischen oder entzündlichen Prozessen beginnen, sich zu einem

proliferativen migrierenden Phänotyp zu entwickeln. Dieser weist einen geringen Anteil an kontraktilen Proteinen auf und ist in der Lage die Produktion von ECM, inflammatorische Signalkaskaden oder Kalzifizierung anzuregen. Den sklerotischen Phänotyp kennzeichnet eine gesteigerte Empfindlichkeit gegenüber Wachstumsfaktoren wie beispielsweise dem *Transforming growth factor  $\beta$*  (TGF- $\beta$ ). Dieser ist in der Lage beide Phänotypen, besonders den sklerotischen Phänotyp, zu beeinflussen [94]. Insgesamt konnte gezeigt werden, dass eine phänotypische Veränderung von VSMCs eine Reduktion der Transkription zur Folge hat [95].

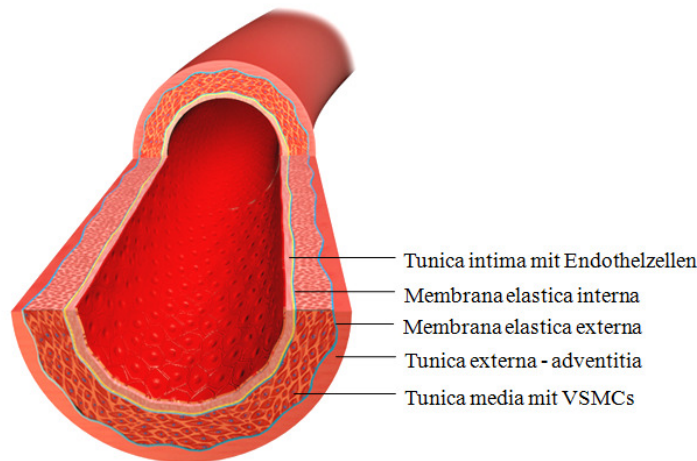


Abb. 5: Schematischer Aufbau eines Gefäßes ([https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Blausen\\_0052\\_Artery\\_NormalvPartially-BlockedVessel.png](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Blausen_0052_Artery_NormalvPartially-BlockedVessel.png)).

Stimuli für VSMCs können unter anderem Bluthochdruck oder eine massive Druckbelastung auf die ECM sein, wodurch die Zellen gestreckt werden und intrazelluläre Signale der Druckbelastung vermitteln. Die ECM Verbindung von Integrinen und dem Zytoskelet befähigt VSMCs auf Änderungen des intraluminalen Drucks zu reagieren und hypertrophe Remodelingprozesse anzuschalten [96]. Beispielsweise spielen der Kollagen I/IV Rezeptor  $\alpha1\beta1$  und Fibronectin eine wichtige Rolle in der Anpassung an mechanischen Stress der Zelle. In spontan hypertensiven Ratten konnte gezeigt werden, dass Zell-Matrix Verbindungen und phänotypische Veränderungen angestiegen sind [97]. Integrin  $\alpha1\beta1$  ist in der Lage die Hypertrophieantwort auf Angiotensin II induzierten Bluthochdruck zu kontrollieren [98]. Während dieses Prozesses wird eine Reihe von Transkriptionsfaktoren aktiviert, welche zu einer Veränderung des vaskulären Phänotyps und sinkender Kontraktilität der Zellen führt. Solche strukturellen Veränderungen werden zum Großteil von Hämodynamik aber auch von oxidativem Stress und vasoaktiven Substanzen (wie Angiotensin II oder Aldosteron) beeinflusst, die unter anderem zu Fibrosierung führen und die Relaxationseigenschaften von VSMCs verändern können [99-102]. Diese vaskuläre Versteifung geht mit massiver Kollagenablagerung,  $\alpha$ SMA-Adhäsionen, VSMC-Hypertrophie und Remodelingprozessen einher [100, 103].



### 1.3. Vaskuläres Remodeling

Die Anpassung der Gefäßwand an mechanische oder hämodynamische Stimuli wird als vaskuläres Remodeling bezeichnet. Remodeling ist beispielsweise durch Veränderungen in der Struktur und Funktion der Gefäßwand gekennzeichnet.

Auch kardiovaskuläre Erkrankungen gehen häufig mit arteriellen Remodeling Prozessen einher. Sowohl Umbauprozesse führen zu Veränderungen der Morphologie als auch der strukturellen Integrität der Gefäßwand. Dabei wird Remodeling in Gefäßdurchmesser verkleinerung (*inward remodeling*) und Gefäßdurchmesser vergrößerung (*outward remodeling*) unterschieden. Diese Umbauprozesse gehen mit einer Verringerung (hypotroph), Vergrößerung (hypertroph) oder keiner Veränderung (eutroph) der Wanddicke einher [104].

Zentrale Prozesse vaskulären Remodelings beinhalten die Proliferation von VSMCs, die Degradation und Rissbildung von Elastinfasern als auch Kalzifizierung und Ablagerung von ECM [105]. Obwohl ein Großteil der VSMCs der Gefäßwand einen kontraktilen Phänotyp zeigten, konnten Studien nachweisen, dass diese Zellen ebenfalls dazu fähig sind in einen migratorisch-proliferativen, sekretorischen oder knochenbildenden Phänotyp zu differenzieren [105]. Diese phänotypische Flexibilität von VSMCs ist nötig um Stimuli, wie zellulären Stress, entgegen zu wirken und führen zu einer veränderten Genexpression, die den Zellen eine Anpassung an aktuelle Bedingungen ermöglicht [106, 107]. Migratorische Stimuli hingegen führen zu einer Veränderung des Zytoskeletts von VSMCs. Dadurch lösen sich Zelladhäsionsmoleküle von der ECM und eine Aktindepolymerisation tritt ein. Diese befähigt die Zellen zu einem chemotaktischen Stimulus zu wandern. Diese Migration geht mit der Proliferation von VSMCs einher, die zu einer Hyperplasie führen kann, welche eine wichtige Ursache für eine Gefäßwandverdickung darstellen kann [108, 109]. Remodeling kann als Antwort auf verschiedene Stimuli, wie Blutdruckänderungen oder Entzündungsprozessen, auftreten. Stimuli, wie Angiotensin II, führen zu einer Dysfunktion von VSMCs und einem damit verbundenen strukturellen Remodeling. Ang II wird von VSMCs durch die Oberflächenrezeptoren AT1R und AT2R erkannt. Trotz der Bedeutung von Ang II und der veränderten Physiologie der VSMCs konnten Signalwege, im Zusammenhang mit Calcineurin besonders in Gefäßen, nicht vollständig aufgeklärt werden.

#### 1.3.1. Calcineurin- und Angiotensin II induzierte Gefäßmorphologie

Ang II ist ein Peptid, das seine Wirkung durch Interaktion mit dem Angiotensin Rezeptor Typ 1 vermittelt. Diese Interaktion führt zum Beispiel zur Kontraktion von Blutgefäßen [148]. Ein molekularer Mechanismus, der identifiziert werden konnte, beschreibt den Zusammenhang von Angiotensin II und dem downstream Effektormolekül Calcineurin, deren bekannte Substrate unter anderem zur Gruppe der NFaTs gehören [110, 111].

Der Calcineurin/Ang II Signalweg spielt eine wichtige Rolle bei der Signalgebung in VSMCs. Jedoch existieren kontroverse Publikationen über den Einfluss von NFaTs in der Weiterleitung Ang II induzierter Signale. Zum einen wurde durch Suzuki et al. gezeigt, dass in VSMCs die Ang II induzierte Hypertrophie durch den Transkriptionsfaktor *Myocyte enhancer factor-2* (MEF-2) abhängigen Signalweg vermittelt wird, nicht aber durch den PPP3/NFaT-Signalweg [112]. Andererseits konnte durch Esteban et al. (2004) gezeigt werden, dass PPP3 und der *Regulator of calcineurin 1* (RPPP31) Ang II-induzierte Migration von VSMCs vermitteln und zu pathologischen Remodelingprozessen der Gefäßwand führen kann [89]. Im Mausmodell konnte im Rahmen einer Gefäßschädigung durch Angioplastie eine Verdickung der Intima und eine Verkleinerung des Gefäßlumens nach Infusion von Ang II nachgewiesen werden. Durch Verwendung von Cyclosporin (CsA), das als Calcineurin-Inhibitor bekannt ist, konnten morphologische Veränderungen der Aorta, die Vergößerung des Aortendurchmessers und Kollagenablagerungen verhindert werden.

Ang II ist auch bekannt dafür reaktive Sauerstoffspezies (ROS)-abhängige Signalwege zu vermitteln, wodurch Gefäßschädigungen, infolge von Blutdruckerhöhung, hervorgerufen werden können [113-115]. ROS steigern die intrazelluläre  $Ca^{2+}$  Konzentration, die zur Erhöhung des Gefäßtonus beiträgt [113]. Ang II stimuliert dabei die NADPH-Oxidase, welche wiederum in Gefäßen ROS produziert [116, 117]. Freie Radikale wirken dabei inflammatorisch und stimulieren vaskuläre Permeabilität [118]. Inflammatorische Zellen, reich an NADPH-Oxidase, migrieren in die Gefäßwand und lösen lokal oxidativen Stress aus. Dieser trägt zur Fibrosierung des Gefäßes durch Kollagen- und Fibronectinablagerung bei und führt zur Versteifung des Gefäßes [119].

Für die Untersuchung der Rolle von Calcineurin auf Signalwege und Funktion in Gefäßen wurde in dieser Arbeit ein PPP3CB-Knockout Mausmodell eingesetzt. Dieses diente der Beurteilung einer möglichen protektiven Rolle des PPP3CB-Knockouts gegenüber vasoaktiven Substanzen wie Ang II und vaskulärem Remodeling.

## **2. Zielstellung**

Die Zielstellung der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der Rolle der katalytischen Untereinheit B von Calcineurin (PPP3CB) auf Signalwege und Gefäßfunktionen anhand eines PPP3CB KO Mausmodells.

Anhand zellbiologischer, molekularbiologischer und histologischer Methoden sollten mögliche Veränderungen von 6 Monate alten KO Mäusen, im Vergleich zu WT PPP3CB Mäusen, aufgezeigt werden. Desweiteren wurden vergleichende Untersuchungen der schädigenden Wirkung von Angiotensin II in PPP3CB KO und WT Mäusen durch akute und chronische Ang II-Applikation durchgeführt. Da bekannt ist, dass männliche und weibliche Mäuse

unterschiedlich auf vasoaktive Substanzen wie Ang II reagieren können, wurden beide Geschlechter in der Analyse getrennt betrachtet. Dadurch ist eine Beurteilung der pathophysiologischen Bedeutung von PPP3C, besonders der katalytischen Untereinheit PPP3CB im Mausmodell basal und nach Angiotensin II-Applikation, möglich.

Die hieraus resultierenden Ergebnisse könnten neue Ansatzpunkte für spezifischere Therapiestrategien gegen PPP3CB/Ang II-induzierte Endorganschädigungen des renokardiovaskulären Systems aufzeigen.

### 3. Methoden

#### 3.1 Puffer

Tabelle 1: Lysepuffer (LP)

<b>Puffer</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Caspase-LP	10 mM Tris; 100 mM NaCl; 1 mM EDTA; 0,01 % Triton, pH 7.5
RIPA Puffer	150 mM NaCl; 10 mM Tris pH 7.4; 1 % Nonidet P-40; 0.1% SDS; 1 % Natriumdeoxycholate; 0.1 % Triton X-100; Proteasehemmer-Cocktail; 1 mM EDTA, 184 mg/l Natriumorthovanadat, pH 7.4
LDH-LP:MOPS-Triton	50 mM Tris; 1mM MgCl <sub>2</sub> ; pH 8.1

Tabelle 2: Western Blot Puffer

<b>Puffer</b>	<b>Zusammensetzung</b>
10x Laempuffer (Lämmli)	25 mM Trizma Base; 3,5 mM SDS; 22,7 mM Glycin
10x Transferpuffer	25 mM Trizma Base; 192 mM Glycin; 20 % Methanol; H <sub>2</sub> O
2x Laemmli-Puffer	0,5 mM Tris-HCl; pH 6; 4 % SDS; 10 % 2-Mercaptoethanol; 20 % Glycerol; 0,01 % Bromphenolblau

Tabelle 3: Elektrophoresepuffer

<b>Puffer</b>	<b>Zusammensetzung</b>
6 x DNA Ladepuffer	10 mM Tris-HCl (pH 7.6); 0,03 % Bromphenolblau; 0.03 % Xylencyaol; 60 % Glycerol; 60 mM EDTA; Firma: peqLab
10 x TAE	0,4 M Tris; 0,5 M EDTA, pH 8.0; 11,5 mM Eisessig-Essigsäure

Tabelle 4: Waschpuffer

Puffer	Zusammensetzung
PBS	13,7 mM NaCl; 0,27 mM KCl; 0,81 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O; 0,15 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
TBS/Tween 20	20 mM Tris; 140 mM NaCl; 0,05% Tween 20
10 x TBS	170 mM Tris-HCl; 30 mM Tris Base; 1,4 M NaCl; pH 7,6

Tabelle 5: Inkubationspuffer

Puffer	Zusammensetzung
Reaktionspuffer-Caspase	5x RP: 50 mM PIPES; 10 mM EDTA; 0,5 % CHAPS; pH 7,4; 1x RP: 400 µl 5xRP; 10 µl 1M DTT; 590 µl H <sub>2</sub> O
LDH-Puffer	10 ml HEPES- Ringer (100 mM; pH 7,4); 1,42 mg NADH; 1,1 mg Pyruvat
HEPES-Ringer-Lactat	122,5 mM NaCl; 5,4 mM KCl; 0,8 mM MgCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O; 1,2 mM CaCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O; 1mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O; 5,5 mM Glucose; 10 mM HEPES; + Heparin und 2 % BSA
G6PD-Puffer	50 mM Tris; 1 mM MgCl <sub>2</sub> ; pH 8.1

Tabelle 6: Medien

Medium	Zusammensetzung
DMEM/HAM's F12	Plusmedium enthält folgende Zusätze: 5 mg/l Humanes Apo-Transferrin, 5 mg/l Insulin, 36 µg/l Hydrocortison, 5 µg/l Natriumselenit, 10 µg/l EGF, 10 % FCS, 1 % Penicillin/Streptomycin, 1,4 g/l Glucose - Biochrom/Zusätze von Sigma

### 3.2. PCR und qPCR-Primer

Tabelle 7: verwendete Primer

Primernamen	Sequenz sense	Sequenz antisense
18S	GTAACCCGTTGAACCCATT	CCATCCAATCGGTAGTAGCG
Col1a1	ACATGTTTCAGCTTTGTGGACC	TAGGCCATTGTGTATGCAGC
Col3a1	TGGTAGAAAGGACACAGAGGC	TCCAACCTCACCCTTAGCACC
Col4a1	ACAAAAGGGTGTATGCTGGAG	CTCCCTTTGTACCGTTGCAT
PAI-1	GACACCCTCAGCATGTTTCATC	AGGGTTGCACTAAACATGTCAG
TGFβ1	TTTGGAGCCTGGACACACAG	TGGACAACCTGCTCCACCTTG

Primername	Sequenz sense	Sequenz antisense
MCP-1	AGGTCCCTGTCATGCTTCTG	TCTGGACCCATTCTTCTTG
CCL-5	CCCTCACCATCATCCTCACT	TCCTTCGAGTGACAAACACG
IL-6	CCGGAGAGGAGACTTCACAG	TTCTGCAAGTGCATCATCGT
SPP-1	ATTTGCTTTTGCTGTTTGG	TGGCTATAGGATCTGGGTGC
Fn-1	TTAAGCTCACATGCCAGTGC	TCGTCATAGCACGTTGCTTC
WT-Primer	TTAGGCTATATTAAGCAATCTG	TCAGTAAGGTGTCTGCATTC
Neomycin/ Transgen-Primer	TGCCGAGAAAGTATCCATCAT GGCTGATGC	CAGAAGAAGCTCGTCAAGAAGG GGCGATAGAAGG

### 3.3. Verwendete Lösungen und Chemikalien

Tabelle 8: Lösungen und Chemikalien

Chemikalien	Hersteller	Chemikalien	Hersteller
4 % Paraformaldehyd	Roth	Isopropanol	Sigma
6-Phosphogluconat	Sigma	Ketamin/Xylazin	Pfizer/RompunRTS
Acrylamid	BioRad	KCL	Sigma
Agarose	Roth	$\beta$ -Mercaptoethanol	Sigma
Aldosteron	Sigma	Methanol	Sigma
Angiotensin II	Sigma	Milchpulver	Applichem
Ammoniumperoxodisulfat	Roth	Milchpulver	Sigma
Bromphenolblau	Serva	NADP <sup>+</sup>	Sigma
BSA	Sigma	NaCl	Roth
Chloroform	Sigma	Proteinase K	Sigma
Collagenase II	Worthington	Pikrinsäure	Roth
DEVD-AFC	Sigma	Rimadyl	Pfizer
DMSO	Sigma	SDS	Roth
Dnase I und Puffer	Invitrogen	steriles Wasser	Sigma
dNTPs	PeqLab	Taq-Polymerase	invitrogen
Entellan	Merck	TEMED	Sigma
Essigsäure	Roth	Tris-HCL	Applichem
Ethanol	96 %, 70% - Merck	Triton X-100	Sigma
Forskolin	Calbiochem	Trizol	Ambion
Glucose-6-phosphat	Sigma G7879	Trypsin	Sigma
humanes Insulin	Lilly	Xylol	Sigma
Isofluoran	Abbott		

### 3.4. Zellkultur

#### 3.4.1. Isolation glatter Gefäßmuskelzellen aus der murinen Aorta

Die entnommene murine Aorta wurde mit Hilfe von Pinzetten stumpf frei präpariert, von Geweberesten befreit und zerkleinert. Die Aortenstücke wurden in einem Glasröhrchen für 6 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> Begasung in einem Verdauansatz inkubiert. Dieser Ansatz enthielt

Kollagenase II (1,5 mg/ml), die in Minusmedium (ohne Zusätze) gelöst wurde. Nach Inkubation wurden zu jeder Aorta 5 ml DMEM/Ham's F12-Medium mit 10 % Serum gegeben und bei 300 x g für 5 min zentrifugiert. Dieser Schritt wurde erneut wiederholt, um die Kollagenase vollständig zu entfernen. Das Zellpellet wurde am Ende der Waschschrte in 1 ml DMEM/Ham's F12- Medium mit 10 % Serum gelöst und auf einer Amin-beschichteten 24-well Platte ausplattiert.

#### 3.4.2. $\alpha$ -Smooth Muscle Actin ( $\alpha$ -SMA) -Färbung

Für die Immunofärbung wurden zuerst die Objektträger mit FCS für 45 min beschichtet. Nach einem Waschschrte wurden 20  $\mu$ l serumhaltiges DMEM-Ham's F12 Medium dazu gegeben sowie 20  $\mu$ l Zellsuspension. Nach fünf Stunden Adhäsion der VSMCs bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> wurde der Objektträger mit DMEM-Ham's F12-Medium komplett bedeckt. Am Folgetag wurde das Medium abgesaugt und die Zellen für 60 min bei RT in 4 % Paraformaldehyd (PFA) in TBS fixiert. Nach einmaligem Waschen mit PBS wurden die Zellmembranen mit 0,2 % Triton in PBS für 10 min bei RT permeabilisiert. Zur Vermeidung unspezifischer Antikörperbindungen wurden die VSMCs mit 10 % FCS und 1 % BSA in PBS für 60 min blockiert. Danach erfolgten mehrere Waschschrte mit PBS. Die Inkubation des FITC-markierten Antikörpers ( $\alpha$ -SMA, Sigma, Clone 1A4, #F3777) erfolgte über Nacht bei 4 °C (Verdünnung 1:200). Zur Visualisierung der Zellkerne wurde DAPI verwendet. Die fixierten und gefärbten Zellen wurden anschließend mit Vectashield (Sigma) eingebettet und mit transparentem Nagellack versiegelt.

### 3.5. Molekularbiologische Methoden

#### 3.5.1. Isolierung genomischer DNA

Die Isolierung von DNA aus dem Schwanz der Maus erfolgte mittels KAPA Mouse Genotyping Hot Start Kit von Peqlab. Etwa 2 mm Gewebe des Mäuseschwanzes wurden mit 100  $\mu$ l KAPA Mastermix (für 100  $\mu$ l Ansatz: 2  $\mu$ l 1 U/ $\mu$ l Enzym + 10  $\mu$ l 10 x Extraktionspuffer + 88  $\mu$ l H<sub>2</sub>O) versetzt und für 10min bei 75 °C lysiert. Anschließend erfolgte eine Hitzeinaktivierung für 5 min bei 95 °C. Der Verdauansatz wurde gevortext und für die Gewinnung des DNA-haltigen Überstandes für 1 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Dieser Überstand wurde abgenommen und diente als Template für die Genotypisierungs-PCR.

#### 3.5.2. PCR– Neomycin und Wildtyp

Zur Identifizierung von WT und KO Tieren wurde die Polymerase-Kettenreaktion eingesetzt. Diese dient der Amplifikation eines definierten DNA Fragmentes aus dem WT-Gen oder der Neomycin-Kassette mittels Taq-Polymerase. Die PCR-Reaktionen wurden in einem Thermocycler (Biometra) mit beheiztem Deckel durchgeführt. Vor Verwendung der spezifischen Primer

wurden unter Einsatz von Gradienten-PCRs (50-68 °C) die Primer mit einem cDNA-Mix aus Herz, Leber, Niere und Aorta etabliert.

Folgender Standardansatz wurde für jede PCR angewendet:

2xKAPA2G Fast Hot Start Genotyping Mix	12,5 µl
25 mM MgCl <sub>2</sub>	0,5 µl
Primer (sense und antisense)	1,25 µl
DMSO	1,25 µl
H <sub>2</sub> O	7,25 µl
Template DNA	1 µl

PCR Programm für Neomycin-PCR:

Denaturierung	95 °C 5 min	
Denaturierung	95 °C 0,5 min	} 35 x
Anlagerung	64 °C 0,5 min	
Extension	72 °C 0,5 min	
Finale Extension	72 °C 5 min	
	10 °C ∞	

PCR Programm für Calcineurin-PCR:

Denaturierung	94 °C 3 min	
Denaturierung	94 °C 0,5 min	} 10x
Anlagerung	65 °C* 0,5 min	
Extension	72 °C 1 min	
	94 °C 0,5 min	} 31x
	52 °C 0,5 min	
	72 °C 0,5 min	
	72 °C 5 min	
	10 °C ∞	

\* Erniedrigung der Temperatur pro Zyklus um 0,5°C

### 3.5.3. Auftrennung der DNA-Fragmente mittels Agarose-Gelelektrophorese

Die verschiedenen PCR-Produkte wurden anschließend mit 6x Ladepuffer gemischt und in einem 1% igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Als Marker diente ein 1 kb Größenstandard (Peqlab). Als Laufpuffer diente 0.5-facher TAE-Puffer. Mit einer Spannung von 10 V/cm Gel wurden die Produkte aufgetrennt und mit Ethidiumbromid (EtBr Stammlösung 0,5 mg/ml) für 30 min gefärbt. Nach zwei Waschschritten erfolgte die Detektion der Banden mittels Transilluminator mit UV-Licht bei 355 nm (UVP BioDoc-It® Imaging Systems, Analytik Jena).

#### 3.5.4. RNA-Isolierung aus Organen, Gefäßen und Zellen

Die RNA-Isolierung aus Organen erfolgte mittels RNA-Isolationskit (invitex). Circa 30 mg eines Organs wurden mit zwei Metallkugeln in ein Reaktionsgefäß überführt, mit 300 µl RLT-Lysepuffer (invitex) mit  $\beta$ -Mercaptoethanol (1/100 1 M Volumen) versetzt und bei 50 Hz für 4 min im Dismembrator geschüttelt. Der Einsatz von  $\beta$ -Mercaptoethanol dient der Inaktivierung von RNasen, die durch Spaltung von intramolekularen Phosphodiesterbindungen RNAs abbauen. Anschließend wurden die Proben bei 13000 rpm für zwei Minuten zentrifugiert. Speziell für das Herz wurde der Überstand mit 20 mg/ml Proteinase K für 10 min bei 55 °C verdaut. Die RNA-Fällung erfolgte mit 0,5 Vol 96 % EtOH, das zum Überstand hinzu gegeben wurde. Dieses Gemisch wurde auf RTA-SpinFilter Säulen (Qiagen) gegeben und bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und der erste Waschschrift mit 500 µl Waschpuffer R1 durchgeführt. Es erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 10500 rpm für eine Minute. Anschließend wurden 700 µl des Waschpuffers R2 auf die Säule gegeben und bei 10500 rpm zentrifugiert. Dieser Schritt wurde einmal wiederholt, bevor die SpinFilter-Säulen für 5 min bei 12000 rpm zentrifugiert wurden. Die SpinFilter wurden in Rnase-freies Reaktionsgefäß überführt und die gewaschene RNA mit ddH<sub>2</sub>O eluiert. Die Isolierung von RNA aus murinen Organen und VSMCs erfolgte mittels Trizolmethode. Dabei werden Aorta und Herz mit 1 ml Trizol versetzt und bei 50 Hz für 4 min im Dismembrator geschüttelt. Für VSMCs war dieser Schritt nach Zugabe von Trizol nicht notwendig. Danach wurde das Gemisch mit 200 µl Chloroform pro ml Trizol versetzt, geschüttelt und für 15 min, 4 °C und 12000 x g zentrifugiert. Die RNA aus der Aorta in der oberen wässrigen Phase wurde mit 500 µl Isopropanol zur RNA-Fällung gemischt und 10 min bei 4 °C und 12000 x g für 5 min zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 70 %-igem Ethanol gewaschen, an der Luft getrocknet und in bidestilliertem Wasser gelöst. Das RNA-Pellet von VSMCs wurde bei 37 °C getrocknet und anschließend in 50 µl sterilem Wasser gelöst. Die Reinheit der RNA wurde mit Hilfe des Quotienten  $A_{260}/A_{280}$  bestimmt.

#### 3.5.5. Reverse Transkription und quantitative *Real-time* PCR (qPCR)

Diese Methode diente der Umschreibung von RNA in komplementäre DNA (cDNA) mit Hilfe von RNA-abhängigen DNA-Polymerasen, zum Beispiel der reversen Transkriptase. Das umgeschriebene Produkt kann dann für die qPCR eingesetzt werden. Zu Beginn wurde die vermessene RNA mit dem Enzym Dnase I verdaut. Damit können genomische DNA-Verunreinigungen beseitigt werden. Dafür wurden 1000 ng RNA in 8 µl H<sub>2</sub>O mit 1 µl 10x-DNase I-Reaktionspuffer, abhängig von der RNA Konzentration, mit 1 µl DNase I gemischt und für 10 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte eine Hitzeinaktivierung für 10 min bei 75 °C. Zu dem DNase I Verdau wurden 4 µl ddH<sub>2</sub>O gegeben und zu 2/3 und 1/3 aufgeteilt. Der



größere Volumenanteil wurde zur Umschreibung der RNA in cDNA eingesetzt (+RT), der 1/3 große Teil wurde als spezifische Negativkontrolle (-RT) für jede Probe, die ohne reverse Transkriptase inkubiert wurde, verwendet. Anschließend sind 25,7 µl Mastermix zu den plus RT und 10,13 µl Mastermix als Kontrolle jeder Probe zu den minus RT-Ansätzen gegeben worden.

	+ RT	-RT
H <sub>2</sub> O (Aqua Dest, Sigma)	16,2 µl	6,46 µl
5x first strand buffer	5,71 µl	2,29 µl
10 mM DTT	0,36 µl	0,14 µl
10 mM dNTP	1,43 µl	0,57 µl
40 U/µl RNase Out	0,71 µl	0,29 µl
0,3 µg/µl Random Primer	0,96 µl	0,38 µl
200 U/µl Reverse Transkriptase	0,36 µl	0 µl
RNA	10 µl	4 µl

Die quantitative real-time Polymerase-Ketten-Reaktion ermöglicht die Quantifizierung von DNA-Fragmenten mittels Target-spezifischer Primer (Tab. 7). Die Real-time Amplifikation erfolgte mit dem 7900HT Fast-Real-Time PCR System (Applied Biosystems) und SYBR Supermix (Invitrogen) und wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Folgender Ansatz wurde zu je 1 µl cDNA dazu gegeben:

2x Supermix	6,25 µl
Sense Primer (10 pmol/µl)	0,5 µl
Antisense Primer (10 pmol/µl)	0,5 µl
ROX (nicht interkalierend)	0,025 µl
H <sub>2</sub> O	4,23 µl

Die relative Expression der Ziel-RNA wurde mit der  $2^{\Delta\Delta Ct}$  Methode berechnet und auf 18S als Referenz normiert. Die dabei eingesetzten Primer wurden zuvor, in Bezug auf die optimale Annealing-Temperatur, etabliert. Jede Probe wurde dreifach bestimmt.

### 3.5.6. Transkriptom-Analyse mit Illumina-Bead Array

Bei dieser Methode handelt es sich um eine Microarray Technologie (BeadArray), die auf zufällig verteilten 3 µm großen Silica-Kugeln basiert. Diese befinden sich in den Vertiefungen der Silicaplatten, wo sich diese randomisiert verteilen. Jede dieser Vertiefungen verfügt über tausend Kopien von spezifischen Oligonukleotidsequenzen. Diese sind in 30-facher Ausführung

von insgesamt 24000 Partikeln auf jedem Array vorhanden und mit einem Farbstoff versehen [120]. Für die Identifizierung von Sequenzen einer Probe wird eine Hybridisierungsreaktion eingesetzt. Dabei binden die spezifischen Oligonukleotidsequenzen der beads, die mit Farbstoffen versehen sind, an komplementäre Sequenzen aus der Probe [121, 122]. Aus dieser Bindung resultiert eine grüne oder rote Färbung der Hybridisierungen und macht eine Detektion der Farbkodierung mittels CCD-Kamera möglich. Daraus können Rückschlüsse über die relative Intensität der Expression bestimmter Genabschnitte gezogen werden. Dieses Verfahren ermöglicht die Erstellung von Expressionsprofilen von einer Vielzahl an unterschiedlich stark exprimierten Genen [121]. RNA Proben aus murinen Aorten von WT und KO Tieren wurden für diese Untersuchung verwendet. Signifikant erhöht gebundene Transkripte wurden durch einen Grenzwert von 1,5 ermittelt. Eine signifikante Herabregulation wurde ab einem Wert von 0.5 bestimmt.

### 3.5.7. Proteinbiochemische Methoden

Für die Herstellung von Organlysaten wurden ca. 30 mg Organ in RIPA als Lysepuffer aufgenommen und mit zwei Metallkugeln versetzt und für 4 min bei 50 Hz im Dissmembrator geschüttelt. Für VSMCs war dieser Schritt nach Zugabe von RIPA nicht notwendig. Das Gemisch wurde anschließend 10 min bei 14000 g und 4°C zentrifugiert. Zur Herstellung von Zelllysaten wurden die Zellen in PBS gewaschen und abgelöst. Das nach Zentrifugation entstandene Zellpellet wurde mit 50 µl RIPA-Lysepuffer versetzt, mittels Ultraschall die Zellmembran aufgebrochen und 15 min zentrifugiert. Der proteinhaltige Überstand wurde in eine neues Reaktionsgefäß überführt und auf ein SDS-Gel geladen.

### 3.5.8. Proteinbestimmung (BCA)

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte mittels BCA Methode. Bei dieser Methode findet eine Reduktion von  $\text{Cu}^{2+}$  zu  $\text{Cu}^+$  durch Proteine in alkalischer Lösung (Biuret-Reaktion) statt. Anschließend erfolgt eine Chelatbildung von  $\text{Cu}^+$  mit zwei Molekülen Bichinonsäure, was zur Ausbildung einer violetten Färbung, abhängig von der Proteinkonzentration, führt. Der dabei gebildete Farbkomplex besitzt ein Absorptionsmaximum bei 562nm. Dazu wurden jeweils 2 µl Probe und 200 µl Nachweisreagens [50 Teile Reagens A (Thermo Scientific) und 4 % w/v  $\text{Cu}_2\text{SO}_4$ ] gemischt und für 30 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Jede Probe wurde doppelt bestimmt und die Extinktion bei 560 nm gemessen (Multiwell Counter, TePPP3 Infinite 2000). Für die Kalibrierung der erhaltenen Messwerte wurde eine BSA-Kalibrierkurve verwendet, die einen Konzentrationsbereich von 100 bis 1000 µg/ml abdeckt. 50 µg der zellulären Proteine wurden mit Ladepuffer (Lämmli) gemischt und für 10 min bei 60 °C denaturiert.

### 3.5.9. SDS-Page und Western Blot

Die Methode SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese dient der Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht. Die zuvor mit Ladepuffer denaturierten Polypeptidketten der Proteine binden an SDS. Dieses ist negativ geladen und ermöglicht die Wanderung im elektrischen Fluss Richtung Anode. Mittels dieser Acrylamidgele, die aus einem 6 % igem Sammelgel und einem 10 % igem Trenngel bestehen (Tab. 8), wurden die Proteine im Laufpuffer, entsprechend ihrer Größe, aufgetrennt. Die Auftrennung erfolgte im Sammelgel für 0.6 h mit 11 mA/Gel und im Trenngel für 1.5 h mit 20 mA/Gel. Als Größenstandard wurde der Proteinmarker PeqGold (PeqLab) auf das Gel geladen.

Tab. 9: Zusammensetzung der Polyacrylamidgele

<b>Bestandteil</b>	<b>6% Sammelgel</b>	<b>10% Trenngel</b>
0,5M Tris, pH 6.8	0,964 ml	1,88 ml
1,5M Tris, pH 8.8	625 µl	1,563 ml
Acrylamid:Bisacrylamid 26 : 0,7	576 µl	-
Acrylamid:Bisacrylamid 29,3 : 0,53	-	2,55 ml
10% SDS	25 µl	125 µl
10% APS	30 µl	75 µl
TEMED	20 µl	20 µl

Danach erfolgte ein Transfer der Proteine im Semidry-Blotting-Verfahren auf eine Nitrozellulosemembran. Dazu wurde das SDS-Gel auf der Membran positioniert und von jeweils zwei Filterpapieren oberhalb und unterhalb umschlossen. Aufgrund des Stromflusses werden die negativ geladenen Proteine aus dem Gel in Richtung Anode auf die Membran transferiert. Der Transfer der negativ geladenen Proteine erfolgte mit Biometrakammern bei  $2 \text{ mA/cm}^2$  für 1 bis 1,5 h. Die transferierten Proteine wurden mit Primärantikörpern markiert. Zur Vermeidung unspezifischer Antikörperbindung wurden die Proteinträgermembranen in 5% Milchpulver blockiert und mit Primärantikörper (5 % BSA in TBST, Tab. 10) über Nacht bei  $4^\circ\text{C}$  inkubiert. Nach mehreren Waschschrinen mit TBS wurde die Membran mit Merrettichperoxidase gekoppelten Sekundärantikörper (Tab. 11) in Blockierlösung für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden drei Waschschrine mit TBST durchgeführt. Die Detektion erfolgte mit einem chemilumineszenten Peroxidasesubstrat und die Visualisierung der Proteine mit dem ImageQuant-System (LAS 4000, GE Healthcare Life

Sciences). Die Quantifizierung der Bandenintensität der detektierten Proteine erfolgte mit der Software QuantityOne (BioRad). Dabei wird der Hintergrund der Proteinträgermembran definiert und von den zu vermessenden Bandenintensitäten der Proben abgezogen. War eine mehrfache Inkubation der Membranen mit Primärantikörpern nötig, erfolgte die Entfernung bereits gebundener Antikörper mit Restore-Western-Blot-Stripping-Puffer (Thermo Scientific). Als Ladekontrollen wurden entweder GAPDH oder HSP90 verwendet.

Tab. 10: eingesetzte Primärantikörper

<b>Primärantikörper</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Spezies</b>	<b>Proteingröße</b>	<b>Firma</b>
Anti-Calcineurin/PP2B A $\beta$ (detektiert auch A $\alpha$ )	1:500	Kaninchen, polyklonal	A $\beta$ : 62 kDa A $\alpha$ : 59 kDa	upstate
Anti-CREB	1:1000	Maus, monoklonal	40 kDa	Cell Signaling
Anti-phospho-CREB (Ser133)	1:1000	Kaninchen, monoklonal	43 kDa	Cell Signaling
Anti-GAPDH	1:1000	Kaninchen, monoklonal	37 kDa	Cell Signaling
Anti-HSP90	1:1000	Kaninchen, polyklonal	90 kDa	Cell Signaling
Anti-GAPDH	1:1000	Kaninchen, monoklonal	37 kDa	Cell Signaling
Anti-NFaT1	1:500	Kaninchen, polyklonal	120-140 kDa	Cell Signaling
Anti-NFaT2 (D15F1)	1:500	Kaninchen, monoklonal	120-140 kDa	Cell Signaling
Anti-NFaT3 (23E6)	1:500	Kaninchen, monoklonal	120-140 kDa	Cell Signaling
Anti-NFaT4	1:500	Kaninchen, polyklonal	120-140 kDa	Cell Signaling

Tab. 11: eingesetzte Sekundärantikörper

<b>Sekundärantikörper</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Spezies</b>	<b>Firma</b>
Sekundär-Maus	1:3000	anti-Maus	Cell Signaling
Sekundär- Kaninchen	1:3000	anti-Kaninchen	Cell Signaling

### 3.6. Enzymatische Messungen

#### 3.6.1. Caspase-messung

Das Apoptoseverhalten, der programmierte Zelltod, welcher kein Zellplasma freisetzt und keine Entzündungsreaktion hervorruft, wurde über die Umsetzung des Caspase-3-Substrates Asp-Glu-Val-Asp-7-amino-4-trifluoromethylcoumarin (AC-DEVC-AFC) gemessen. Das intrazelluläre Apoptoseenzym ist in der Lage AFC abzuspalten, dessen Fluoreszenz bei einer Emission von 505 nm gemessen wurde. Die AFC-Fluoreszenz korreliert mit der Enzymaktivität von Caspase-3. Je höher die Caspase-Aktivität ist desto mehr Zellen, die in den Zelltod übergehen, sterben ab, ohne dass dabei entzündliche Prozesse entstehen. Die zusätzliche Stimulation durch Radikalstress wurde über H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> umgesetzt. Dabei sollte die Reaktion von VSMCs auf reaktive Sauerstoffspezies untersucht werden, um Hinweise auf eine veränderte GSH Aktivität von PPP3CB KO VSMCs, im Vergleich zum WT, durch Stimulation zu erhalten.

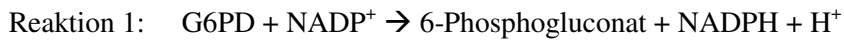
Nach Abnahme des Mediums wurden die Zellen gewaschen und in 150 µl Lysepuffer für 20 min lysiert. Das Zell-Puffer-Gemisch wurde anschließend für 10 min bei 13000 rpm zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zur Bestimmung der Caspase-3-Aktivität wurden 80 µl 1x Reaktionspuffer (RP), 40 µl Lysat und 5 µl 1mM DEVD-AFC Caspasesubstrat gemischt. Alle 30 min wurde die Caspase-Aktivität bei 400 nm Anregung und 505 nm Emission gemessen (Multiwell Counter, TePPP3 Infinite 2000). Zur Kalibrierung der Ergebnisse wurde eine Kalibrierkurve verwendet, die aus Reaktionspuffer und AFC-Caspasesubstrat besteht und einen Konzentrationsbereich von 0 bis 8 µM abdeckt.

#### 3.6.2. Lactatdehydrogenasemessung

Um die Aktivität an freigesetztem LDH bestimmen zu können wurde sowohl die LDH-Aktivität im Medium als auch im Zelllysate bestimmt. Für die Messung der LDH-Aktivität im Medium wurden 40 µl Medium mit 156 µl LDH-Puffer und 4 µl Substrat gemischt. Die LDH Aktivität im Zelllysate wurde durch den Einsatz von 15 µl Lysat, 181 µl LDH-Puffer und 4 µl LDH-Substrat bestimmt. Über einen Zeitraum vom 60 min wurde der NADH-Verlauf bei 334 nm alle 1 min aufgezeichnet, welcher mit der Menge an vorhandenem LDH korreliert. Das Verhältnis aus der NADH-Konzentration in Medium und Lysat ergab den prozentualen Anteil an freigesetztem LDH.

### 3.6.3. Glucose-6-phosphat-Dehydrogenasemessung

Die Aktivität der Glucose-6-phosphatdehydrogenase (G6PD) wurde mit Hilfe von zwei Reaktionen ermittelt.



Zu Beginn wurde die Aktivität der G6PD und 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase (6PGDH) gemessen, indem 0.2 mM NADP<sup>+</sup>, 0.4 mM Glucose-6-phosphat (Sigma G7879), 0.4 mM 6-Phosphogluconat und 30 µl Zelllysate mit 170 µl MOPS-Triton-Puffer gemischt wurden. Eine zweite Reaktion quantifizierte die Aktivität der 6PGDH, wofür der gleiche Ansatz wie bei Reaktion 1, jedoch ohne Glucose-6-phosphat, verwendet wurde. Die Zunahme der NADPH-basierten Absorption wurde bei einer Wellenlänge von 340 nm über 60 min vermessen. Aus der Differenz der Steigungen beider Reaktionen ergab sich die Enzymaktivität, die sich mit dem Gesetz nach Lambert-Beer berechnen ließ.

## 3.7. Tierexperimentelle Untersuchungen

### 3.7.1. Tiermodell - PPP3CB KO Mäuse

Mäuse vom Stamm B6;129s6-Ppp3cb<sup>tm1/Jmk</sup>/J wurden von Molkentin generiert und von Charles River bezogen [4]. Männliche und weibliche Tiere vom Stamm Ppp3cb wurden als spezifisch pathogenfreie (SPF) Tiere gehalten. Dabei erhielten die Tiere autoklaviertes Wasser und Standardfutter sowie Käfige mit Luftfilter. Bei Raumtemperatur und einem 12 h hell/dunkel Rhythmus wurden die Tageszeiten simuliert.

### 3.7.2. Implantation von osmotischen Minipumpen

PPP3CB WT und KO Mäusen wurden osmotische Minipumpen (alzet Modell 1004) subkutan implantiert, welche kontinuierlich (720 ng/kg/min, 11 µl/h) Angiotensin II an den Organismus abgaben. Dazu wurde jedes Tier in einer mit 2 Volumenprozent Isofluran in 100 % Sauerstoff gefluteten Box narkotisiert. Zur Aufrechterhaltung der Narkose wurden die Tiere anschließend mit 2,5 % Isofluran begast. Nach Applikation von 1 µl je Gramm Körpergewicht Rimadyl (in H<sub>2</sub>O) als Schmerzmittel, wurde eine Inzision im Nacken der Maus hergestellt und mit einer Pinzette der Implantatraum geweitet. In diesen Raum wurde die Pumpe geschoben und die Öffnung im Nacken mit Metallklammern geschlossen.

### 3.7.3. Tail-cuff Messung des systolischen Blutdrucks mit chronischer Angiotensin II Applikation

Der systolische Blutdruck wurde mittels pneumatischer Schwanzmanschette (Tail-cuff) gemessen. Dabei wurden die Mäuse in einer Röhre positioniert. Zur Sicherstellung eines ausreichend guten Blutflusses in der Schwanzvene wurden die Mäuse an eine Messtemperatur von 30 °C adaptiert. Anschließend wurde eine pneumatische Schwanzmanschette angelegt und die Daten mittels Pulsumwandler mit LabChart aufgezeichnet und der Mittelwert aller Messdaten pro Maus und pro Woche ermittelt. Nach einer zweiwöchigen Trainingsphase erfolgte eine zweiwöchige Aufzeichnung der Basalwerte. Anschließend wurden WT und KO Tieren osmotische Minipumpen implantiert (3.7.2.). Nun wurde für 28 Tage der Blutdruck von Kontrollmäusen und mit Ang II behandelten Tieren aufgezeichnet. Der Mittelwert aus allen Messungen wurde berechnet und für die jeweiligen Genotypen, als auch für die behandelten und nicht behandelten Tiere, der Blutdruck verglichen. Ebenfalls wurden die Ergebnisse der nicht-invasiven Blutdruckmessung mit denen der intravasalen Blutdruckmessung verglichen. Die Implantation der Minipumpen und die Blutdruckmessungen wurden mit Unterstützung von Dr. Nolze und Dr. Ruhs durchgeführt.

### 3.7.4. Intravasale Blutdruckmessung

Nach Gewichtsbestimmung wurde den Tieren die Narkose Ketamin (80 mg/kg KG)/Xylazin (120 mg/kg KG) mit 1 µl/g KG intra-peritoneal appliziert. Die Tiefe der Narkose wurde anhand des Zwischenzehenreflexes vor dem Eingriff kontrolliert. Nach Eintreten der Narkose wurde eine Hautinzision zwischen Hals und Thorax durchgeführt. Anschließend wurde die rechte Vena jugularis stumpf frei präpariert und mit einem Polyethylenkatheter versehen. Über diesen erfolgte die Kompensation von Flüssigkeitsverlusten der Maus mit 6 µl/g sterilem Ringer-Lactat + Heparin und 2 % BSA. Danach erfolgte das Freipräparieren der A.carotis communis, welche mit einem Millar-Katheter (1F) versehen wurde. Die arteriellen Ruheblutdrücke (systolischer als auch diastolischer Blutdruck) wurden mittels LabChart für 30 min aufgezeichnet. Nach einer halben Stunde Aufnahme des basalen Blutdruckes wurde über den Jugularvenenkatheter 50 µl Vehikel (Ringer-Laktat) appliziert. Nach Adaption des Blutdruckes an den Ausgangswert wurden 100 µl Angiotensin II (1 µg/kg in H<sub>2</sub>O) verabreicht und die Messung so lange aufgezeichnet, bis der Blutdruck wieder den Anfangswert erreicht hatte. Anschließend wurde der Katheter entfernt und nach zervikaler Dislokation die Organe entnommen. Diese Versuche wurden mit Unterstützung von PD Dr. Schreier durchgeführt.

### 3.7.5. Quantifizierung von Aortenringen mittels Sirius-Red und H&E-Färbung

Zu Bestimmung der Auswirkungen der Deletion der Beta-Untereinheit von Calcineurin auf Umfang und Fläche der Aorta bzw. Media, wurde diese von PPP3CB-Mäusen isoliert, in 0,9 % NaCl-Lösung stumpf frei präpariert und in 4 % Paraformaldehyd aufbewahrt. Anschließend wurden die Aorten in 70 % Ethanol entwässert und nach Aufbereitung im Einbettautomat in Paraffin eingebettet. Von den eingebetteten Präparaten wurden 4 µm Schnitte mit einem Mikrotom angefertigt. Diese wurden mittels picroSirius Red gefärbt und mit Hilfe eines Mikroskops (BZ-8100E, Keyence) vermessen. Die Kollagenfärbung wurde wie folgt durchgeführt:

#### A) Hydrierung

2\*5 min Xylol  
2 min 96 % EtOH-1, 96 % EtOH-2,  
80 % EtOH, 35 % EtOH  
5 min destilliertes Wasser  
1h Sirius Red

#### B) Dehydrierung

2 min 1% Essigsäure  
5 min destilliertes Wasser  
2 min 35 % EtOH, 80 % EtOH,  
96 % EtOH-2, 96 % EtOH-1  
5 min Isopropanol  
2\*5 min Xylol

Durch die Färbung wurde die Media visualisiert und anhand von zehn Messpunkten die Mediadicke quantifiziert. Für die Berechnung der Lumenfläche als auch des inneren/äußeren Radius wurde der innere und äussere Umfang der Aorta, ohne Adventitia, vermessen. Mit der Formel  $A = U/2\pi r^2$  wurde die Fläche von Lumen und Media errechnet. Die Radien wurden mittels Kreisformel  $2\pi r^2$  berechnet.

### 3.8. Statistik

Die Daten sind als Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt. Signifikante Unterschiede wurden mittels gepaartem und ungepaartem Student's t-test ermittelt. Als Parameter für Signifikanz gilt ein p-Wert von kleiner als 0,05.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Basale Charakterisierung von PPP3CB KO Mäusen

#### 4.1.1. Basales Trinkvolumen und Körpergewicht von PPP3CB WT und KO Mäusen

Die Trinkmenge hat Einfluss auf den Volumenhaushalt und damit auf die Blutdruckregulation. Daher wurde das Trinkverhalten von PPP3CB WT und KO Mäusen aufgezeichnet. P-Werte kleiner als 0,05 wurden als signifikant bewertet.



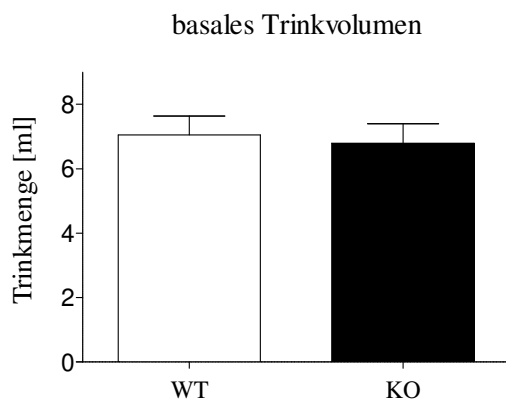


Abb. 6: Basales Trinkvolumen von PPP3CB WT und KO Mäusen ( $N_{WT/KO} = 15/15$ ).

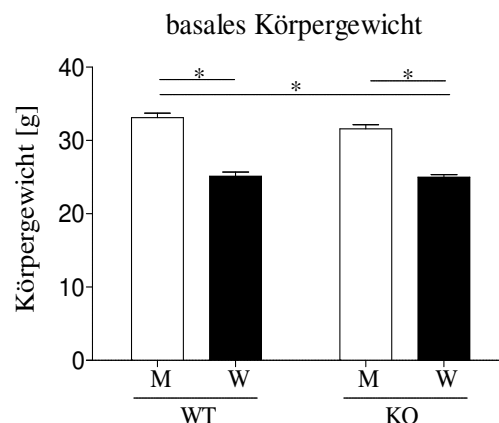


Abb. 7: Basales Körpergewicht von männlichen und weiblichen PPP3CB WT und KO Mäusen ( $N_{M/W-WT} = 13/8$ ,  $N_{M/W-KO} = 11/8$ , M: Männchen, W: Weibchen,  $p < 0,001$ ).

Unter basalen Bedingungen wurden keine signifikanten Unterschiede in der Trinkmenge von WT und KO Mäusen festgestellt. WT Tiere tranken durchschnittlich  $6,56 \pm 0,44$  ml pro Tag, während KO Mäuse  $6,46 \pm 0,59$  ml tranken (Abb. 6).

Das Körpergewicht der Mäuse wurde aufgezeichnet, da es Auskunft über den allgemeinen Gesundheitszustand und den Volumenhaushalt der Tiere gibt. Wie bereits in der Literatur beschrieben, besaßen die hier eingesetzten männlichen Mäuse ein höheres Körpergewicht von  $33,13 \pm 0,59$  g als die weiblichen Tiere mit  $25,1 \pm 0,58$  g ( $p < 0,001$ ; Abb. 7). Ein ähnliches Verhältnis zeigten die KO Tiere, bei denen ebenfalls die männlichen Tiere schwerer waren als die weiblichen Mäuse. Bei männlichen KO Tieren wurde ein Körpergewicht von  $31,57 \pm 0,56$  g bestimmt, bei den Weibchen hingegen wurden  $25,7 \pm 0,34$  g gemessen ( $p < 0,001$ ).

Im Rahmen der basalen Charakterisierung von PPP3CB KO Mäusen wurde anschließend der ubiquitäre Knockout von PPP3CB in KO Mäusen untersucht. Um kompensatorische Expressionsmuster ausschließen zu können, die durch den *Knockout* von PPP3CB resultieren und weitere Untersuchungen beeinflussen könnten, wurde in PPP3CB WT und KO Mäusen die Expression der Untereinheiten PPP3CA und PPP3CB mit *real-time* PCR nachgewiesen.

#### 4.1.2. Nachweis der mRNA von PPP3CA und PPP3CB in Organen von WT und KO Mäusen

Das mRNA Expressionsniveau von PPP3CA von Calcineurin in KO Tieren zeigte im Gehirn, Leber, Niere und Aorta keine Unterschiede im Vergleich zu WT Mäusen. Die mRNA-Expression der PPP3CB WT Mäuse wurde auf 1 normiert. Im Herz war zu Beginn ein Effekt zu sehen, der sich bei weiteren mRNA-Expressionsanalysen nivellierte. Die größere Anzahl an Tieren führte zu einem kleineren SEM-Ergebnissen als bei allen anderen Organen (Abb. 8).

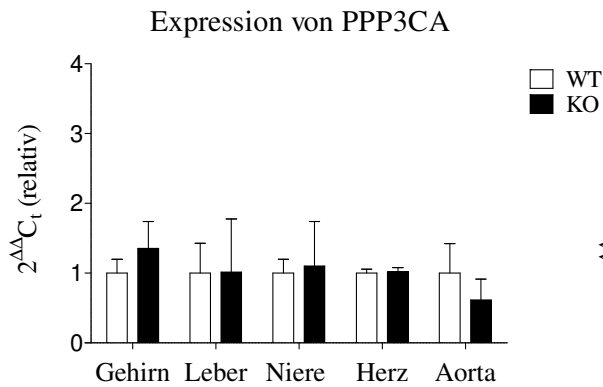


Abb. 8: Basale mRNA Expression von PPP3CA in Organen von PPP3CB WT und KO Mäusen ( $N_{WT/KO} = 6/7$ ,  $N_{WT/KOHerz} = 6/12$ ).

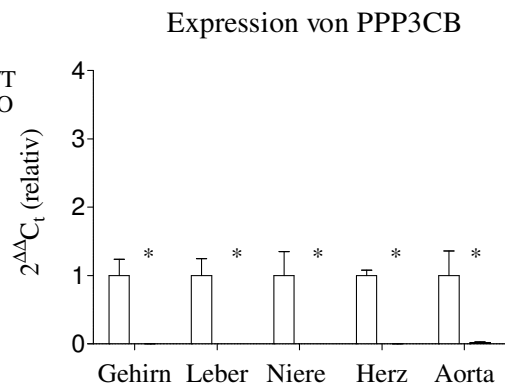


Abb. 9: Basale mRNA Expression von PPP3CB in Organen von PPP3CB WT und KO Mäusen ( $N_{WT/KO} = 6/7$ ;  $p < 0,001$ ).

In allen mRNA-Proben von KO Tieren war PPP3CB nicht nachweisbar (Abb. 9). Auch hier wurde der WT auf 1 normiert. In der Aorta von PPP3CB KO Mäusen konnte mit der Messung der basalen mRNA-Expression von PPP3CA und PPP3CB eine kompensatorische Anpassung der Expression in KO Mäusen, möglicherweise durch das Fehlen von PPP3CB, ausgeschlossen werden.

Für die weitere basale Charakterisierung der in dieser Arbeit im Fokus liegenden Gefäßveränderungen wurde das größte Gefäß im Körper der Maus, die Aorta, für weitere Analysen gewählt. Die Analysen beinhalteten eine Quantifizierung von Aortenparametern unter basalen Bedingungen.

#### 4.1.3. Basale mRNA-Expression von Fibrose- und Entzündungsmarkern in Aorten von PPP3CB WT und KO Mäusen

Verschiedene Gene wurden auf ihr Expressionsniveau auf mRNA-Ebene, speziell in Aorten von PPP3CB WT und KO Tieren, untersucht. Dabei wurden Fibrose- und Entzündungsmarker analysiert.

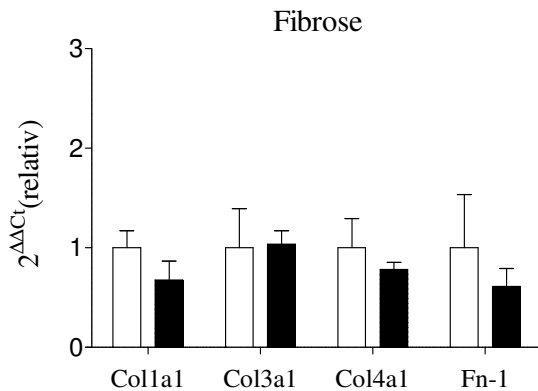


Abb. 10: Basale mRNA-Expression von Fibrosemarkern in Aorten von PPP3CB WT und KO Mäusen ( $N_{WT/KO} = 5/7$ ).

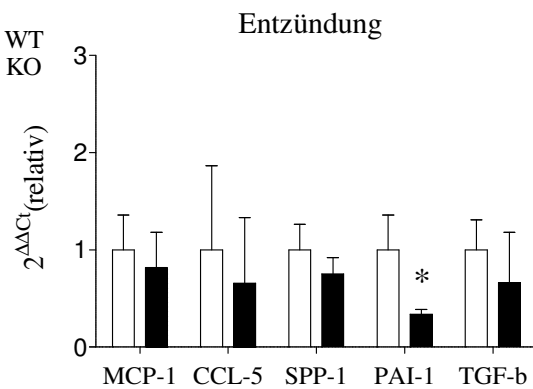


Abb. 11: Basale mRNA-Expression von Entzündungsmarkern in Aorten von PPP3CB WT und KO Mäusen ( $N_{WT/KO} = 6/7$ ;  $p = 0,01$ ).

Die mRNA Expression von Kollagenen wie Kollagen 1a1 (Col1a1) und Kollagen 3a1 (Col3a1) sowie Kollagen 4a1 (Col4a1) zeigten keine Unterschiede zwischen WT und KO Mäusen. Beispielsweise betrug der relative  $2^{\Delta\Delta C_t}$ -Wert von Col1a1 mRNA von KO Mäusen  $0,68 \pm 0,19$ , der Wert der Col4a1 lag bei  $0,78 \pm 0,07$ . Auch das Glykoprotein Fibronectin 1 (Fn-1) zeigte kein verändertes mRNA Expressionsniveau zwischen WT und KO Maus-Aorten. Die mRNA aus Aorten der KO Tiere wies einen relativen  $2^{\Delta\Delta C_t}$ -Wert von  $0,61 \pm 0,2$  auf (Abb. 10). In Bezug auf Entzündungsmarkergene wie zum Beispiel MCP-1 (Monocyte chemotactic protein 1), CCL-5 (RANTES), SPP-1 (Secreted-phosphoprotein-1;  $p = 0,06$ ) oder Tgf- $\beta$  konnten keine Unterschiede in der mRNA-Expression zwischen WT und KO Mäusen festgestellt werden (Abb. 11). Die mRNA von PAI-1 jedoch war in KO Mäusen signifikant geringer exprimiert, deren  $2^{\Delta\Delta C_t}$ -Wert lag bei  $0,34 \pm 0,053$  (normiert auf WT mRNA = 1;  $p = 0,01$ ; Abb. 10).

#### 4.1.4. Basale Proteinexpression von pCREB und CREB in Aortenlysaten von PPP3CB WT und KO Mäusen unter basalen Bedingungen

Weiterhin wurde für die basale Charakterisierung von PPP3CB KO Mäusen ein wichtiger Calcineurin gesteuerter Transkriptionsfaktor pCREB/CREB, hinsichtlich seiner Proteinexpression in Lysaten, aus der Aorta detektiert und quantifiziert. CREB wird von PPP3C dephosphoryliert und damit inaktiviert.

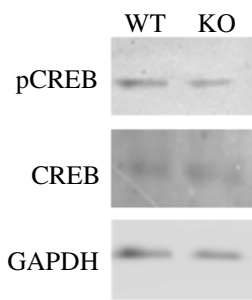


Abb. 12: Western Blot von Aortenlysaten von PPP3CB WT und KO Tieren zum Nachweis der basalen Expression von CREB und pCREB ( $N_{WT/KO} = 10/7$ ).

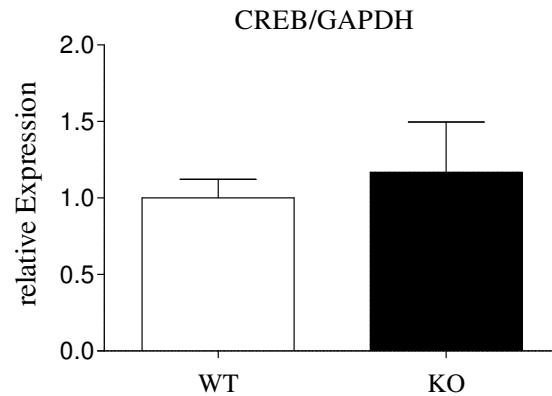


Abb. 13: Quantifizierung der Bandenintensität von CREB zu GAPDH in Proteinlysaten von Aorten von PPP3CB WT und KO Tieren ( $N_{WT/KO} = 10/7$ ).

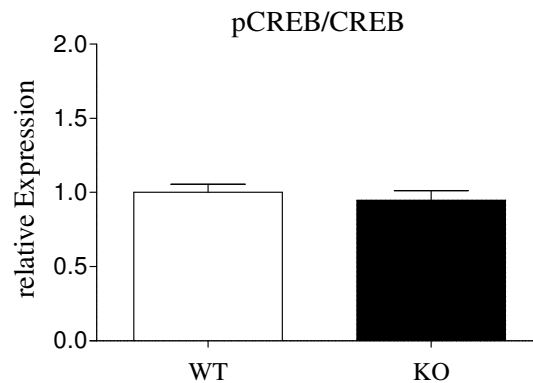


Abb. 14: Quantifizierung der Bandenintensität von pCREB zu CREB in Proteinlysaten von Aorten von PPP3CB WT und KO Tieren ( $N_{WT/KO} = 10/7$ ).

Bei Analyse der Bandenintensität konnte keine unterschiedliche Expression von CREB, normiert auf GAPDH, nachgewiesen werden (Abb. 12, 13). Ebenfalls lag keine veränderte Phosphorylierung von CREB vor, wobei KO Aortenlysate eine mittlere Bandenintensität von  $0,95 \pm 0,06$  (relativ) aufwiesen (Abb. 12, 14). Für den Vergleich zwischen WT und KO Aortenlysaten wurde der WT auf eine Bandenintensität von eins normiert.

## 4.2. Basale Untersuchung von VSMCs aus Aorten von WT und KO Mäusen

### 4.2.1. Morphologie von VSMCs aus Aorten von WT und KO Mäusen

Für den Nachweis, dass die Isolation der VSMCs aus der Aorta (aVSMCs) erfolgreich war, wurden die Zellbestandteile, wie der Zellkern mit *4',6-Diamidin-2-phenylindol* (DAPI) und  *$\alpha$ -smooth muscle actin* ( $\alpha$ -SMA) mittels FITC gekoppeltem Antikörper, gefärbt. Das  $\alpha$ -SMA ist mit 40 % des zellulären Gesamtproteins das am häufigsten vorkommende Protein und spielt eine wichtige Rolle in den Elastizitätseigenschaften von VSMCs [124] (Abb. 15).

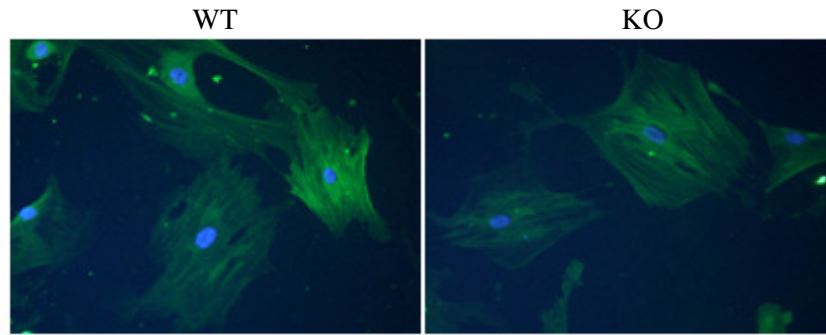


Abb. 15: Immunfluoreszenzmikroskopie von  $\alpha$ -SMA (grün) und Zellkernfärbung von glatten Gefäßmuskelzellen aus der Aorta von WT und KO Mäusen (Zellkern: blau).

#### 4.2.2. Nachweis von PPP3CA und PPP3CB in der mRNA aus VSMCs von PPP3CB WT und KO Mäusen

Isolierte VSMCs aus WT und KO Aorten weisen keine veränderte mRNA Expression von PPP3CA auf (Abb. 16).

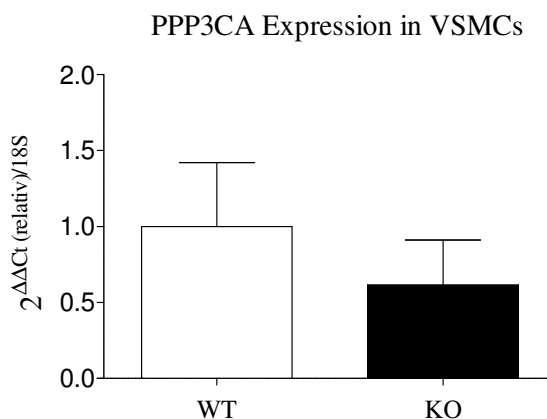


Abb. 16: Basale mRNA Expression von PPP3CA in VSMCs aus Aorten von PPP3CB WT und KO Mäusen ( $N_{WT/KO} = 11/12$ ).

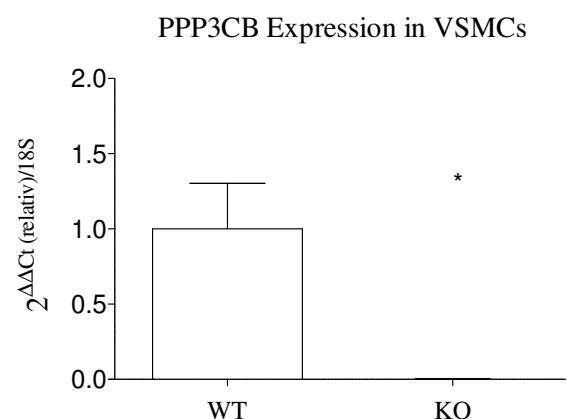


Abb. 17: Basale mRNA Expression von PPP3CB in VSMCs aus Aorten von PPP3CB WT und KO Mäusen ( $N_{WT/KO} = 11/12$ ;  $p < 0,001$ ).

Verglichen mit WT VSMCs ( $\Delta\Delta Ct = 0,83 \pm 0,3$ ) war in KO VSMCs die mRNA von PPP3CB nicht nachweisbar (Abb. 17). Nachdem die mRNA Expression von PPP3CA und PPP3CB quantifiziert war, sind diese Untereinheiten auch hinsichtlich ihrer Proteinexpression mittels Antikörperfärbung untersucht worden.

#### 4.2.3. Nachweis von PPP3CA und PPP3CB in Proteinlysaten aus VSMCs von PPP3CB WT und KO Mäusen

Es zeigte sich in VSMCs aus PPP3CB WT und KO Mäusen kein Unterschied in der Proteinexpression von PPP3CA (Abb. 18, 19). Das Protein PPP3CB konnte in Lysaten aus

VSMCs von KO Mäusen nicht nachgewiesen werden, während der WT einen normierten Wert von 1 besaß. (Abb. 20). Da in VSMCs aus Aorten von KO Mäusen keine mRNA- und keine Proteinexpression von PPP3CB nachgewiesen wurde, konnte ein globaler Knockout dieser Untereinheit bestätigt werden.

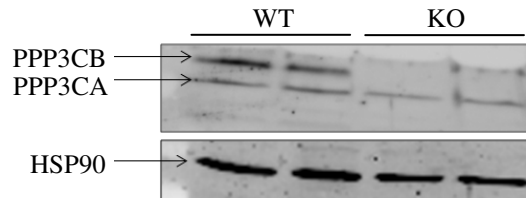


Abb. 18: Basale Proteinexpression von PPP3CA und PPP3CB in VSMCs aus der Aorta von PPP3CB WT und KO Mäusen ( $N_{WT/KO} = 4/4$ ).

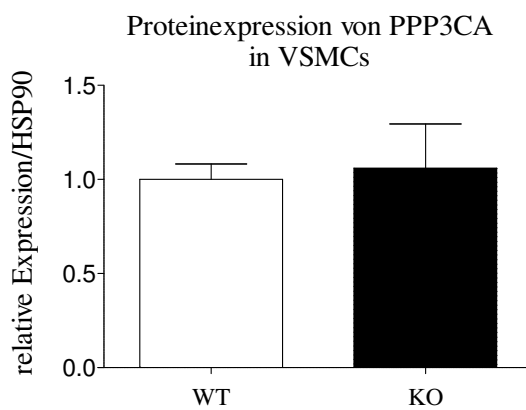


Abb. 19: Quantifizierung der basalen Proteinexpression von PPP3CA in VSMCs aus der Aorta von PPP3CB WT und KO Mäusen ( $N_{WT/KO} = 4/4$ ).

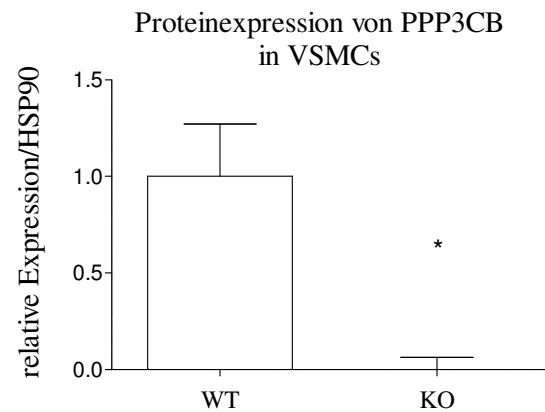


Abb. 20: Quantifizierung der basalen Proteinexpression von PPP3CB in VSMCs aus der Aorta von PPP3CB WT und KO Mäusen ( $N_{WT/KO} = 4/4$ ;  $p < 0,001$ ).

#### 4.2.4. Basaler Nachweis der Proteinexpression der Transkriptionsfaktoren pCREB und NFaT1-NFaT4 in VSMCs

Transkriptionsfaktoren wie pCREB und pNFaT4 wurden auf ihre Proteinexpression hin untersucht (Abb. 21, 23).

Nach Quantifizierung der Bandenintensitäten war zu sehen, dass in KO VSMC Lysaten so viel pCREB detektiert werden konnte wie in WT VSMCs (Abb. 22). In KO Proteinlysaten wurde eine relative Proteinexpression von  $1,6 \pm 0,28 \text{ INT} \cdot \text{mm}^2$  gemessen (Abb. 22).

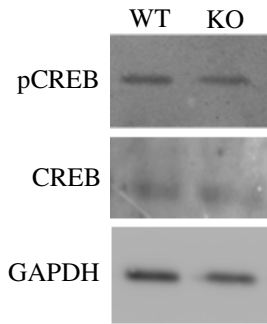


Abb. 21: Proteinexpression von pCREB, CREB und HSP90 in VSMCs aus Aorten von PPP3CB WT und KO Mäusen ( $N_{WT/KO} = 4/4$ ).

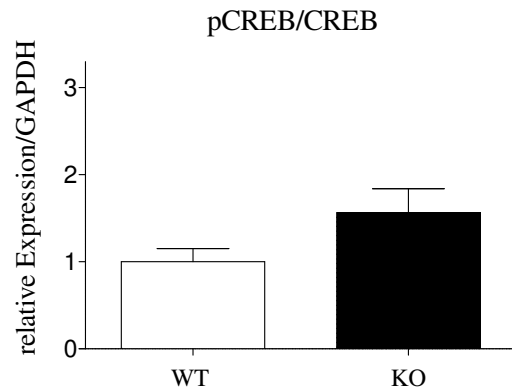


Abb. 22: Quantifizierung der Proteinexpression von pCREB, CREB und HSP90 in VSMCs aus Aorten von PPP3CB WT und KO Mäusen ( $N_{WT/KO} = 4/4$ ).

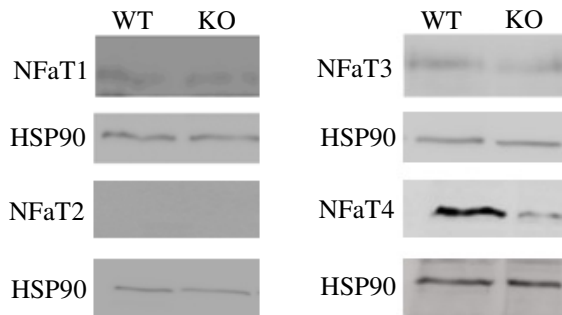


Abb. 23: Proteinexpression der Transkriptionsfaktoren pNFaT1, pNFaT2, pNFaT3 und pNFaT4 in VSMCs aus Aorten von PPP3CB WT und KO Mäusen (pNFaT1: Referenz in VSMCs aus Aorten von  $N_{WT/KO} = 10/12$ ; pNFaT1:  $N_{WT/KO} = 12/14$ ; pNFaT3: PPP3CB WT und KO Mäusen  $N_{WT/KO} = 8/6$ ; pNFaT4:  $N = 4/4$ ).

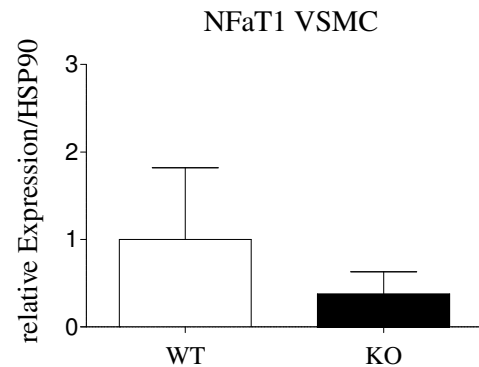


Abb. 24: Quantifizierung der Proteinexpression von NFaT1 mit HSP90 als Referenz in VSMCs aus Aorten von PPP3CB WT und KO Mäusen ( $N_{WT/KO} = 10/12$ ).

NFaT1 war in Proteinlysaten aus VSMCs der Aorten von WT und KO Tieren nachweisbar, wobei sich die Expression aufgrund hoher Schwankungen der Werte in WT VSMCs nicht von KO VSMCs unterschied (Abb. 23, 24). NFaT2 konnte nicht nachgewiesen werden.

Der Antikörper detektierte NFaT2, jedoch war die Proteinexpression so gering, dass die Banden nicht in allen Proben sichtbar waren (Abb. 23). NFaT3 hingegen konnte detektiert werden. Dabei waren keine signifikanten Unterschiede zwischen Lysaten aus WT- und KO VSMCs detektierbar (Abb. 23, 25). Die Expression von NFaT4 zeigte mit  $0,16 \pm 0,06$  INT\*mm<sup>2</sup> ( $p = 0,042$ ) eine reduzierte Expression im Vergleich mit WT VSMC normiert auf 1 (Abb. 23, 26).

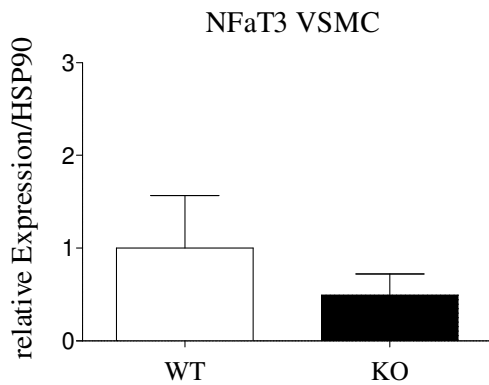


Abb. 25: Quantifizierung der Proteinexpression von NFaT3 mit HSP90 als Referenz in VSMCs aus Aorten von PPP3CB WT und KO Mäusen ( $N_{WT/KO} = 8/8$ ).

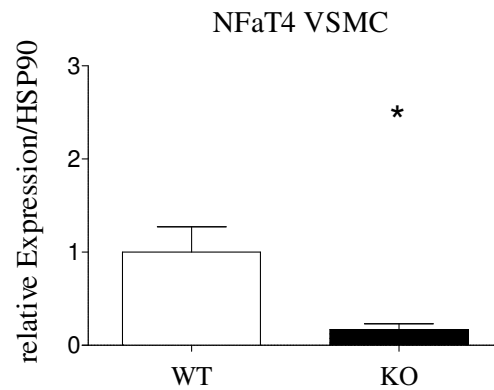


Abb. 26: Quantifizierung der Proteinexpression von NFaT4 mit HSP90 als Referenz in VSMCs aus Aorten von PPP3CB WT und KO Mäusen ( $N_{WT/KO} = 4/4$ ,  $p = 0,042$ ).

Um WT und KO VSMCs weiter zu charakterisieren wurde das Apoptose- (Caspase) und Nekroseverhalten (LDH) mittels Enzymmessungen untersucht.

#### 4.2.5. Caspase- und LDH-Aktivität bei Stimulation von VSMCs

Um WT und KO VSMCs weiter zu charakterisieren wurde das Apoptose- (Caspase) und Nekroseverhalten (LDH) mittels Enzymmessungen untersucht. Für die Stimulation wurde  $H_2O_2$  eingesetzt.

Für die Beurteilung des Apoptoseverhaltens wurde das Enzym Caspase in Bezug auf seine Aktivität vermessen. Dabei war zu beobachten, dass PPP3CB KO VSMCs (149,21 %) eine höhere Caspase-Aktivität bei 250  $\mu M$   $H_2O_2$  als WT VSMCs besaßen ( $p = 0,03$ ; Abb. 27). Für die Beurteilung des Nekroseverhaltens von VSMCs wurde das Enzym LDH über die Reaktion von Pyruvat in L-Lactat unter Umwandlung von  $NADH^+$  zu  $NAD^+$  im Medium gemessen. Im Vergleich zur Apoptose werden bei der Nekrose die Zellen durch Entzündungsreaktionen zerstört.

Unter Vehikelbedingungen gab es keine Unterschiede zwischen WT und KO VSMCs ( $LDH_{relativ} = 95,98 \pm 1,42 \%$ , Abb. 28). Bei Inkubation von KO VSMCs mit 250  $\mu M$   $H_2O_2$  (107,83  $\pm$  1,38 %) stieg die LDH-Freisetzung, im Vergleich zu WT, nicht. WT VSMCs wiesen, im Vergleich zu Vehikelbedingungen unter Einfluss von 250  $\mu M$   $H_2O_2$ , eine signifikant höhere LDH-Freisetzung (120,53  $\pm$  1,32 %) im Medium auf als KO VSMCs ( $p = 0,031$ ; Abb. 28). Eine Erhöhung der  $H_2O_2$ -Konzentration auf 500  $\mu M$  führte in WT (216,65  $\pm$  2,86 %) und KO VSMCs (200,31  $\pm$  2,6 %) zu einer weiteren Steigerung der LDH-Freisetzung im Vergleich zu Vehikelbedingungen ( $p_{WT} = 0,004$ ;  $p_{KO} = 0,001$ ; Abb. 28). Unter Einfluss von 500  $\mu M$   $H_2O_2$  unterschied sich die LDH-Freisetzung in das Medium von WT und KO VSMCs nicht.



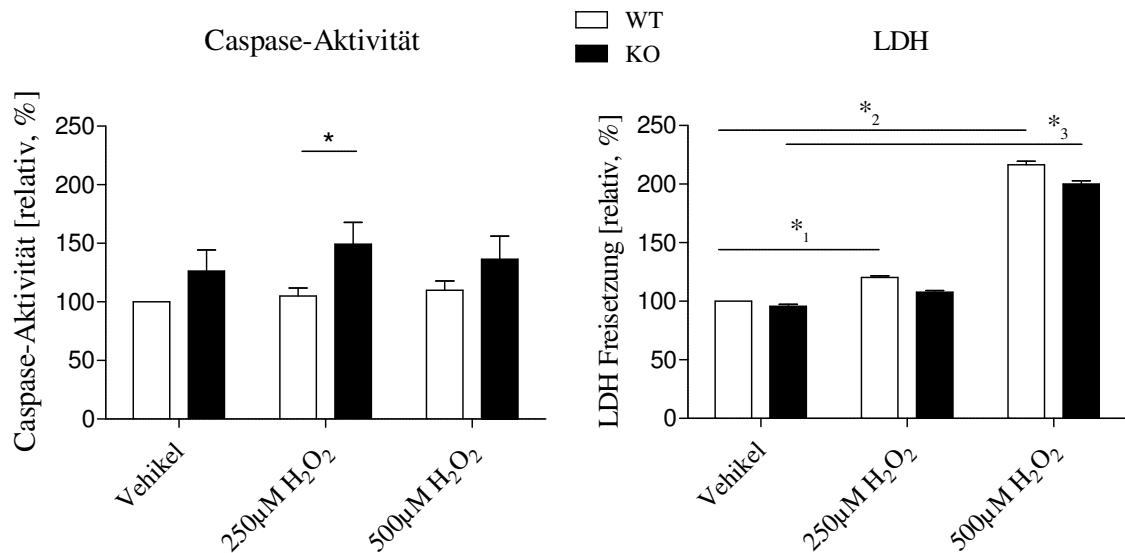


Abb. 27: Quantifizierung der Caspase-Aktivität in VSMCs aus Aorten von PPP3CB WT und KO Mäusen ( $N_{WT/KO} = 6/6$ ,  $n_{WT/KO} = 4/6$ ;  $p = 0,03$ ).

Abb. 28: Quantifizierung der LDH-Aktivität in VSMCs aus Aorten von PPP3CB WT und KO Mäusen ( $N_{WT/KO} = 7/6$ ,  $n_{WT/KO} = 4/6$ ; \*<sub>1</sub>  $p = 0,031$ ; \*<sub>2</sub>  $p = 0,004$ ; \*<sub>3</sub>  $p = 0,001$ ).

#### 4.2.6. Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase-Aktivität bei Stimulation von VSMCs

Des Weiteren wurde die Aktivität der G6PD gemessen. Dieses Enzym ist wichtig für die Bereitstellung von reduziertem Glutathion zum Schutz der Zellen gegenüber radikalen Sauerstoffspezies [123, 230]. Vorversuche konnten zeigen, dass eine Inkubation von transfizierten HEK-Zellen (humane embryonale Nierenzelllinie) mit Forskolin zu einer verstärkten G6PD-Aktivität führt, welche durch Stimulation mit Aldosteron gehemmt werden kann [58].

Die Enzymaktivität der G6PD konnte bei Forskolininkubation von WT VSMCs auf  $142,14 \pm 1,73$  % gesteigert werden ( $p = 0,012$ ; Abb. 29). Die Stimulation von KO VSMCs hatte keinen Einfluss auf die Enzymaktivität von G6PD (Abb. 29). Aldosteron hatte keinen Einfluss auf die Aktivität der G6PD in unseren VSMCs.

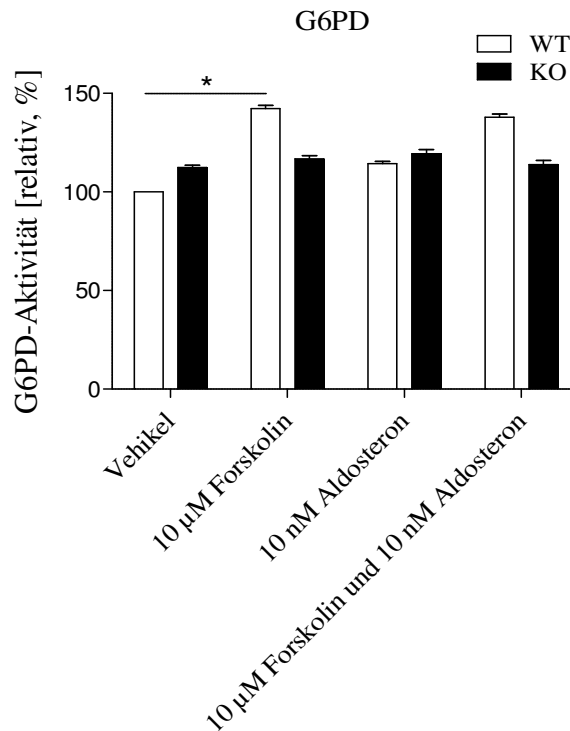


Abb. 28: Quantifizierung der G6PD-Aktivität in VSMCs aus Aorten von PPP3CB WT und KO Mäusen ( $N_{WT/KO} = 6/6$ ,  $n_{WT/KO} = 4/6$ ;  $p = 0,012$ ).

Da bisher kein direkter Zusammenhang von PPP3C und der Gefäßreagibilität gezeigt werden konnte, wurden PPP3CB WT und KO Mäuse hinsichtlich einer Blutdruckänderung akut mit Angiotensin II stimuliert. Langfristig ist Angiotensin II in der Lage vaskuläre Hypertrophieentwicklung zu beeinflussen. Desweiteren ist Ang II befähigt die Genexpression von Fibrose- und Entzündungs-assoziierten Genen in Herz, Niere und kleinen Gefäßen sowie Bluthochdruck zu induzieren [122].

#### 4.3. Akute Angiotensin II Stimulation von PPP3CB WT und KO Mäusen

##### 4.3.1. Basale Blutdruckparameter

Um die Wirkung einer akuten AngII-Applikation in Bezug auf den Blutdruck zu messen, wurden WT und KO Tieren mittels Millar Katheter, Vehikel (Ringer-Lactat) und Angiotensin II infundiert. Dabei sind nach Aufzeichnung des basalen Blutdrucks folgende Parameter gemessen worden. Zu Beginn der invasiven Blutdruckmessung, mittels Millar Katheter, wurden die Herzfrequenz und der Blutdruck unter basalen Bedingungen gemessen. PPP3CB WT Mäuse zeigten eine basale Herzfrequenz von  $150,88 \pm 10,91$  Schlägen pro Minute (bpm), PPP3CB KO Tiere wiesen einen Wert von  $175,05 \pm 25,51$  bpm auf (Abb. 30). WT und KO Mäuse wiesen keine Unterschiede im systolischen Blutdruck auf. PPP3CB WT Tiere besaßen  $95,32 \pm 7,02$  mmHg, während PPP3CB KO Mäuse  $87,66 \pm 3,85$  mmHg aufwiesen (Abb. 31).

Auch der diastolische Blutdruck zeigte keine Veränderungen in KO Tieren mit  $63,04 \pm 6,24$  mmHg im Vergleich zu WT Mäusen mit  $60,03 \pm 3,85$  mmHg. Der basale Pulsdruck stellt die Differenz des systolischen Maximalwertes und dem diastolischen Minimaldruck dar [1].

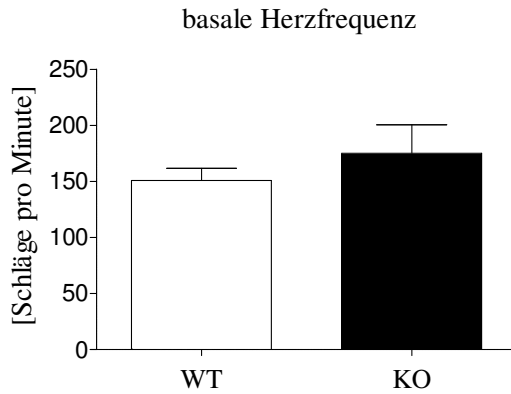


Abb. 30: Basale Herzfrequenz von PPP3CB WT und KO Mäusen ( $N_{WT/KO} = 7/7$ ).

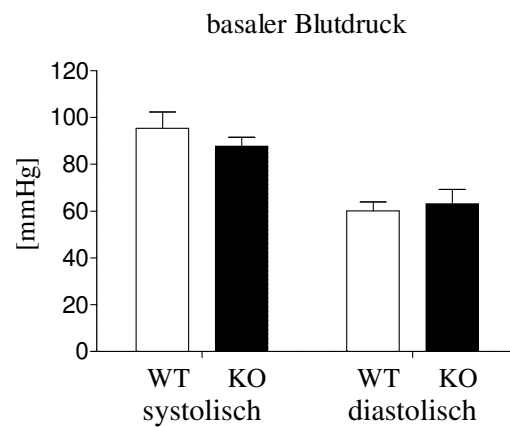


Abb. 31: Basaler Blutdruck von PPP3CB WT und KO Mäusen ( $N_{WT/KO} = 7/7$ ).

#### 4.3.2. Blutdruckparameter von PPP3CB WT und KO Mäusen nach Vehikel-Applikation

Um festzustellen, wie WT und KO Mäuse auf eine Volumenapplikation reagieren, wurde Vehikel (Ringer-Lactat) injiziert.

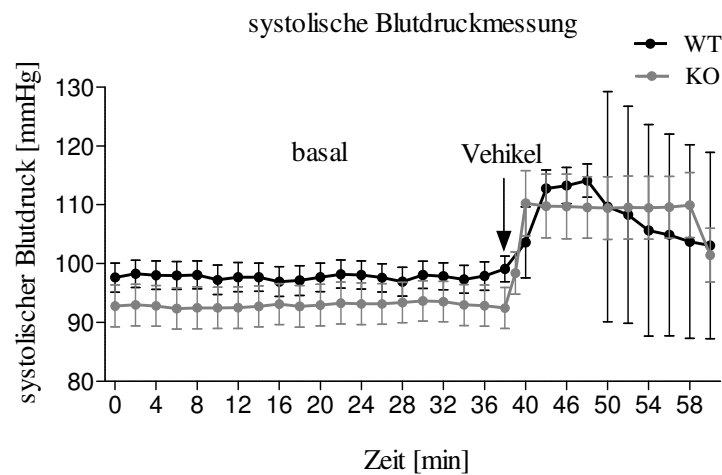


Abb. 32: Mittlerer Verlauf des systolischen Blutdrucks von PPP3CB WT und KO Mäusen der intravasalen Blutdruckmessung unter basalen Bedingungen und unter Einfluss von Vehikel ( $N_{WT/KO} = 7/7$ ).

Für die Bestimmung der Reaktion auf eine Volumenapplikation wurde auch die Fläche unter der Blutdruckverlaufskurve berechnet (Abb. 32,33). Dabei zeigten sich keine unterschiedlichen Reaktionen auf Vehikelapplikation. WT Tiere besaßen eine AUC von  $562,24 \pm 49$  FE, KO Mäuse wiesen ein Ergebnis von  $558,71 \pm 26,9$  FE auf (Abb. 33). WT und KO Mäuse besaßen

eine ähnliche Herzfrequenz. WT Mäuse wiesen eine Herzfrequenz von  $177,12 \pm 20,96$  bpm auf, während KO Tiere einen Wert von  $167,14 \pm 18,19$  bpm besaßen (Abb. 34).

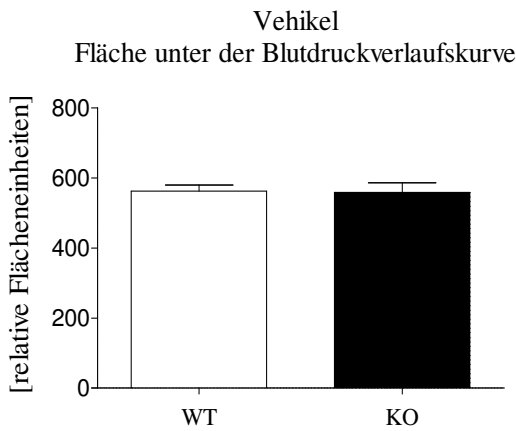


Abb. 33: Flächenberechnung unter der Kurve (AUC) des Blutdruckverlaufes von PPP3CB WT und KO Mäusen ( $N_{WT/KO} = 7/7$ ).

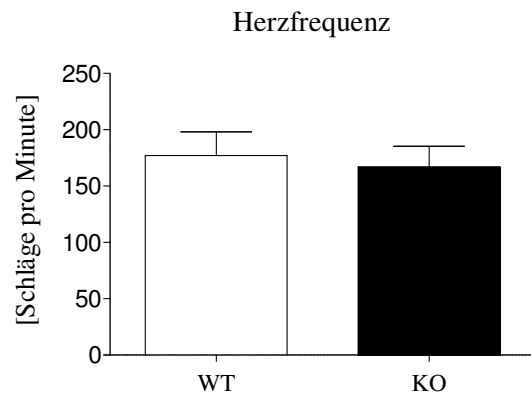


Abb. 34: Maximale Herzfrequenz von PPP3CB WT und KO Mäusen der intravasalen Blutdruckmessung mittels Millar-Katheter ( $N_{WT/KO} = 7/7$ ).

Nach Messung der Reaktion auf eine Volumenapplikation wurde diesen Tieren Angiotensin II infundiert. Nachfolgend ist die Angiotensin II-beeinflusste systolische Blutdruckänderung gemessen worden.

#### 4.3.3. Blutdruckparameter von PPP3CB WT und KO Mäusen nach Angiotensin II-Applikation

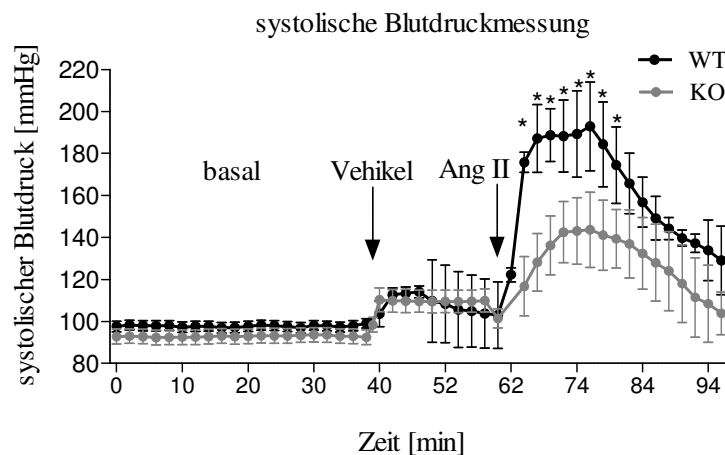


Abb. 35: Mittlerer Verlauf des systolischen Blutdrucks von PPP3CB WT und KO Mäusen der intravasalen Blutdruckmessung unter Einfluss von Ang II ( $N_{WT/KO} = 7/7$ ;  $p_{1-3} = 0,004$ ;  $0,03$ ;  $0,002$ ;  $p_{4-7} < 0,001$ ;  $p_8 = 0,002$ ).

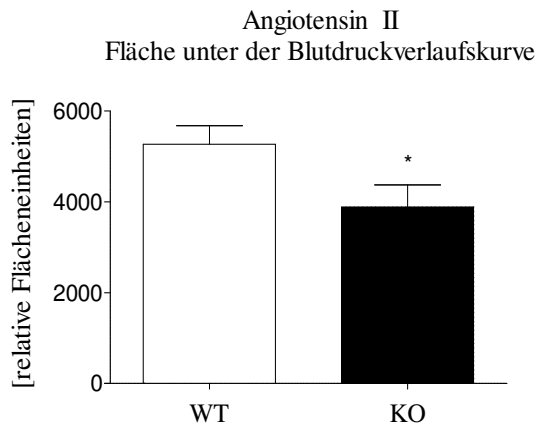


Abb. 36: Flächenberechnung unter der Kurve des Blutdruckverlaufes von PPP3CB WT und KO Mäusen der intravasalen Blutdruckmessung unter Einfluss von Ang II ( $N_{WT/KO} = 7/7$ ;  $p < 0,001$ ).

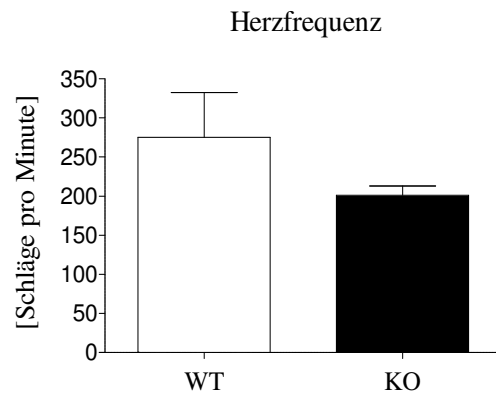


Abb. 37: Maximale Herzfrequenz von PPP3CB WT und KO Mäusen unter Einfluss von Ang II ( $N_{WT/KO} = 7/7$ ).

In Bezug auf den Verlauf des mittleren systolischen Blutdrucks reagierten PPP3CB WT und KO Mäuse unterschiedlich auf eine Ang II-Applikation. Dies wurde durch eine geringere Blutdruckänderung nach Ang II-Infundierung deutlich, dessen Applikationszeitpunkt mit einem Pfeil markiert wurde. Der Anstieg der systolischen Blutdruckwerte nach Applikation von Ang II fiel bei den KO Tieren schwächer aus. (Abb. 35). Anschließend erfolgte eine Angleichung des systolischen Blutdrucks an den Basalwert, welches in der Abbildung nicht dargestellt werden konnte. Der Grund dafür sind unterschiedlich lange Blutdruckmessungen der einzelnen Tiere. Die Reaktion von WT und KO Mäusen auf Angiotensin II wurde mit der berechneten AUC weiterhin beschrieben. Dabei wiesen KO Mäuse mit  $3886 \pm 489,2$  FE eine kleinere AUC auf als WT Tiere mit  $5266 \pm 409,7$  FE (Abb. 36;  $p < 0,001$ ). Angiotensin II führte zu keiner Veränderung der maximalen Herzfrequenz. WT Mäuse besaßen eine maximale Herzfrequenz von  $275,35 \pm 56,81$  mmHg, KO Mäusen hingegen  $200,97 \pm 12,16$  mmHg (Abb. 37).

Zur Beantwortung der Fragestellung wie sich die Langzeitapplikation von Angiotensin II in Bezug auf den systolischen Blutdruck auswirkt, wurden PPP3CB WT und KO Tieren osmotische Minipumpen (Alzet;  $0,11 \mu\text{l/h}$ ) implantiert und der Blutdruck über 28 Tage gemessen. Da bekannt ist, dass Angiotensin II zu einer erhöhten Flüssigkeitsaufnahme führen kann, wurde das Trinkverhalten von PPP3CB WT und KO Mäusen in diesem Zeitraum untersucht [126].

#### 4.4. Chronische Angiotensin II-Stimulation von PPP3CB WT und KO Mäusen

##### 4.4.1. Trinkvolumen und Körpergewicht bei chronischer Angiotensin II-Stimulation

Die Trinkvolumina von WT und KO Mäusen unter Kontrollbedingungen und Angiotensin II-Applikation unterschieden sich nicht (Abb. 38). PPP3CB WT Mäuse ( $p = 0,58$ ) tranken unter Einfluss von Ang II soviel wie PPP3CB KO Tiere ( $p = 0,76$ ).

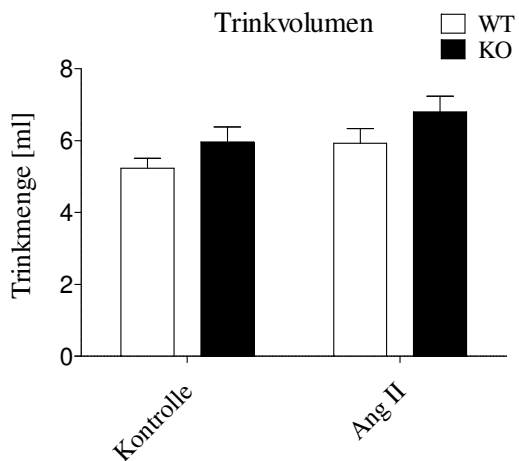


Abb. 38: Trinkvolumen von PPP3CB WT und KO Mäusen bei chronischer Ang II Stimulation (basal:  $N_{WT/KO} = 15$ ; Kontrolle:  $N_{WT/KO} = 15/16$ ; Ang II:  $N_{WT/KO} = 18/15$ ).

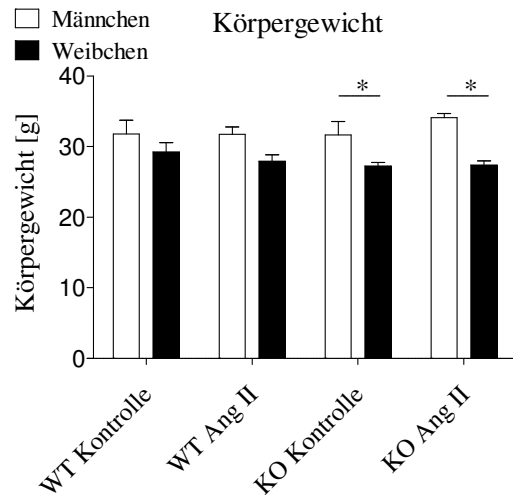


Abb. 39: Körpergewicht von männlichen und weiblichen PPP3CB WT und KO Tieren nach chronischer Ang II-Stimulation (Kontrolle:  $N_{M/W-WT} = 6/4$ ,  $N_{M/W-KO} = 5/7$ ; Ang II:  $N_{M/W-WT} = 6/9$ ,  $N_{M/W-KO} = 6/8$ ;  $p < 0,001$ ).

Im Rahmen der chronischen Ang II-Applikation wurde das Körpergewicht von PPP3CB WT und KO Mäusen unter Kontrollbedingungen und Ang II-Gabe ermittelt. Dabei wiesen KO und WT Tiere keine Unterschiede auf (Abb. 39).

Unter Kontroll- und Ang II-Bedingungen wiesen auch hier die Weibchen ein leicht reduziertes Körpergewicht im Vergleich zu den Männchen auf (Abb. 39). Signifikant verschieden sind die geschlechtsabhängigen Körpergewichte bei PPP3CB KO Tieren. In der Kontrollgruppe, als auch der Ang II Gruppe, besaßen weibliche KO Tiere ein reduziertes Körpergewicht im Vergleich zu den Männchen der gleichen Gruppe (Abb. 39,  $p < 0,001$ ).

Bei allen Tieren dieser Versuchsreihe wurden die Organengewichte bestimmt.

#### 4.4.2. Organgewichte bei chronischer Angiotensin II-Stimulation von PPP3CB WT und KO Mäusen

PPP3CB WT und KO Mäuse wiesen keine Unterschiede in Bezug auf das Gesamtherzgewicht auf. WT Mäuse wiesen basal ein Herzgewicht von  $5,59 \pm 0,28$  mg/g auf, KO Mäuse hingegen  $5,15 \pm 0,23$  mg/g (Abb. 40).

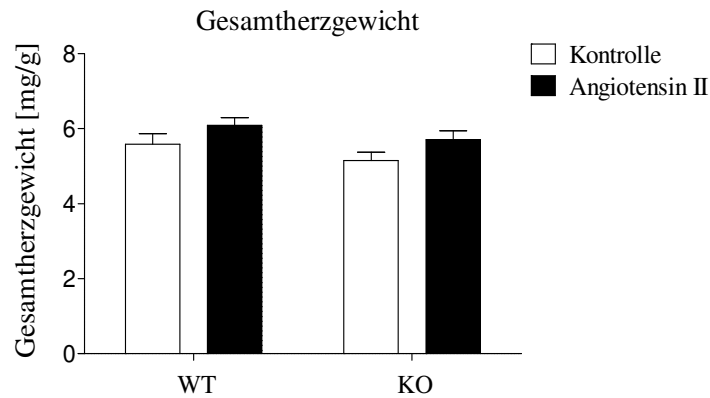


Abb. 40: Gesamtherzgewicht von PPP3CB WT und KO Mäusen nach chronischer Ang II-Stimulation (Kontrolle:  $N_{WT/KO} = 10/12$ ; Ang II:  $N_{WT/KO} = 15/14$ ).

Unter Kontrollbedingungen wiesen PPP3CB WT Tiere mit  $37,14 \pm 1,72$  mg/g und KO Tiere mit  $36,04 \pm 1,45$  mg/g keine Unterschiede in Bezug auf das Lebergewicht auf. Unter Einfluss von Ang II hingegen reduzierte sich das Lebergewicht von PPP3CB WT ( $32,32 \pm 0,4$  mg/g;  $p = 0,01$ ) und PPP3CB KO Tieren ( $31,95 \pm 0,79$  mg/g;  $p = 0,05$ ; Abb. 41). Das Organgewicht von Lunge, Milz und Nieren wies zwischen WT und KO Mäusen keine Unterschiede basal oder nach Ang II-Stimulation auf (Abb. 41-44).

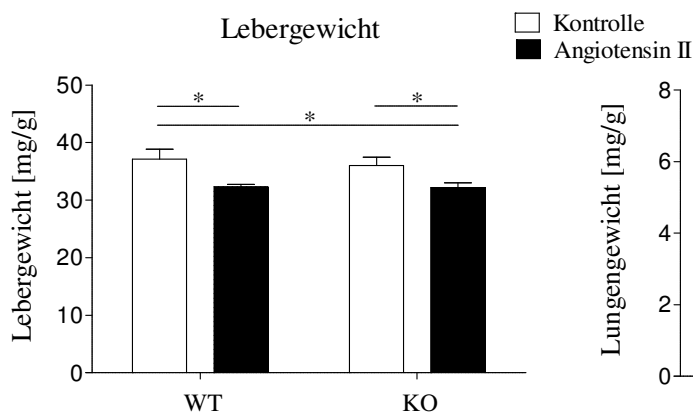


Abb. 41: Lebergewicht von PPP3CB WT und KO Mäusen nach chronischer Ang II-Stimulation (Kontrolle:  $N_{WT/KO} = 14/16$ ; Ang II:  $N_{WT/KO} = 15/17$ ;  $p_1 = 0,01$ ;  $p_2 = 0,02$ ;  $p_3 = 0,05$ )

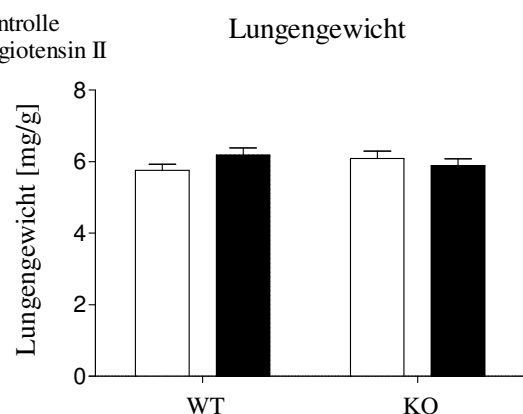


Abb. 42: Lungengewicht von PPP3CB WT und KO Mäusen nach chronischer Ang II-Stimulation (Kontrolle:  $N_{WT/KO} = 13/16$ ; Ang II:  $N_{WT/KO} = 17/13$ )

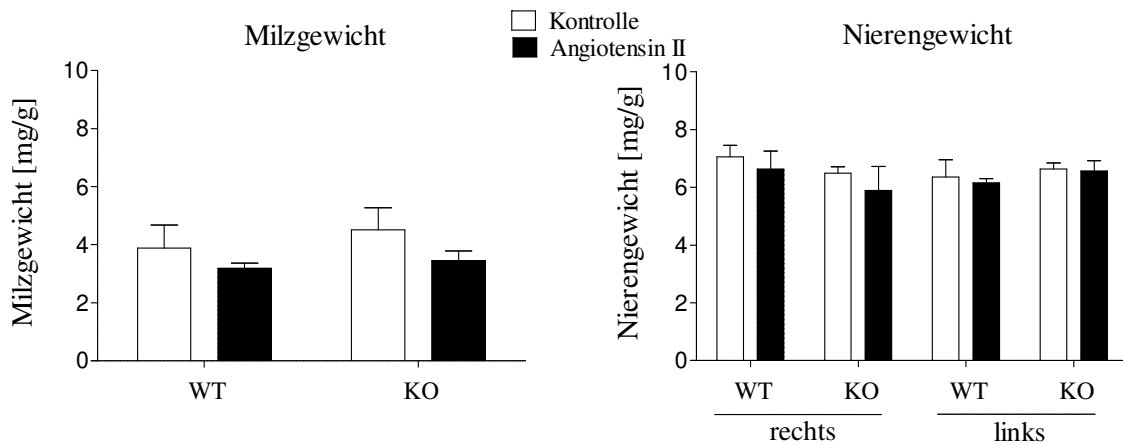


Abb. 43: Milzgewicht von PPP3CB WT und KO Mäusen nach chronischer Ang II-Stimulation (Kontrolle:  $N_{WT/KO} = 13/16$ ; Ang II:  $N_{WT/KO} = 17/10$ )

Abb. 44: Nierengewicht von PPP3CB WT und KO Mäusen nach chronischer Ang II-Stimulation (Kontrolle:  $N_{WT/KO} = 13/17$ ; Ang II:  $N_{WT/KO} = 17/12$ )

erfolgte die Implantation osmotischer Minipumpen, die Angiotensin II dosiert abgeben. Danach wurde der systolische Blutdruck von WT und KO Tieren über vier Wochen aufgezeichnet. Die Mäuse der Kontrollgruppe von WT und KO erhielten keine Pumpen, jedoch aber die gleiche Anästhesie wie die Angiotensin II-Gruppe. Unter Kontrollbedingungen änderte sich der Blutdruck der WT und KO Kontrolltiere während der Aufzeichnungsphase nicht. Werden Männchen und Weibchen getrennt analysiert, weisen diese Gruppen sowohl geschlechtsspezifische als auch Genotyp spezifische Unterschiede im Rahmen der chronischen Ang II-Behandlung auf (Abb. 45, 46).

Unter basalen Bedingungen wurde bei den weiblichen WT Mäusen kein Unterschied in Bezug auf den mittleren Blutdruck, im Vergleich zu männlichen Tieren, gemessen. Weibliche Kontrolltiere besaßen einen Blutdruck von  $110,12 \pm 3,13$  mmHg, männliche Kontrolltiere  $103,89 \pm 4,44$  mmHg (Abb. 45, 46).

In männlichen WT Mäusen wurde unter Ang II-Gabe ein höherer Blutdruck, im Vergleich zu weiblichen WT Tieren, gemessen. Dabei stieg der Blutdruck von männlichen WT Tieren auf einen Durchschnittswert von  $141,63 \pm 2,59$  mmHg. WT Weibchen hingegen wiesen einen Blutdruck von  $123,6 \pm 2,69$  mmHg auf, der sich mit  $p < 0,001$  signifikant von männlichen Mäusen unterschied. Bei Betrachtung des Blutdruckverlaufes innerhalb von vier Wochen waren ebenfalls Unterschiede in der Reaktion auf Ang II messbar.



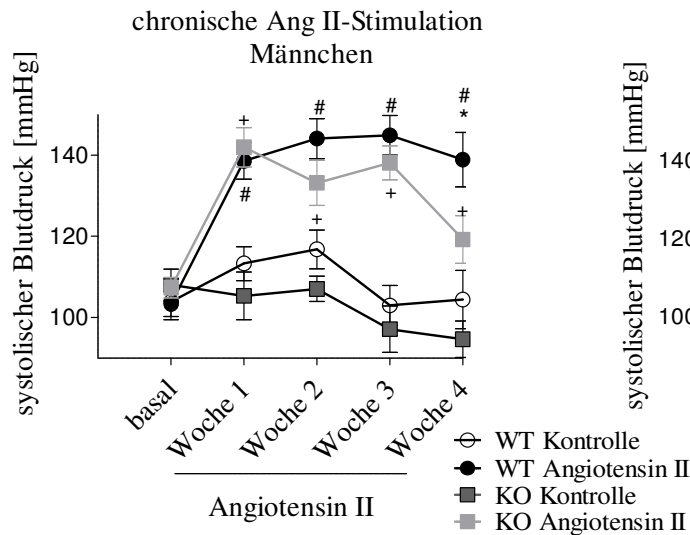


Abb. 45: Verlauf des systolischen Blutdrucks als Mittelwert pro Woche von männlichen PPP3CB WT und KO Tieren bei chronischer Ang II-Stimulation (N = 6-8, n = 10-35; \* WT - KO Ang II, p = 0,04; # WT Kontrolle - WT Ang II, p<sub>1-3</sub> < 0,001; p<sub>4</sub> = 0,002; + KO Kontrolle - KO Ang II, p<sub>1-2</sub> ≤ 0,001; p<sub>3</sub> = 0,008; p<sub>4</sub> = 0,002).

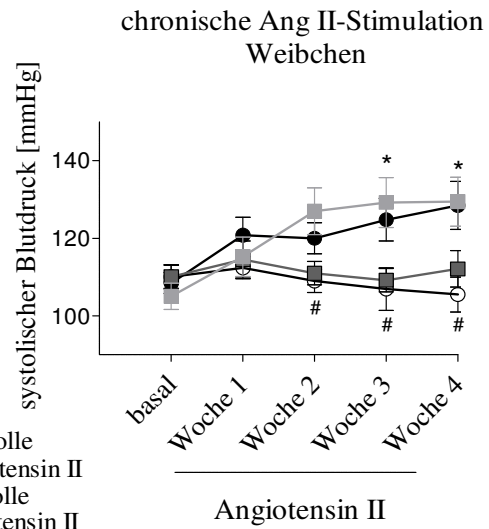


Abb. 46: Verlauf des systolischen Blutdrucks als Mittelwert pro Woche von weiblichen PPP3CB WT und KO Tieren bei chronischer Ang II-Stimulation (N<sub>WT/KO</sub> = 6/9, n = 16-40; \*WT Kontrolle – WT Ang II, p<sub>1</sub> = 0,03; p<sub>2</sub> = 0,006; # KO Kontrolle – KO Ang II, p<sub>1</sub> = 0,03; p<sub>2</sub> = 0,008; p<sub>3</sub> = 0,03).

Weibliche Mäuse zeigten eine geringe Veränderung des mittleren systolischen Blutdrucks bei Angiotensin II-Infusion (WT: 120,85 ± 4,63 mmHg, KO: 115,2 ± 5,07 mmHg) verglichen mit männlichen Tieren (WT: 138,57 ± 4,48 mmHg, KO: 141,97 ± 4,85 mmHg, Abb. 45, 46). Bei männlichen PPP3CB WT Tieren stieg der systolische Blutdruck innerhalb einer Woche an und blieb erhöht, während der bei den PPP3CB KO Tieren nach initialem Blutdruckanstieg wieder abnahm.

#### 4.4.4. Gefäßveränderungen in Aorten von PPP3CB WT und KO Mäusen nach chronischer Angiotensin II-Applikation

Nach der Blutdruckmessung bei chronischer Ang II Applikation wurden die Aorten entnommen und in Paraffin eingebettet (Abb. 47). Histologische Schnitte wurden angefertigt und hinsichtlich der Mediadicke und Lumenfläche quantifiziert.

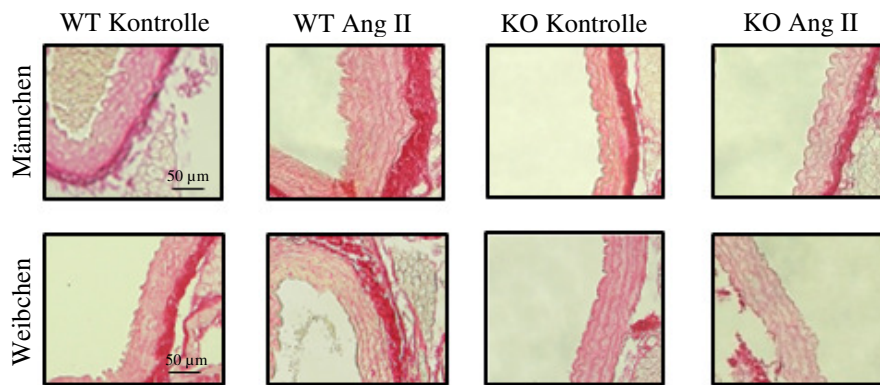


Abb. 47: Sirius Red Färbung von Paraffinschnitten von Aorten von männlichen und weiblichen PPP3CB WT und KO Mäusen nach chronischer Angiotensin II-Applikation (Kontrolle:  $N_{WT/KO} = 16$ ; Ang II:  $N_{WT/KO} = 16/15$ ).

#### 4.4.5. Geschlechtsspezifische Gefäßveränderungen von PPP3CB WT und KO Mäusen nach chronischer Angiotensin II-Applikation

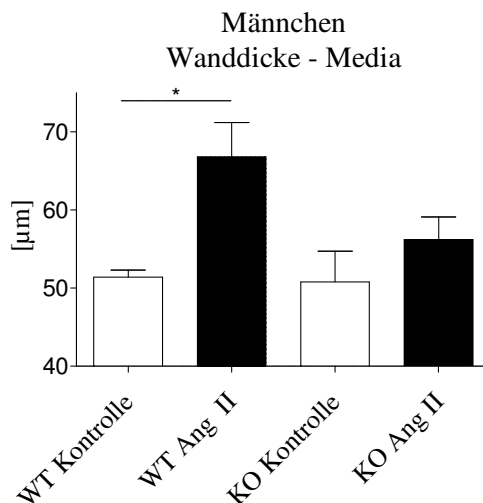


Abb. 48: Dicke der Aortenwand von männlichen PPP3CB WT und KO Mäusen nach chronischer Ang II Stimulation (Kontr.:  $N_{WT/KO} = 16/16$ ; Ang II:  $N_{WT/KO} = 16/15$ ;  $p = 0,02$ ).

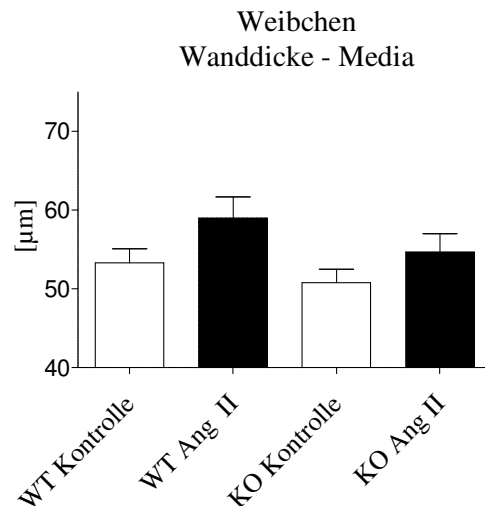


Abb. 49: Dicke der Aortenwand von weiblichen PPP3CB WT und KO Mäusen nach chronischer Ang II-Stimulation (Kontr.:  $N_{WT/KO} = 16/16$ ; Ang II:  $N_{WT/KO} = 16/15$ ).

In Bezug auf die Abbildungen 48 bis 53 zeigten sich geschlechtsspezifische Unterschiede. Während bei den Aorten der männlichen Mäuse der Angiotensin II-Effekt zu einer größeren Wanddicke von  $66,8 \pm 4,4 \mu\text{m}$  führte ( $p = 0,02$ ), lag der Wert der Weibchen bei  $58,1 \pm 2,5 \mu\text{m}$  und wies keine Signifikanz auf. Männliche Aorten von KO Mäusen mit Ang II Behandlung besaßen eine Mediadicke von  $56,2 \pm 2,9 \mu\text{m}$ , welche sich von der Kontrolle mit  $51,4 \pm 0,9 \mu\text{m}$  nicht unterschied (Abb. 48). Bei den weiblichen KO Aorten war keine Veränderung der Mediadicke zu beobachten (Abb. 49).

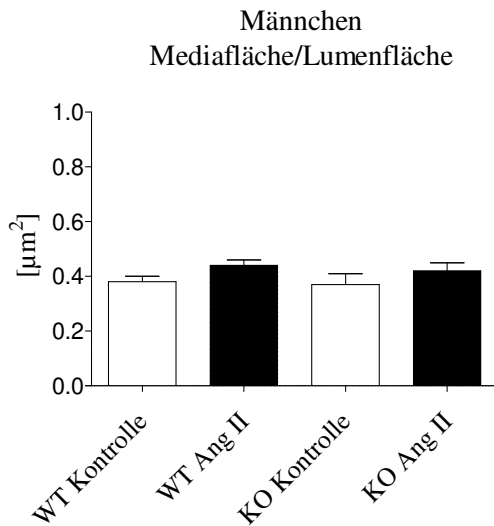


Abb. 50: Verhältnis von Media- zu Lumenfläche von männlichen PPP3CB WT und KO Tieren nach chronischer Ang II-Stimulation (Kontr.:  $N_{WT/KO}=16/16$ ; Ang II:  $N_{WT/KO}=16/15$ ).

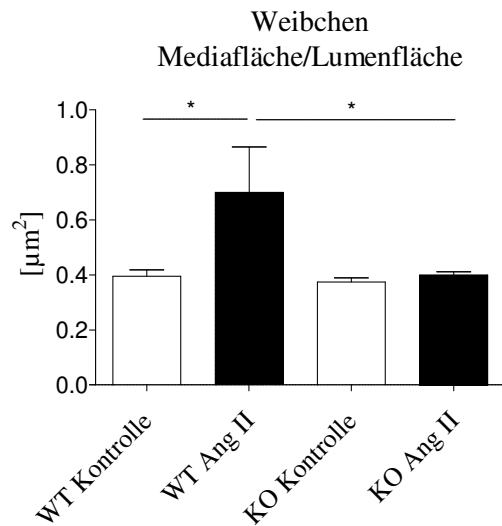


Abb. 51: Verhältnis von Media- zu Lumenfläche von weiblichen PPP3CB WT und KO Tieren nach chronischer Ang II-Stimulation (Kontr.:  $N_{WT/KO}=16/16$ ; Ang II:  $N_{WT/KO}=16/15$ ;  $p_{1,2}=0,01$ ).

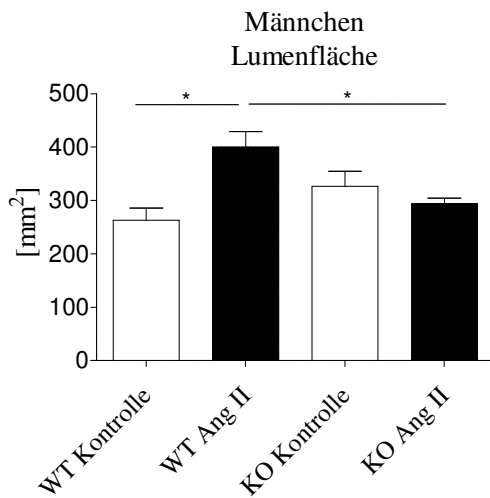


Abb. 52: Lumenfläche von männlichen PPP3CB WT und KO Tieren nach chronischer Ang II-Stimulation (Kontr.:  $N_{WT/KO}=16$ ; Ang II:  $N_{WT/KO}=16/15$ ;  $p_1=0,01$ ;  $p_2=0,03$ ).

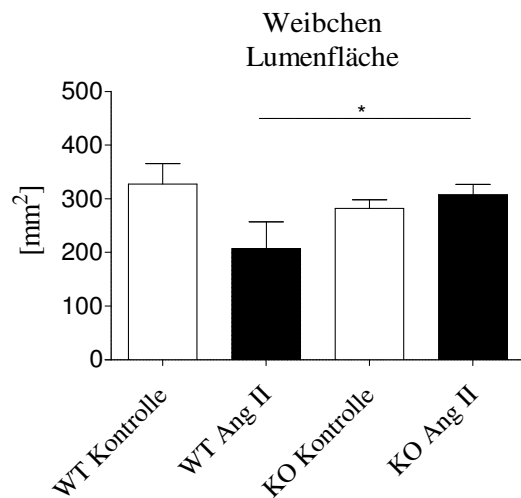


Abb. 53: Lumenfläche von weiblichen PPP3CB WT und KO Tieren nach chronischer Ang II-Stimulation (Kontr.:  $N_{WT/KO}=16/16$ ; Ang II:  $N_{WT/KO}=16/15$ ;  $p=0,03$ ).

Während die Media- zu Lumenfläche bei männlichen Tieren aller Gruppen keine Veränderung aufwies, zeigte sich bei weiblichen Tieren eine Zunahme dieses Verhältnisses in der WT Gruppe unter Einfluss von Angiotensin II. Dabei stieg die Ratio auf  $0,7 \pm 0,17 \mu\text{m}^2$ , die Kontrolle lag bei  $0,4 \pm 0,02 \mu\text{m}^2$  ( $p=0,01$ ; Abb. 50, 51). Bei Betrachtung der Lumenfläche verhielten sich Aorten von männlichen und weiblichen PPP3CB WT und KO Mäusen

verschieden. Aortenlumen aus der männlichen Kontrollgruppe besaßen eine Lumenfläche von  $261,91 \pm 22,32 \text{ mm}^2$ , die der Angiotensin II-Gruppe eine signifikant höhere Fläche von  $400,17 \pm 29,07 \text{ mm}^2$  ( $p_1 = 0,01$ ; Abb. 52). Unter Einfluss von Ang II wiesen Aorten weiblicher KO Mäuse dagegen eine Vergrößerung der Lumenfläche ( $307,35 \pm 19,14 \text{ mm}^2$ ) auf ( $p = 0,03$ ; Abb. 53).

Ein Teil der Aorten der Mäuse aus der Langzeit-Blutdruckmessung wurde für mRNA-Analysen mittels Bead Array verwendet.

#### 4.4.6. Transkriptomanalyse von PPP3CB WT und KO Tieren mittels Illumina Bead array

Mit Hilfe dieses Arrays können Rückschlüsse über die relative Intensität der Expression bestimmter Genabschnitte gezogen werden. Es ermöglicht die Erstellung von Expressionsprofilen von einer Vielzahl an unterschiedlich stark exprimierten Genen. Um zu untersuchen, ob es Unterschiede in der RNA Expression zwischen PPP3CB WT und PPP3CB KO Mäusen gibt, wurde mRNA aus den Aorten dieser Tiere, die aus dem Blutdruckmessverfahren über vier Wochen stammten, eingesetzt. Zu Beginn wurden regulierte Gene von WT und KO Mäusen unter Kontrollbedingungen verglichen. Danach wurde die Genexpression der WT Mäuse unter Kontrollbedingungen mit der nach Ang II-Applikation verglichen. Anschließend erfolgte die Analyse der Gene von KO Mäusen, die unter gleichen Bedingungen mit denen der WT Tiere verglichen wurden. Diese Clusteranalyse dient der Identifizierung von veränderten Expressionsmustern der WT und KO Mäuse unter Kontrollbedingungen und unter Einfluss von Ang II. Im Anschluss wurde für die Identifizierung von Genen, die an Gefäßveränderungen beteiligt sind, ein Gene Ontology enrichment analysis and visualization tool verwendet. Regulierte Genprodukte waren die, die einen Expressionsfaktor von  $\geq 1,5$  oder  $\leq 0,67$  besaßen und eine Effektstärke Cohen d von  $\geq 2$  und  $\leq -2$ . Zwischen männlichen PPP3CB WT und KO Tieren gab es unter Kontrollbedingungen wenig regulierte Gene. Von diesen Genen waren in männlichen Tieren 168 hoch und 36 Gene herunter reguliert. Funktionelle GO-Term Enrichment Analysen mit g:Profiler ergaben eine Anreicherung des GO-Terms Proteinbindung (Link: <https://biit.cs.ut.ee/gprofiler/gost>; Tab. 12).

Tab. 12: Kategorisierung regulierte Gene männlicher WT und KO Mäuse unter Kontrollbedingungen

Molekulare Funktion	korrigierter p-Wert	identifizierte Gene
Proteinbindung	0,0001	ADRA2A, IFNGR2, PRF1, COTL1, C8B, CLEC3B, IL18BP, PECAM1, ZBP1, PLCG2, ADCY4, C4B, STXBP5L, GOLGA2, SOX17, TCOF1, OASL2, NOS3, AIF1, NR1D2, BRD2, ECE1, HEXA, CLDN5, WDR13, FXYD5, GATA2, LMO2, WIPF2, CD34, DTNB, CHKA, NOTCH4, FBLN2, SRRM2, KLHL6, UBOX5, ICAM2, POLE3, CAMKK2, TEF, RGS10, PKN3, S100A10, ARPC1B, IGF2, DEDD2, ABCB9, ATP2A3, GRASP, RFC5, DDIT3, RP9, CCND1, TIAM1, CAPG, CDK10, GBA, SNX8, PTPRB, COMP, IFIT3, PREB, ICAM1, CASP1, TCIRG1, ORAI1, DNAJC7, BICC1, IGFBP4, PIK3R1, ZBTB2, LY6A, RALB, CCL11, STX4A, ZFAND2B, C3, CAPN1, TERF2IP, THY1, CCL9, HGS, PLEKHG5, ELMO1, NDE1, RHOB2, TAP2, SMARCD2, TMSB10, AUP1, IRF1, BNIP3L, IFT20, BRMS1, MMP2, CCDC85B, SNX21, COPA, ARPP19, SNX18, ANP32E, JAK2, AKT3, UCK2, LMOD1, BMPR1A, RGS7, ANLN, SERPINE2, SLC22A1, KCNAB1, PPP3CB, KLHL26

Kategorisierung nach molekularen Funktionen der mit gProfiler identifizierten regulierten Gene von männlichen PPP3CB WT und KO Mäusen unter Kontrollbedingungen. s: Tab13

Bei weiblichen PPP3CB WT und KO Tieren hingegen wurden unter Kontrollbedingungen mehr regulierte Gene identifiziert als bei männlichen Tieren. Dabei waren unter den angelegten Kriterien und unter Kontrollbedingungen 77 hoch und 154 Gene herab reguliert. Diesen Genen konnte mit G-Profiler kein vermehrt auftretender GO-Begriff zugeordnet werden.

Anschließend wurden diese Tiere mit Angiotensin II stimuliert. Im bead array ergaben sich Genotyp spezifische Unterschiede in der Genexpression bei Stimulation mit Ang II. Es wurden Gene analysiert, die bei WT Mäusen Angiotensin-abhängig reguliert waren, bei KO Mäusen aber keine Expressionsveränderungen nach Angiotensin-Stimulation zeigten.

Für die Identifizierung von Genen, die Einfluss auf Gefäßveränderungen nehmen können, wurden diese Ergebnisse des bead array ebenfalls mit einem Gene Ontology enrichment analysis analysiert (Tab. 13). Der exakte Enrichment p-Wert ist ein von G-Profiler berechneter Wert nach der mHG-Methode für Enrichmentanalysen und bezieht sich auf die identifizierte Genanreicherung. Die *false-discovery-rate* (FDR) ist das Verhältnis der falsch negativ identifizierten Gene zu allen negativ identifizierten Genen und stellt eine nicht exakte Korrektur des p-Wertes nach Benjamini und Hochberg für multiple Testung dar.

In männlichen Tieren waren 101 Gene unter Einfluss von Angiotensin II vermehrt und 108 Gene vermindert exprimiert. Bei weiblichen Tieren hingegen wurden 114 hoch regulierte Gene und 53 runter regulierte Gene identifiziert. Gene, die auch in PPP3CB KO Mäusen unter Einfluss von Angiotensin II reguliert waren, wurden nicht in die Analyse einbezogen. Männliche PPP3CB WT Mäuse wiesen unter Einfluss von Angiotensin II eine größere Signifikanz ( $p < 0,001$ ) des Enrichments auf als weibliche Tiere ( $p = 0,03/0,04$ ; Tab. 13, 14).

Tab. 13: Enrichment-Analyse von männlichen PPP3CB WT Mäusen nach chronischer Ang II-Stimulation

<b>Molekulare Funktion - Männchen</b>	<b>korrigierter p-Wert</b>	<b>identifizierte Gene</b>
Proteinbindung	< 0,0001	SPHK1, SRA1, IFT20, TBL2, ESM1, AHNAK2, TRIP12, DNAJC2, SRI, VCAM1, NDFIP2, S100A10, PHACTR1, SLC31A1, TUBB2B, CYB5R3, RGS7, HSPB1, SPAST, DAP, CSNK1E, HBEGF, DDX1, TPM4, BOP1, GSTP1, PPIC, NLGN2, NFKBIZ, SLK, PFKM, PJA1, ANKRD1, SLC39A13, UHRF1BP1L, TNC, HSPE1, COMP, ITGA5, IL16, TIAM1, GAB1, PRDX4, GJA1, KCNAB1, UTP6, NEDD9, PBRM1, UBL7, BMPR1A, SPARCL1, COL18A1, COPS2, FHL2, RAI14, COL1A1, ANGPT2, CD248, NDST1, CAMK2N1, STK38L, GORASP2, VLDLR, SH3PXD2B, ATF4, CBR2, HSPA2, STYX, ITIH4, ABCC9, UNC5C, CD47, NUBP1, RCSL1, RBPMS, OGN, NAB1, GAPVD1, SEMA5A, FBN1, RDH5, RAB14, TERF2, SERBP1, TMEM98, KANK1, C1QTNF2, MYH10, PFDN5, SETD1B, RRAS2, ANKLE2, TGFB3, IFT81, GAMT, DUSP16, DAPK2, LIMA1, COL4A1, GPD1, BICD2, PCCA, CCL27, PTPRD, NTRK3, PHPT1, MAT2A, GSTT1, GSTM1, ST5, PPP1R3C, CYHR1, IGFBP5, ANP32A
Extrazellulärmatrix Strukturbestandteil	< 0,0001	TNC, COMP, COL18A1, COL1A1, DPT, OGN, FBN1, COL4A2, COL4A1

Kategorisierung der mit der funktionellen Enrichment-Analyse identifizierten regulierten Gene von männlichen PPP3CB WT Mäusen nach chronischer Ang II-Stimulation, die bei KO Tieren in ihrer Expression nicht verändert waren ( $N_{\text{Gene}} = 209$ , alle Gene:  $p < 0,001$ ;  $FDR < 0,001$ ).

Tab. 14: Enrichment-Analyse von weiblichen PPP3CB WT Mäusen nach chronischer Ang II-Stimulation

<b>Molekulare Funktion - Weibchen</b>	<b>korrigierter p-Wert</b>	<b>identifizierte Gene</b>
Proteinbindung	0,029	COL4A2, COL18A1, COL1A1, COL6A1
Kinaseaktivität	0,04	DOLK, ULK2, NME1, LMTK2, STK38L, UBOX5, DGKZ, CDK10, NAGK, CAMKK2, CHKA, BMPR1A, CDKN1A, PAK4, ACVR2B, AK3
Protein-Komplexbindung	0,04	PTPRA, EIF2A, SPCS1, BOP1, NME1, ITGA5, BCAP31, ARPC1B, ITGB4, MYO1C, COL6A1, ABCF1, GNAO1, SMG6, AEBP1, CDKN1A, DBNL, UHRF1BP1L, ACVR2B, MYO18A

Kategorisierung der mit der funktionellen Enrichment-Analyse identifizierten regulierten Gene von weiblichen PPP3CB WT Mäusen nach chronischer Ang II-Stimulation, die bei KO Tieren in ihrer Expression nicht verändert waren ( $N_{\text{Gene}} = 167$ ,  $p = 0,029/0,04$ ;  $FDR < 0,001$ ).

Zu den identifizierten Genen, die bei männlichen und weiblichen PPP3B WT Mäusen unter Einfluss von Ang II reguliert waren, nicht jedoch bei KO Tieren, gehörte Col1a1, Col4a2 und Col18a1. Nur in männlichen PPP3CB WT Tieren führte Angiotensin II zu einer Regulation von Col4a1, das eine wichtige Rolle bei der Funktionalität der Aorta, Angiogenese, Zellmigration und Zellproliferation spielt.

Weibliche PPP3CB WT Mäuse wiesen unter Einfluss von Ang II eine Hochregulation von Col6a1 auf. Col6a1 ist in der Extrazellulärmatrix lokalisiert und dient der Aufrechterhaltung der strukturellen Integrität von Zellen und Geweben.

## 5. Diskussion

Über die pathologische Wirkung des Calcineurin/NFAT-Signalweges ist bekannt, dass dessen Inhibierung eine Reduktion hypertropher Antwortsignale bewirken oder eine Hypertrophieentwicklung in transgenen Mäusen verzögern kann [26]. Vasoaktive Substanzen, wie Angiotensin II, sind an der Entstehung reno-kardiovaskulärer Erkrankungen beteiligt [133-135]. Diese führen beispielsweise zu Endothelschädigung, Fibrosierung und Entzündungsprozessen [26, 52, 124-134]. Cyclosporin beispielsweise kann Organschäden an Herz und Nieren verhindern [5, 7]. In dieser Arbeit sollte der Effekt von Calcineurin insbesondere von PPP3CB in der Aorta unter basalen Bedingungen und unter Einfluss von Angiotensin II untersucht werden.

Im aktivierten Zustand ist die Phosphatase Calcineurin in der Lage verschiedene Hypertrophie-relevante Transkriptionsfaktoren, wie CREB und NFATs, zu dephosphorylieren [136, 137]. Molkenkin et al. konnte ebenfalls eine Calcineurinabhängigkeit in Bezug auf Herzhypertrophie bestätigen [138, 139]. Weitere Studien zeigten, dass Calcineurin sowohl pathophysiologische hypertrophe Antwortsignale als auch Remodelingprozesse im Herz vermitteln kann [138]. Taigen und Haq et. al. bewiesen eine signifikante Stimulus induzierte Erhöhung des mRNA- und Proteinniveaus von PPP3CB im Herz, was auf eine Isoform-spezifische Regulation einer hypertrophen Antwort schließen ließ [139, 140]. Auch in neonatalen Rattenkardiomyozyten konnte eine erhöhte PPP3CB mRNA- und Proteinexpression durch hypertrophe Stimulation mit Angiotensin II nachgewiesen werden [139]. Wilkins et al. untersuchte Calcineurin als Regulator von Hypertrophie in Kardiomyozyten. Auch weitere Literatur beschreibt die Hemmung der Herzhypertrophie durch den Einsatz von Calcineurin Inhibitoren wie zum Beispiel Cyclosporin A oder FK506 [26]. Durch Charakterisierung von PPP3CB KO Mäusen ist es möglich, die pathophysiologische Rolle von Calcineurin speziell der Untereinheit PPP3CB zu beurteilen.

In dieser Arbeit konnte durch Einsatz von Mäusen mit Knockout von PPP3CB der Einfluss auf pathophysiologische Gefäßveränderungen nach Angiotensin II-Gabe gezeigt werden.

Dies wurde zum Beispiel durch Blutdruckmessungen und der Quantifizierung der Aortenring-Parameter unter Einfluss von Angiotensin II nachgewiesen.

### 5.1. Vergleich der PPP3CB KO Mäuse mit WT unter basalen Bedingungen

Zum Ausschluss einer möglichen Veränderung des Volumenhaushaltes wurde die Flüssigkeitsaufnahme von PPP3CB WT und KO Tieren analysiert. Die Flüssigkeitsaufnahme spielt eine wichtige Rolle in der Regulation der Nierenfunktion. Die Nieren können über den Salz- und Wasserhaushalt den Blutdruck beeinflussen. Das RAAS System besitzt jedoch Effektormoleküle wie Angiotensin II, welches bei nicht adäquater Aktivierung pathophysiologische Effekte vermitteln kann und somit das renokardiovaskuläre System betreffen. Dort führen sie zu sekundären Endorganschädigungen von Nieren und Herz [141-143]. WT und KO Tiere zeigten keine Unterschiede in der Flüssigkeitsaufnahme, sodass kein Anhaltspunkt für einen unterschiedlichen Volumenhaushalt vorlag.

Für die Untersuchung der Deletion von PPP3CB wurden sechs Monate alte KO Mäuse mit gleichaltrigen WT Tieren verglichen und basal charakterisiert. Bueno et al. konnte männliche PPP3CB KO Mäuse bereits hinsichtlich ihres basalen Phänotyps charakterisieren. Die Tiere waren acht Wochen alt und wiesen eine 10 % ige Reduktion des Körpergewichtes auf [4]. Der Befund eines signifikant reduzierten Körpergewichtes konnte mit 4,68 % Gewichts Differenz zu WT Tieren in männlichen PPP3CB KO Tieren nicht bestätigt werden. Ein Grund dafür könnte das Alter der in dieser Arbeit eingesetzten Mäuse sein. Laut Literatur ist bekannt, dass sich nach dem Absetzen der Jungtiere die Milchleistung der Mutter auf das Wachstum der Nachkommen auswirkt [193]. Brumby et al. konnten einen maternalen Einfluss auf die Nachkommen bis zum dritten Lebensmonat nachweisen [125]. Möglicherweise ist eine Reduktion des Körpergewichtes von PPP3CB KO Mäusen nur bis zum dritten Lebensmonat nachweisbar.

Im Rahmen der Organentnahme von WT und KO Mäusen wurde auch die Aorta als größtes Gefäß entnommen, eingebettet und histologisch untersucht. Für das Verhältnis von Media- zu Lumenfläche ist bekannt, dass sich dieser Quotient bei Bluthochdruck in Arteriolen und kleinen Gefäßen erhöhen kann [144, 145]. PPP3CB KO Mäuse unterschieden sich unter basalen Bedingungen, in Bezug auf das Verhältnis von Media- zur Lumenfläche, nicht. Aus diesem Grund scheint die Deletion von PPP3CB keinen Einfluss auf den Wandaufbau der Aorta unter Basalbedingungen zu haben.

Ein Teil der entnommenen Organe wurde für mRNA Analysen verwendet und die Expression der Untereinheiten PPP3CA und PPP3CB quantifiziert. Diese Messung zeigte, dass es unter basalen Bedingungen keine Unterschiede in der mRNA Expression der Organe Gehirn, Herz, Leber, Niere und Aorta von WT und KO Tieren in Bezug auf PPP3CA, gab. Damit konnte ausgeschlossen werden, dass gefäßspezifische Effekte in PPP3CB KO Tieren durch PPP3CA zustande kamen.



In den Organen der PPP3CB KO Mäuse konnte die mRNA von PPP3CB mittels qPCR nicht nachgewiesen werden, dies bestätigt den vollständigen Knockout. Somit können Effekte von PPP3CB nicht nur lokal sondern auch für den Gesamtorganismus beschrieben werden, besonders in den Gefäßen. In diesen, speziell der murinen Aorta, war keine PPP3CB mRNA Expression nachweisbar, während PPP3CA in Aorten von KO Mäusen eine gleichmäßige Expression, verglichen mit WT, aufweist. Damit konnte der ubiquitäre Knockout auch im Gefäßsystem bestätigt werden.

Ein weiterer Teil der Aorta wurde für die Untersuchung von Entzündungs- und Fibrosemarkern mittels qPCR verwendet. Untersuchte Fibrosemarker wie Col1a1, Col3a1, Col4a1 und Fn-1 waren unter basalen Bedingungen nicht reguliert. Entzündungsparameter wie MCP-1, CCL-5 oder SPP-1, zeigten ebenfalls keine unterschiedliche mRNA Expression. Jedoch war der Entzündungsmarker PAI-1 2,94-fach in der mRNA aus Aorten von PPP3CB KO Mäusen, im Vergleich zu WT Tieren, reduziert. Für PAI-1 ist bekannt, dass eine erhöhte Expression häufig mit Insulinresistenz und Bluthochdruck assoziiert ist [146]. Dabei handelt es sich um einen Serine/Cysteine Peptidase Inhibitor, Member 1, welcher an der Hemmung der Fibrinolyse beteiligt ist und intravaskuläre Thrombenbildung fördert. Dabei wird Plasminogen in Plasmin umgewandelt. Plasmin wiederum dient dem Abbau von Fibrinpolymeren. Wird dieser Abbau verhindert können Thromben nicht mehr aufgelöst werden. Der Abbau zu Fibrinogen spielt eine wichtige Rolle beispielsweise bei Gefäßverletzungen [147, 148]. PAI-1 fördert den Verbleib von Blutgerinnseln und bewirkt eine Gefäßverstopfung. Eine erhöhte Expression von PAI-1 könnte auf eine erhöhte Neigung zur Thrombenbildung in Gefäßen von PPP3CB KO Mäusen hinweisen.

Es ist bekannt, dass Calcineurin pathophysiologische Wirkungen über die Regulation von Transkriptionsfaktoren wie CREB vermittelt [51, 149-151]. Aufgrund seiner Phosphataseaktivität ist Calcineurin in der Lage dessen Phosphorylierungsstatus zu verändern [136]. Es waren keine Unterschiede in der Expression von CREB oder der Phosphorylierung von CREB in Aorten von PPP3CB WT und KO Mäusen nachweisbar. Möglicherweise sind die Unterschiede für den Nachweis mittels SDS-Page nicht stark genug ausgeprägt, da pCREB das schwächer exprimierte Protein, im Vergleich zu CREB, ist. Aufgrund der fehlenden bzw. verminderten Phosphataseaktivität in KO Tieren wäre eine höhere Phosphorylierung von CREB in diesen Aorten denkbar gewesen, wobei allerdings die noch vorhandene PPP3CA-Aktivität berücksichtigt werden muss.

Wie in verschiedenen Studien gezeigt werden konnte, stellt PPP3CB eine wichtige Verknüpfung zu hypertrophen Antwortsignalen im Herzen dar, was experimentell durch Blutdruckuntersuchungen an diesen Tieren unter Isoproterenol-Behandlung gezeigt werden konnte [84].

Um zu untersuchen, ob PPP3CB KO Mäuse in Bezug auf basale Blutdruckparameter Unterschiede aufweisen, wurde mittels Millar Katheter der Blutdruck intravasal gemessen.

Einer dieser Parameter ist der systolische Blutdruck, welcher dem maximalen Druck während der Auswurfphase der linken Herzkammer entspricht [227]. Dieser unterschied sich zwischen PPP3CB WT und KO Tieren nicht, sodass davon ausgegangen werden kann, dass PPP3CB KO Mäuse keine basal verschiedene Druckbelastung auf das periphere Gefäßsystem in der Auswurfphase besitzen. Ein weiterer Parameter ist der diastolische Blutdruck als Maß für den totalen peripheren Widerstand der Gefäße. Da auch hier keine Unterschiede zwischen WT und KO Tieren messbar waren, wurde deutlich, dass PPP3CB basal zu keinen unterschiedlichen Blutdrücken führte.

## 5.2. Vergleich von aVSMCs aus PPP3CB KO Mäusen mit WT unter basalen Bedingungen

Um die Deletion von PPP3CB auch auf zellulärer Ebene zu charakterisieren, wurden VSMCs aus der murinen Aorta isoliert und kultiviert. Für die Sicherstellung, dass auch VSMCs und nicht Fibroblasten, die Bestandteil der Bindegewebsschicht sind, für Versuche eingesetzt wurden, erfolgte zu Beginn eine Immunfluoreszenzfärbung. Diese dient der Detektion von VSMC-spezifischen  $\alpha$ SM-Aktin, welches vorrangig in glatten Gefäßmuskelzellen als Bestandteil des Zytoskeletts vorhanden ist [152, 153]. Das  $\alpha$ -SMA besitzt eine mechanische Stützfunktion und beeinflusst Zellform und -bewegung [154]. Es ist bekannt, dass unter anderem NFaT3, welches durch Calcineurin reguliert werden kann, zu einer Erhöhung der  $\alpha$ -SMA Expression führt [155, 156]. Daher war es notwendig zu untersuchen, ob basal der gleiche Phänotyp vorliegt. Nach spezifischer Färbung mit Antikörpern war keine unterschiedlich starke Ausprägung von  $\alpha$ -SMA erkennbar. Unterschiede im Phänotyp von aVSMCs konnten nicht festgestellt werden.

Für die Bestätigung des globalen Knockouts wurde die Deletion PPP3CB durch Proteinnachweise in isolierten VSMCs bekräftigt. Dabei war PPP3CB in KO VSMCs nicht nachweisbar, was die Ergebnisse der qPCR untermauert.

Es konnte bereits gezeigt werden, dass PPP3CB nach Translokation in den Zellkern dort Transkriptionsfaktoren, wie CREB, inaktivieren kann [136, 149, 150]. Dabei war eine leichte Tendenz der KO Lysate zu einer erhöhten pCREB Expression quantifizierbar. KO Tiere besitzen mit globalem Knockout eine geringere Phosphataseaktivität im Herz als WT Tiere [4]. Dadurch ist ein geringerer Dephosphorylierungsgrad von CREB denkbar, was eine erhöhte pCREB Expression zur Folge hätte. Die noch aktive PPP3CA scheint hier die Dephosphorylierung anzutreiben, was die geringe Phosphorylierungsänderung erklären könnte. In der Literatur wurde bereits eine Reduktion der NFaT-Expression in Thymozyten aus PPP3CB KO Mäusen beschrieben [8, 81]. Bueno et al. wiesen eine reduzierte Phosphorylierung von NFaT1 und NFaT4 in nicht stimulierten Thymozyten von PPP3CB KO Mäusen mittels Western Blot nach [81]. In dieser Arbeit zeigte sich eine signifikante Herabregulation der NFaT4 Proteinexpression in VSMCs aus PPP3CB KO Mäusen, im Vergleich zu WT VSMCs.

Damit konnte gezeigt werden, dass sich die ubiquitäre Deletion von PPP3CB auf den Phosphorylierungsgrad von NFAT4 nicht nur in Tumozyten, sondern auch in Gefäßzelltypen, wie VSMCs, auswirkt.

### 5.3. Vergleich von aVSMCs aus PPP3CB KO Mäusen mit WT bei Stimulation mit Vehikel und Wasserstoffperoxid

Als Maß für den geordnet programmierten enzymatischen Zelltod (Apoptose) wurde die Caspase-Aktivität untersucht. Es wurde eine erhöhte Caspase-Aktivität in VSMCs aus PPP3CB KO Tieren bei Stimulation mit 250  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  gemessen. Bei Steigerung der  $\text{H}_2\text{O}_2$  (500  $\mu\text{M}$ ) Konzentration unterschieden sich WT und KO in ihrer Caspase-Aktivität nicht.

Ein weiterer wichtiger Parameter im Rahmen der Charakterisierung von KO VSMCs ist die LDH, die als Nekrosemarker ein Indikator für die Funktionalität der Zellmembran bzw. Zellschädigung ist. LDH befindet sich unter physiologischen Bedingungen im Zytoplasma. Wird die Membran geschädigt, wird diese porös und LDH wird in das Medium freigesetzt. Verglichen mit WT VSMCs zeigten KO VSMCs, unter Vehikelbedingungen und bei Inkubation mit 250  $\mu\text{M}$  und 500  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  eine leicht verminderte LDH-Freisetzung im Vergleich zur totalen LDH-Konzentration. PPP3CB KO Zellen sind somit marginal weniger nekrotisch und rufen damit weniger Entzündungsreaktionen durch Freisetzung von Zellbestandteilen hervor, da sie eher apoptotisch werden und ohne Vermittlung von Entzündungsmediatoren kontrolliert in den Zelltod übergehen. Für die Untersuchung, ob der KO von PPP3CB sich auf eine Regulation der Abwehr gegen reaktive Sauerstoffspezies auswirkt, wurde die G6PD gemessen.

G6PD ist das erste und limitierende Enzym im Pentose-Phosphat-Zyklus und stellt die intrazelluläre Quelle von *Nicotinamidadeninukleotidphosphat* (NADPH) dar. NADPH wirkt als Reduktionsäquivalent von ROS zur Aufrechterhaltung ausreichender Mengen an reduziertem GSH. Dieses nimmt eine zentrale Rolle in der Aufrechterhaltung des Redoxgleichgewichtes und der damit verbundenen Abwehr gegen reaktive Sauerstoffspezies in Zellen ein [157]. Es ist bekannt, dass Forskolin beispielsweise einen Einfluss auf die Aktivität der G6PD hat. Im Rattenversuch konnten in Zellen des Gehirns der Tiere nachgewiesen werden, dass Forskolin das Membran gebundene Protein Adenylatcyclase aktiviert [158].

Die Aktivierung dieses Proteins führt über den Transkriptionsvermittler cAMP zu einer Steigerung der pCREB Expression [158, 159]. Dieses ist in der Lage an Cyclase responsive Elemente zu binden, die unter anderem in der G6PD-Promotorregion vorkommen und führt so zu einer verstärkten Expression der G6PD [160]. Ein weiterer möglicher Aktivierungsmechanismus, der zu einer verstärkten G6PD Expression führt, beruht auf der Fähigkeit von Forskolin intrazelluläres Kalzium freizusetzen. Kalzium führt über Freisetzung verschiedener Signalmoleküle zu einer erhöhten CREB Phosphorylierung und G6PD Aktivierung [161]. Zellkulturversuche mit humanen Nierenzellen konnten ebenfalls eine Steigerung der G6PD

nachweisen. Vorversuche zeigten, dass inaktive *Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase* (G6PD) zu einer Erhöhung von ROS führt und zu einer reduzierten Menge an GSH, während Zellen mit Überexpression an G6PD resistent gegen ein Redoxungleichgewicht waren [157, 162, 163]. In diesen Versuchen führte Aldosteron zu einer Reduktion der G6PD Aktivität [52]. Grossmann et al. konnten durch Stimulation mit Forskolin, welches CREB aktiviert, eine Erhöhung der G6PD Aktivität zeigen [53]. Um zu untersuchen wie VSMCs in Bezug auf G6PD Aktivität stimulationsabhängig reagieren, wurden Forskolin und Aldosteron eingesetzt. Eine im Vergleich zur Vehikelinkubation erhöhte G6PD-Enzymaktivität konnte nur bei Stimulation von PPP3CB WT VSMCs mit Forskolin bestätigt werden. In VSMCs aus KO Mäusen zeigte keine der eingesetzten Stimulanzien eine Wirkung. Die G6PD-Aktivität unterschied sich zwischen KO und WT VSMCs, unter Einfluss von Aldosteron oder bei Inkubation mit Forskolin und Aldosteron, nicht.

#### 5.4. Vergleich der PPP3CB KO Mäuse mit WT bei Stimulation mit Angiotensin II

Die PPP3CB KO Mäuse dienten der Untersuchung des Einflusses von PPP3CB auf strukturelle und funktionelle Gefäßveränderungen, einschließlich der zugrunde liegenden molekularen Mechanismen.

Um zu untersuchen, welchen Einfluss Stimulanzien, zum Beispiel vasoaktive Substanzen wie Angiotensin II auf die Blutdruckregulation von PPP3CB KO Mäusen haben, wurde PPP3CB WT und KO Tieren akut Angiotensin II infundiert. Für die reine Ang II-Wirkung wurden die Ergebnisse der Vehikelinfundierung vom Wert der Angiotensin II-Applikation abgezogen. Vor Ang II-Infundierung wurde eine mögliche Reaktion auf Volumenapplikation mittels Vehikel-Applikation (Ringer-Laktat) untersucht.

Unter Vehikelbedingungen wurden keine Blutdruckunterschiede zwischen PPP3CB WT und KO Tieren gemessen. Beide Versuchsgruppen reagierten vergleichbar auf eine Volumenveränderung in Bezug auf die Herzfrequenz, den systolischen Blutdruck und die Fläche unter der Blutdruckverlaufskurve. Diese Applikation lässt unter anderem Rückschlüsse auf den Gefäßtonus und die Elastizität der Gefäße zu. Werden diese Parameter erhöht oder vermindert ändert sich die Eigenschaft von VSMCs und der Aorta Widerständen entgegen zu wirken. Im Verlauf der Messung des systolischen Blutdruckes, unter Einfluss von Angiotensin II, zeigte sich jedoch ein signifikant geringerer Blutdruckanstieg der PPP3CB KO Mäuse. Dabei besaßen PPP3CB KO Mäuse eine kleinere Fläche unter der Blutdruckverlaufskurve als WT Tiere unter Einfluss von Ang II. Ang II scheint in PPP3CB KO Mäusen hinsichtlich der Zunahme des systolischen Blutdrucks eine geringere Wirkung zu haben.

Um zu analysieren, welche Auswirkungen eine Langzeitapplikation von Angiotensin II auf das Gefäßsystem in KO Mäusen hat, wurden osmotische Minipumpen mit Angiotensin II-Lösung

implantiert. Der Blutdruck, das Trinkvolumen und das Körpergewicht der Mäuse wurden im Rahmen der nicht invasiven Messung über 28 Tage aufgezeichnet. Für Ang II ist bekannt, dass es zu einer vermehrten Rückresorption von Wasser und zu einer erhöhten Wasseraufnahme führen kann. Ang II führte bei dieser Untersuchung zu einer tendenziell erhöhten Flüssigkeitsaufnahme, die nach Normierung auf die Tibialänge der Tiere signifikant wurde.

Für Ang II ist ebenfalls bekannt, dass es zu einem Anstieg des systolischen Blutdruckes führt [164]. Dies zeigte sich in meinen Experimenten bei den männlichen Mäusen ab der ersten Messwoche. In Woche eins war der Blutdruckanstieg zwischen PPP3CB WT und KO Mäusen zunächst identisch. Während der systolische Blutdruck von WT Mäusen kontinuierlich hoch blieb, fiel der Blutdruck von KO Mäusen innerhalb der folgenden drei Messwochen wieder ab. Zum Ende der systolischen Blutdruckmessung gab es bei den KO Mäusen keine Unterschiede zwischen Angiotensin behandelten Mäusen und ihrer Kontrollgruppe. Sinnvoll wäre, diese Versuchsreihe über einen längeren Zeitraum als vier Wochen zu führen um festzustellen, inwieweit der Blutdruck von Ang-behandelten KO Tieren stabil bleibt.

In weiblichen Tieren führte Angiotensin II zu einem leichten Blutdruckanstieg im Vergleich zu männlichen Tieren. Der Knockout von PPP3CB hatte in der weiblichen Versuchsgruppe keinen Einfluss auf die Wirkung von Ang II. Dass weibliche Mäuse einen geringeren Blutdruck und eine geringere Blutdruckantwort besitzen und somit weniger responsiv gegenüber vasoaktiven Substanzen (Ang II) sind, wurde in der Literatur bereits häufig beschrieben [166-172].

Eine inadäquate RAAS Aktivierung führt mittels Effektormolekül Angiotensin II zu kardialen und vaskulären Remodelingprozessen, verbunden mit Fibrosierung, Entzündung, Proliferation, Hypertrophie und Blutdruckhochregulation [173-175]. Bisher wurde indirekt durch Calcineurin Inhibitoren gezeigt, dass diese Angiotensin II induziertes Remodeling in Herz und Niere vermindern können [138, 176]. Mit der in dieser Arbeit verwendeten Tail-cuff Messungen konnte erstmalig der direkte Zusammenhang zwischen PPP3CB und der Blutdruckregulation gezeigt werden.

Nach Ende der chronischen Ang II-Applikation wurden die Organe der Tiere entnommen und gewogen. Bueno et al. wiesen in sechs Wochen alten PPP3CB KO Mäusen ein um 12 % reduziertes Gesamtherzgewicht nach [4]. Unter Kontrollbedingungen konnten mit 7,9 % keine Unterschiede in Bezug auf das Gesamtherzgewicht von PPP3CB KO und WT Tieren gemessen werden. Bei Stimulation von PPP3CB KO und WT Tieren wurde in der Literatur eine Zunahme des Gesamtherzgewichtes beschrieben, jedoch unter Einfluss einer höheren Ang II Konzentration [4]. In der vorgelegten Arbeit führte Ang II bei chronischer Applikation in PPP3CB WT und KO Tieren zu keiner signifikanten Erhöhung des Gesamtherzgewichtes. Tendenzen, der mit Angiotensin II behandelten WT Tiere zu einem erhöhten Gesamtherzgewicht, waren vorhanden und könnten durch Konzentrationserhöhung von Ang II signifikant

werden oder auch durch Normierung auf die Tibialänge. In der Leber jedoch führte eine Ang II-Applikation in PPP3CB WT und KO Tieren zu einem reduzierten Lebergewicht. In der Literatur sind keine Angaben über einen direkten Zusammenhang von Angiotensin II und einem reduziertem Lebergewicht vorhanden. Yayama et al. konnten jedoch nachweisen, dass endogenes Angiotensin II die Leberregeneration, nach partieller Hepatektomie, über den Angiotensin 1a-Rezeptor inhibiert [165]. In diesem Versuch wiesen WT Mäuse eine signifikant geringere Regeneration des Lebergewichtes, im Vergleich zu Vehikel behandelten Tieren, auf [165]. Eine Verletzung der Leber, der für diese Arbeit eingesetzten Mäuse, war jedoch nicht gegeben. Jedoch kann das Lebergewicht auf die Tibialänge, für eine gewichtunabhängige Korrelation, bezogen werden.

In der vorgelegten Arbeit sollte der direkte Zusammenhang von Calcineurin bzw. des Knockouts auf das Gefäßsystem untersucht werden. Dazu wurden Paraffinschnitte der murinen Aorta von PPP3CB WT und KO Mäusen angefertigt und verschiedene Parameter gemessen. Bei diesen Parametern handelt es sich um die Wanddicke und die Fläche der Media. In männlichen PPP3CB WT Tieren vergrößerte sich unter Einfluss von Angiotensin II die Wanddicke der Media und die Lumenfläche. Die großen Schwankungen der Messwerte der Wanddicke der Media können durch das Schneiden der eingebetteten Aorten und dem damit verbundenen Zusammenschieben der Präparate bedingt sein. Insgesamt wiesen nur männliche PPP3CB WT Mäuse eine Mediaverdickung auf, die den KO Mäusen fehlte. Dieser Befund lieferte weitere Anhaltspunkte für eine Protektion männlicher KO Tiere durch den Knockout von PPP3CB. Verglichen mit männlichen WT Tieren besaßen weibliche PPP3CB KO Tiere eine signifikant größere Lumenfläche unter Einfluss von Ang II. Dieser Unterschied entstand durch Verkleinerung der Lumenfläche von Aorten der WT Gruppe unter Ang II-Bedingungen, da PPP3CB KO Mäuse keine Veränderungen nach Stimulation, im Vergleich zur Kontrolle, aufwiesen.

Erstmalig konnte eine direkte Beziehung zwischen dem Knockout von PPP3CB in männlichen Mäusen und dem Gefäßsystem bzw. Remodelingprozessen hergestellt werden.

Aufgrund der unterschiedlichen Reaktion auf Angiotensin II von weiblichen und männlichen Mäusen, wurden beide Gruppen in den folgenden Analysen ebenfalls separat untersucht. Wie bereits in der Literatur beschrieben [177-183], wiesen auch in der vorgelegten Arbeit weibliche Mäuse eine geringere Reaktion auf Angiotensin II auf. Wahrscheinlich wird dieser protektive geschlechtsspezifische Effekt durch das Hormon Östrogen hervorgerufen, welches mit RAAS als enzymatisch-hormonelles System interagiert [184-187].

Für die weitere Charakterisierung von PPP3CB KO Mäusen wurde die aus den Aorten isolierte RNA mittels Illumina bead array auf mögliche Ziel-mRNAs validiert. Durch die Analyse der bead array-Daten mit g:Profiler konnte gezeigt werden, dass es zwischen WT und KO Tieren unter Kontrollbedingungen nur wenig regulierte Gene gibt. Dies stimmt gut mit dem

unauffälligen basalen Phänotyp der KO Tiere überein. In WT Tieren konnten nach Stimulation Ang II-abhängige regulierte Gene, hinsichtlich ihrer molekularen Funktionen, identifiziert werden. Dabei waren in Bezug auf den GO-Term Proteinbindung in PPP3CB WT Tieren mehr regulierte Gene identifiziert worden als bei weiblichen Mäusen. Bei weiblichen Tieren wurden insgesamt vier Gene der Proteinbindung zugeordnet, was zu den histologischen und den Blutdruckbefunden passt. Auch dort wiesen weibliche WT Tiere eine geringere Reaktion auf Ang II auf.

Die Ergebnisse der Analyse des Illumina bead array mit g:Profiler zeigten, dass vaskuläre Genveränderungen in PPP3CB WT Tieren, nicht aber in KO Tieren, nach chronischer Ang II-Applikation auftreten. Diese Veränderungen beziehen sich auf Gene, die dem GO-Term Proteinbindung zugeordnet werden konnten. Männliche und weibliche PPP3CB Mäusen wiesen nach Ang II Simulation eine Regulation von Col1a1 und Col4a1 auf. Bei beiden Geschlechtern der WT Gruppe konnte ebenfalls eine Hochregulation von Col18a1 nach Ang II Behandlung nachgewiesen werden. Es konnte auch experimentell nachgewiesen werden, dass Col18a1 eine wichtige Rolle in der kapillaren Permeabilität in Muskeln spielt [188, 189]. Eine verstärkte Ablagerung von Kollagenen, wie Col4a1, führt zu einer verminderten arteriellen Elastizität und damit zu einer verminderten Funktionalität der Aorta [190]. Für Col1a1 hingegen ist bekannt, dass dessen abnormale Ablagerung, beispielsweise in Gefäßwänden, zum Verlust der Funktionalität dieser führt [191]. Kollagen1 ist ebenfalls in der Lage die Zellmigration von VSMCs und damit vaskuläres Remodeling zu beeinflussen [191]. Die Migration von VSMCs geschieht in Richtung Gefäßlumen oder vom Lumen weg und führt zu einer Verkleinerung oder Vergrößerung des Lumendurchmessers. Die Identifizierung von Col1a1 im bead array sowie die Zunahme von Lumenfläche und Wanddicke der Aorta in männlichen PPP3CB WT Tieren, im Vergleich zu PPP3CB KO Tieren, belegt Ang II induziertes vaskuläres Remodeling. In der Literatur konnte anhand eines Rattenmodells mit Lungenfibrose eine Ang II indizierte Kollagenbildung nachgewiesen werden [191]. Im Vergleich zu weiblichen Mäusen waren in männlichen PPP3CB WT Tieren zusätzlich, nach Ang II Applikation, die Entzündungsmarker CCL-9 und PAI-1 dem GO-Term Proteinbindung zugeordnet worden. Die unter Einfluss von Angiotensin II verstärkt exprimierten Gene von PPP3CB WT Mäusen waren in PPP3CB KO Tieren nicht reguliert, was mit den Ergebnissen der Aortenhistologie und den Blutdruckbefunden übereinstimmt.

## 6. Zusammenfassung

Es gibt Hinweise für eine entzündungsfördernde Wirkung von Calcineurin an glatten Gefäßmuskelzellen sowie für eine Hypertrophie- und Zelltod fördernde Wirkung an Kardiomyozyten bei Druckbelastung oder verringerter Durchblutung. Beides deutet auf eine Vermittlung der pathophysiologischen Wirkung von Angiotensin II am renokardiovaskulären

System durch Calcineurin hin. Bisher war keine Beurteilung der pathophysiologischen und physiologischen Bedeutung der katalytischen Untereinheit PPP3CB des Calcineurins für die schädigende Wirkung von Angiotensin II in Gefäßen möglich. Anhand eines PPP3CB Knockout Mausmodells wurde die Rolle von Calcineurin in Hypertrophie, Entzündung und Fibrosierung von Gefäßen charakterisiert. Über die Wirkung dieser Phosphatase auf das Gefäßsystem war nur wenig bekannt. Bisher wurde über Inhibitorstudien versucht, den Einfluss von Calcineurin auf das Gefäßsystem zu charakterisieren [136, 192]. Unter basalen Bedingungen unterschieden sich die mRNA von PPP3CA aus Aorten und VSMCs von PPP3CB KO Mäusen nicht von WT Tieren. Die in den Aorten der von PPP3CB Mäusen nachgewiesenen Entzündungs- und Fibrosemarker, ausgenommen PAI-1, zeigten keine unterschiedliche mRNA-Expression. Die mRNA-Expression von PAI-1 war unter basalen Bedingungen in der Aorta von PPP3CB KO Tieren geringer als bei WT Mäusen. Proteinlysate von Aorten und VSMCs aus PPP3CB KO Mäusen wiesen keinen unterschiedlichen Phosphorylierungssatus von CREB auf.

In Proteinlysaten von VSMCs aus PPP3CB KO Mäusen wurde eine, im Vergleich zu WT Mäusen, geringere NFaT4 Proteinexpression gemessen. Stimulationsversuche von VSMCs zeigten eine höhere Caspase-Aktivität von VSMCs aus PPP3CB KO Mäusen, unter Einfluss von 250  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ . Die LDH-Aktivität in VSMCs aus den Aorten von PPP3CB KO Mäusen war unter Einfluss von 250  $\mu\text{M}$  und 500  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  marginal geringer als in WT VSMCs. Das lässt vermuten, dass eventuell beim Abbau von VSMCs und unter Einfluss von Stress weniger Entzündungsmediatoren in die Umgebung abgegeben werden. Die invasive Blutdruckmessung mittels Millar-Katheter führte, unter Einfluss von Angiotensin II, zu einem geringeren Anstieg des systolischen Blutdrucks von PPP3CB KO Mäusen, im Vergleich zur WT Gruppe. Dabei besaßen PPP3CB KO Mäuse eine kleinere Fläche unter der Blutdruckverlaufskurve. Eine chronische Angiotensin II-Applikation führte nur in männlichen PPP3CB KO Mäusen zu einer geringeren Blutdrucksteigerung als in WT Mäusen. Weibliche Mäuse wiesen eine geringere Reaktion auf und keine Unterschiede zwischen WT und KO. Anhand histologischer Untersuchung der Wanddicke und Lumenfläche von Aorten männlicher PPP3CB KO Tiere konnte gezeigt werden, dass der Knockout von PPP3CB in dem verwendeten Mausmodell eine Ang II-induzierte Mediaverdickung verhindert. WT Mäuse hingegen reagierten mit einem signifikantem Anstieg dieser Parameter und vaskulärem Remodeling unter Einfluss von Ang II. Isolierte mRNA aus Aorten von PPP3CB WT und KO Mäusen wurden für bead arrays verwendet. Dabei zeigte sich, dass es zwischen WT und KO Mäusen unter Kontrollbedingungen kaum Anreicherung von GO-Termen gibt. Unter Einfluss von Ang II jedoch konnte gezeigt werden, dass pathophysiologisch relevante und Ang II-abhängige Gene nur in WT Tieren nicht aber in KO Tieren hoch reguliert waren.



In dieser Arbeit wurde erstmalig nachgewiesen, dass viele pathophysiologische Angiotensin II-abhängige Effekte im Gefäßsystem durch die katalytische Untereinheit von Calcineurin vermittelt werden. Dies deutet auf einen förderlichen Effekt des Knockouts, in Bezug auf Bluthochdruck und vaskuläres Remodeling in männlichen Tieren, hin.

### III Literaturverzeichnis

1. Rusnak F und Mertz P (2000) Calcineurin: form and function. *Physiol Rev* 80(4):1483-1521
2. Bueno OF et al. (2002) Calcineurin and hypertrophic heart disease: novel insights and remaining questions. *Cardiovasc Res* 53(4):806-821
3. Graef IA et al. (2001) Signals transduced by Ca(2+)/calcineurin and NFATc3/c4 pattern the developing vasculature. *Cell* 105(7):863-875
4. Bueno OF et al (2002) Impaired cardiac hypertrophic response in Calcineurin Abeta - deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 99(7):4586-4591
5. Molkenkin JD (2004) Calcineurin-NFAT signaling regulates the cardiac hypertrophic response in coordination with the MAPKs. *Cardiovasc Res* 63(3):467-475
6. Fernandez-Yunquera A et al. (2014) Everolimus immunosuppression reduces the serum expression of fibrosis markers in liver transplant recipients. *World J Transplant* 4(2):133-140
7. Di Marco GS et al. (2011) Cardioprotective effect of calcineurin inhibition in an animal model of renal disease. *Eur Heart J* 32(15):1935-1945
8. Bueno OF et al. (2004) Calcineurin Abeta gene targeting predisposes the myocardium to acute ischemia-induced apoptosis and dysfunction. *Circ Res* 94(1):91-99
9. Min LJ et al. (2009) Angiotensin II type 1 receptor-associated protein prevents vascular smooth muscle cell senescence via inactivation of calcineurin/nuclear factor of activated T cells pathway. *J Mol Cell Cardiol* 47(6):798-809
10. Wang HG et al. (1999) Ca<sup>2+</sup>-induced apoptosis through calcineurin dephosphorylation of BAD. *Science* 284(5412):339-343
11. Klee CB, Ren H und Wang X (1998) Regulation of the calmodulin-stimulated protein phosphatase, calcineurin. *J Biol Chem* 273(22):13367-13370
12. Maillet M et al. (2010) Heart-specific deletion of CnB1 reveals multiple mechanisms whereby calcineurin regulates cardiac growth and function. *J Biol Chem* 285(9):6716-6724
13. Klumpp S, Steiner AL und Schultz JE (1983) Immunocytochemical localization of cyclic GMP, cGMP-dependent protein kinase, calmodulin and calcineurin in *Paramecium tetraurelia*. *Eur J Cell Biol* 32(1):164-170
14. Klee CB, Draetta GF und Hubbard MJ (1988) Calcineurin. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 61:149-200
15. Kincaid R (1993) Calmodulin-dependent protein phosphatases from microorganisms to man. A study in structural conservatism and biological diversity. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res* 27:1-23
16. Su Q et al. (1995) Distribution and activity of calcineurin in rat tissues. Evidence for post-transcriptional regulation of testis-specific calcineurin B. *Eur J Biochem* 230(2):469-474

17. Miyamoto K et al. (1994) In situ localization of rat testis-specific calcineurin B subunit isoform beta 1 in the developing rat testis. *Biochem Biophys Res Commun* 203(2):1275-1283
18. Walther RF et al. (2005) A serine/threonine-rich motif is one of three nuclear localization signals that determine unidirectional transport of the mineralocorticoid receptor to the nucleus. *J Biol Chem* 280(17):17549-17561
19. Griffith JP et al. (1995) X-ray structure of calcineurin inhibited by the immunophilin-immunosuppressant FKBP12-FK506 complex. *Cell* 82(3):507-522
20. Crivici A und Ikura M (1995) Molecular and structural basis of target recognition by calmodulin. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 24:85-116
21. King MM und CY Huang (1984) The calmodulin-dependent activation and deactivation of the phosphoprotein phosphatase, calcineurin, and the effect of nucleotides, pyrophosphate, and divalent metal ions. Identification of calcineurin as a Zn and Fe metalloenzyme. *J Biol Chem* 259(14):8847-8856
22. Hubbard MJ und Klee CB (1989) Functional domain structure of calcineurin A: mapping by limited proteolysis. *Biochemistry* 28(4):1868-1874
23. Crabtree GR (1999) Generic signals and specific outcomes: signaling through Ca<sup>2+</sup>, calcineurin, and NF-AT. *Cell* 96(5):611-614
24. Jabr RI et al. (2007) Nuclear translocation of calcineurin A $\beta$  but not calcineurin A $\alpha$  by platelet-derived growth factor in rat aortic smooth muscle. *Am J Physiol Cell* 292(6):C2213-2225
25. He ZH et al. (2010) Are calcineurin genes associated with endurance phenotype traits? *Eur J Appl Physiol* 109(3):359-369
26. Wilkins BJ und Molkentin JD (2004) Calcium-calcineurin signaling in the regulation of cardiac hypertrophy. *Biochem Biophys Res Commun* 322(4):1178-1191
27. Kakalis LT et al. (1995) Characterization of the calcium-binding sites of calcineurin B. *FEBS Lett* 362(1):55-58
28. Gallagher SC et al. (2001) There is communication between all four Ca(2+)-bindings sites of calcineurin B. *Biochemistry* 40(40):12094-12102
29. Zhu D, Cardenas ME und Heitman J (1995) Myristoylation of calcineurin B is not required for function or interaction with immunophilin-immunosuppressant complexes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 270(42):24831-24838
30. Kennedy MT, Brockman H und Rusnak F (1996) Contributions of myristoylation to calcineurin structure/function. *J Biol Chem* 271(43):26517-26521
31. Stemmer PM und Klee CB (1994) Dual calcium ion regulation of calcineurin by calmodulin and calcineurin B. *Biochemistry* 33(22):6859-6866
32. Hogan PG et al. (2003) Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT. *Genes Dev* 17(18):2205-2232
33. Wilkins BJ et al. Targeted (2002) disruption of NFATc3, but not NFATc4, reveals an intrinsic defect in calcineurin-mediated cardiac hypertrophic growth. *Mol Cell Biol* 22(21):7603-7613

34. Graef IA et al. (2001) Evolutionary relationships among Rel domains indicate functional diversification by recombination. *Proc Natl Acad Sci USA* 98(10):5740-5745
35. Li H, Rao A und PG Hogan (2011) Interaction of calcineurin with substrates and targeting proteins. *Trends Cell Biol* 21(2):91-103
36. Okamura H et al. (2000) Concerted dephosphorylation of the transcription factor NFAT1 induces a conformational switch that regulates transcriptional activity. *Mol Cell* 6(3):539-550
37. Zhu J und McKeon F (1999) NF-AT activation requires suppression of Crm1-dependent export by calcineurin. *Nature* 398(6724):256-260
38. Klemm JD, Beals CR und Crabtree GR (1997) Rapid targeting of nuclear proteins to the cytoplasm. *Curr Biol* 7(9):638-644
39. Philip F et al. (2011) Role of phospholipase C-beta in RNA interference. *Adv Biol Regul* 53(3):319-330
40. Carpenter G und Ji Q (1999) Phospholipase C-gamma as a signal-transducing element. *Exp Cell Res* 253(1):15-24
41. Rao TP und Kuhl M (1997) An updated overview on Wnt signaling pathways: a prelude for more. *Circ Res* 106(12):1798-1806
42. Goruppi S und Kyriakis JM (2004) The pro-hypertrophic basic helix-loop-helix protein p8 is degraded by the ubiquitin/proteasome system in a protein kinase B/Akt- and glycogen synthase kinase-3-dependent manner, whereas endothelin induction of p8 mRNA and renal mesangial cell hypertrophy require NFAT4. *J Biol Chem* 279(20):20950-20958
43. Nieves-Cintrón M et al. (2007) Activation of NFATc3 down-regulates the beta1 subunit of large conductance, calcium-activated K<sup>+</sup> channels in arterial smooth muscle and contributes to hypertension. *J Biol Chem* 282(5):3231-3240
44. Diedrichs H et al. (2007) Activation of the calcineurin/NFAT signalling cascade starts early in human hypertrophic myocardium. *J Int Med Res* 35(6):803-818
45. Molkenkin JD et al. (1998) A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy. *Cell* 93(2):215-228
46. Pang X und Sun NL (2009) Calcineurin-NFAT signaling is involved in phenylephrine-induced vascular smooth muscle cell proliferation. *Acta Pharmacol Sin* 30(5):537-544
47. Rao A, Luo C und Hogan PG (1997) Transcription factors of the NFAT family: Regulation and function. *Annu Rev Immunol* 15:707-747
48. Kel A et al. (1999) Recognition of NFATp/AP-1 composite elements within genes induced upon the activation of immune cells. *J Mol Biol* 288(3):353-37
49. Giese T et al. (2004) Monitoring of NFAT-regulated gene expression in the peripheral blood of allograft recipients: a novel perspective toward individually optimized drug doses of cyclosporine A. *Transplantation* 77(3):339-344

50. Cobbs SL und Gooch JL (2007) NFATc is required for TGFbeta-mediated transcriptional regulation of fibronectin. *Biochem Biophys Res Commun* 362(2):288-294
51. Rhew JH et al. (1999) Induction of fibronectin gene expression by inhibitors of protein phosphatase type 2B in normal and transformed fibroblasts. *Exp Mol Med* 31(2):71-75
52. Lonze BE und Ginty DD (2002) Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous system. *Neuron* 35(4):605-623
53. Grossmann C et al. (2010) Mineralocorticoid receptor inhibits CREB signaling by calcineurin activation. *Faseb J* 24(6):2010-2019
54. Leopold JA et al. (2007) Aldosterone impairs vascular reactivity by decreasing glucose-6-phosphate dehydrogenase activity. *Nat Med* 13(2):189-197
55. Berlett BS und Stadtman ER (1997) Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J Biol Chem* 272(33):20313-20316
56. Toyokuni S (1998) Oxidative stress and cancer: the role of redox regulation. *Biotherapy* 11(2-3):147-154
57. Fridovich I (1978) The biology of oxygen radicals. *Science* 201(4359):875-880
58. Boring L et al. (1998) Decreased lesion formation in CCR2<sup>-/-</sup> mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis. *Nature* 394(6696):894-897
59. Furukawa Y et al. (1999) Anti-monocyte chemoattractant protein-1/monocyte chemotactic and activating factor antibody inhibits neointimal hyperplasia in injured rat carotid arteries. *Circ Res* 84(3):306-314
60. Takeda R et al. (2008) Calcineurin is critical for sodium-induced neointimal formation in normotensive and hypertensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 294(6):H2871-2878
61. Terkeltaub R, Boisvert WA und Curtiss LK (1998) Chemokines and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 9(5):397-405
62. Satonaka H et al. (2004) Calcineurin promotes the expression of monocyte chemoattractant protein-1 in vascular myocytes and mediates vascular inflammation. *Circ Res* 94(5):693-700
63. Chen Y et al. (2016) Calcineurin beta protects brain after injury by activating the unfolded protein response. *Neurobiol Dis* 94:139-156
64. Shioda N und Fukunaga K (2011) Functional roles of constitutively active calcineurin in delayed neuronal death after brain ischemia. *Yakugaku Zasshi* 131(1):13-20
65. Furman JL et al. (2016) Blockade of Astrocytic Calcineurin/NFAT Signaling Helps to Normalize Hippocampal Synaptic Function and Plasticity in a Rat Model of Traumatic Brain Injury. *J Neurosci* 36(5):1502-1515
66. Eastwood SL, Burnet PW und Harrison PJ (2005) Decreased hippocampal expression of the susceptibility gene PPP3CC and other calcineurin subunits in schizophrenia. *Biol Psychiatry* 57(7):702-710
67. Cottrell JR et al. (2016) Calcineurin Agamma is a Functional Phosphatase That Modulates Synaptic Vesicle Endocytosis. *J Biol Chem* 291(4):1948-1956

68. Mass E et al. (2014) Murine *Credl1* controls cardiac development through activation of calcineurin/NFATc1 signaling. *Dev Cell* 28(6):711-726
69. Chang CP et al. (2004) A field of myocardial-endocardial NFAT signaling underlies heart valve morphogenesis. *Cell* 118(5):649-663
70. de la Pompa JL et al. (1998) Role of the NF-ATc transcription factor in morphogenesis of cardiac valves and septum. *Nature* 392(6672):182-186
71. Peng SL et al. (2001) NFATc1 and NFATc2 together control both T and B cell activation and differentiation. *Immunity* 14(1):13-20
72. Ranger AM et al. (1998) Inhibitory function of two NFAT family members in lymphoid homeostasis and Th2 development. *Immunity* 9(5):627-635
73. Gooch JL et al. (2004) Calcineurin A-alpha but not A-beta is required for normal kidney development and function. *Am J Pathol* 165(5):1755-1765
74. Wolska BM (2009) Calcineurin and cardiac function: is more or less better for the heart? *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 297(5):H1576-1577
75. Miyakawa T et al. (2003) Conditional calcineurin knockout mice exhibit multiple abnormal behaviors related to schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci USA* 100(15):8987-8992
76. Zeng H et al. (2001) Forebrain-specific calcineurin knockout selectively impairs bidirectional synaptic plasticity and working/episodic-like memory. *Cell* 107(5):617-629
77. Muramatsu T et al. (1992) Molecular cloning of a calmodulin-dependent phosphatase from murine testis: identification of a developmentally expressed nonneural isoenzyme. *Proc Natl Acad Sci USA* 89(2):529-533
78. Nishio H et al. (1992) Identification of testis specific calcineurin beta subunit isoform by a monoclonal antibody and detection of a specific six amino acid sequence. *Biochem Biophys Res Commun* 182(1):34-38
79. Nishio H et al. (1992) The evidence for post-meiotic expression of a testis-specific isoform of a regulatory subunit of calcineurin using a monoclonal antibody. *Biochem Biophys Res Commun* 187(2):828-831
80. Miyata H et al. (2014) Sperm calcineurin inhibition prevents mouse fertility with implications for male contraceptive. *Science* 350(6259):442-445
81. Bueno OF et al. (2002) Defective T cell development and function in calcineurin A beta-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 99(14):9398-9403
82. Kayyali US et al. (1997) Cytoskeletal changes in the brains of mice lacking calcineurin A alpha. *J Neurochem* 68(4):1668-1678
83. Zhuo M et al. (1999) A selective role of calcineurin alpha in synaptic depotentiation in hippocampus. *Proc Natl Acad Sci USA* 96(8):4650-4655
84. Suk HY et al. (2013) Ablation of calcineurin A beta reveals hyperlipidemia and signaling cross-talks with phosphodiesterases. *J Biol Chem* 288(5):3477-3488
85. Shulman GI (2000) Cellular mechanisms of insulin resistance. *J Clin Invest* 106(2):171-176

86. Garg A und Misra A (2002) Hepatic steatosis, insulin resistance, and adipose tissue disorders. *J Clin Endocrinol Metab* 87(7):3019-3022
87. Zhou YT et al. (2000) Lipotoxic heart disease in obese rats: implications for human obesity. *Proc Natl Acad Sci USA* 97(4):1784-1789
88. Worsdorfer P et al. (2017) The vascular adventitia: An endogenous, omnipresent source of stem cells in the body. *Pharmacol Ther* 171:13-29
89. Esteban V et al. (2011) Regulator of calcineurin 1 mediates pathological vascular wall remodeling. *J Exp Med* 208(10):2125-2139
90. Subbotin VM (2012) Neovascularization of coronary tunica intima (DIT) is the cause of coronary atherosclerosis. Lipoproteins invade coronary intima via neovascularization from adventitial vasa vasorum, but not from the arterial lumen: a hypothesis. *Theor Biol Med Model* 9:11
91. Simper D et al. (2002) Smooth muscle progenitor cells in human blood. *Circulation*, 106(10):1199-1204
92. Shanahan CM und Weissberg PL (1998) Smooth muscle cell heterogeneity: patterns of gene expression in vascular smooth muscle cells in vitro and in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18(3):333-338
93. Lacolley P et al. (2012) The vascular smooth muscle cell in arterial pathology: a cell that can take on multiple roles. *Cardiovasc Res* 95(2):194-204
94. Tang Y et al. (2011) Mechanisms of TGF-beta-induced differentiation in human vascular smooth muscle cells. *J Vasc Res* 48(6):485-494
95. Owens GK, Kumar MS und Wamhoff BR (2004) Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease. *Physiol Rev* 84(3):767-801
96. Schiffrin EL (2010) Circulatory therapeutics: use of antihypertensive agents and their effects on the vasculature. *J Cell Mol Med* 14(5):1018-1029
97. Bezie Y et al. (1998) Fibronectin expression and aortic wall elastic modulus in spontaneously hypertensive rats. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18(7):1027-1034
98. Louis H et al. (2007) Role of alpha1beta1-integrin in arterial stiffness and angiotensin-induced arterial wall hypertrophy in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293(4):H2597-2604
99. Delbosc S et al. (2008) Proteomic analysis permits the identification of new biomarkers of arterial wall remodeling in hypertension. *Mol Med* 14(7-8):383-394
100. Qiu H et al. (2010) Short communication: vascular smooth muscle cell stiffness as a mechanism for increased aortic stiffness with aging. *Circ Res* 107(5):615-619
101. Lacolley P et al. (2009) Angiotensin II, mechanotransduction, and pulsatile arterial hemodynamics in hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 297(5):567-1575
102. Chamorro-Jorganes A et al. (2011) Fibronectin upregulates cGMP-dependent protein kinase type Ibeta through C/EBP transcription factor activation in contractile cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 300(3):C683-691

103. Osborne-Pellegrin M et al. (2010) Changes in aortic stiffness related to elastic fiber network anomalies in the Brown Norway rat during maturation and aging. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 299(1):H144-152
104. Ward MR et al. (2000) Arterial remodeling. Mechanisms and clinical implications. *Circulation* 102(10):1186-1191
105. Gerthoffer WT (2007) Mechanisms of vascular smooth muscle cell migration. *Circ Res* 100(5):607-621
106. Iyemere VP et al. (2006) Vascular smooth muscle cell phenotypic plasticity and the regulation of vascular calcification. *J Intern Med* 260(3):192-210
107. Alexander MR und Owens GK (2012) Epigenetic control of smooth muscle cell differentiation and phenotypic switching in vascular development and disease. *Annu Rev Physiol* 74:13-40
108. Willis AI et al. (2004) Vascular smooth muscle cell migration: current research and clinical implications. *Vasc Endovascular Surg* 38(1):11-23
109. van Varik BJ et al. (2012) Mechanisms of arterial remodeling: lessons from genetic diseases. *Front Genet* 3:290
110. Martinez-Martinez S et al. (2006) Blockade of NFAT activation by the second calcineurin binding site. *J Biol Chem* 281(10):6227-6235
111. Crabtree GR und Olson EN (2002) NFAT signaling: choreographing the social lives of cells. *Cell* 109 Suppl:S67-79
112. Suzuki E et al. (2002) Angiotensin II induces myocyte enhancer factor 2- and calcineurin/nuclear factor of activated T cell-dependent transcriptional activation in vascular myocytes. *Circ Res* 90(9):1004-1011
113. Paravicini TM und Touyz RM (2006) Redox signaling in hypertension. *Cardiovasc Res* 71(2):247-258
114. Touyz RM (2004) Reactive oxygen species and angiotensin II signaling in vascular cells-implications in cardiovascular disease. *Braz J Med Biol Res* 37(8):1263-1273
115. Taniyama Y und Griendling KK (2003) Reactive oxygen species in the vasculature: molecular and cellular mechanisms. *Hypertension* 42(6):1075-1081
116. Griendling KK, Sorescu D und Ushio-Fukai M (2000) NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res* 86(5):494-501
117. Rajagopalan S et al. (1996) Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. Contribution to alterations of vasomotor tone. *J Clin Invest* 97(8):1916-1923
118. Lee EY et al. (2004) Angiotensin II receptor blocker attenuates overexpression of vascular endothelial growth factor in diabetic podocytes. *Exp Mol Med* 36(1):65-70
119. Kelly DJ et al. (2004) Platelet-derived growth factor receptor transactivation mediates the trophic effects of angiotensin II in vivo. *Hypertension* 44(2):195-202
120. Dunning MJ et al. (2007) beadarray: R classes and methods for Illumina bead-based data. *Bioinformatics* 23(16):2183-2184



121. Gunderson KL et al. (2004) Decoding randomly ordered DNA arrays. *Genome Res* 14(5):870-877
122. Forcheh AC et al. (2012) Gene filtering in the analysis of Illumina microarray experiments. *Stat Appl Genet Mol Biol* 11(2)
123. Viridis A und Schiffrin EL (2003) Vascular inflammation: a role in vascular disease in hypertension? *Curr Opin Nephrol Hypertens* 12(2):181-187
124. Owens GK (1995) Regulation of differentiation of vascular smooth muscle cells. *Physiol Rev* 75(3):487-517
125. Brumby PJ (1960) Influence of the maternal environment on growth in mice. *Heredity* 14:1-18
126. Rocha R und Stier Jr CT (2001) Pathophysiological effects of aldosterone in cardiovascular tissues. *Trends Endocrinol Metab* 12(7):308-314
127. Blasi ER et al. (2003) Aldosterone/salt induces renal inflammation and fibrosis in hypertensive rats. *Kidney Int* 63(5):1791-1800
128. Qin W et al. (2003) Transgenic model of aldosterone-driven cardiac hypertrophy and heart failure. *Circ Res* 93(1):69-76
129. Brilla CG und Weber KT (1992) Mineralocorticoid excess, dietary sodium, and myocardial fibrosis. *J Lab Clin Med* 120(6):893-901
130. Funder JW (1995) Steroids, hypertension and cardiac fibrosis. *Blood Press Suppl* 2:39-42
131. Gekle M et al. (2007) Altered collagen homeostasis in human aortic smooth muscle cells (HAoSMCs) induced by aldosterone. *Pflugers Arch* 454(3):403-413
132. Rocha R et al. (2002) Aldosterone induces a vascular inflammatory phenotype in the rat heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283(5):H1802-1810
133. MacFadyen RJ, Barr CS und Struthers AD (1997) Aldosterone blockade reduces vascular collagen turnover, improves heart rate variability and reduces early morning rise in heart rate in heart failure patients. *Cardiovasc Res* 35(1):30-34
134. Struthers AD (2004) Aldosterone-induced vasculopathy. *Mol Cell Endocrinol* 217(1-2):239-241
135. Pitt B et al. (1999) The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. Randomized Aldactone Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med* 341(10):709-717
136. Seiferth A et al. (2012) The phosphatase calcineurin PP2B $\beta$  mediates part of mineralocorticoid receptor transcriptional activity. *Faseb J* 26(6):2327-2337
137. Jiang H et al. (1997) Distinct tissue and cellular distribution of two major isoforms of calcineurin. *Mol Immunol* 34(8-9):663-669
138. Sussman MA et al. (1998) Prevention of cardiac hypertrophy in mice by calcineurin inhibition. *Science* 281(5383):1690-1693
139. Taigen T et al. (2000) Targeted inhibition of calcineurin prevents agonist-induced cardiomyocyte hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci USA* 97(3):1196-1201

140. Haq S et al. (2001) Differential activation of signal transduction pathways in human hearts with hypertrophy versus advanced heart failure. *Circulation* 103(5):670-677
141. Sartorio CL et al. (2007) Mineralocorticoid receptor blockade improves vasomotor dysfunction and vascular oxidative stress early after myocardial infarction. *Hypertension* 50(5):919-925
142. Brown NJ (2008) Aldosterone and vascular inflammation. *Hypertension* 51(2):161-167
143. Young M et al. (1994) Mineralocorticoids, hypertension, and cardiac fibrosis. *J Clin Invest* 93(6):2578-2583
144. Park JB und Schiffrin EL (2001) Small artery remodeling is the most prevalent (earliest?) form of target organ damage in mild essential hypertension. *J Hypertens* 19(5):921-930
145. Mathiassen ON et al. (2007) Small artery structure is an independent predictor of cardiovascular events in essential hypertension. *J Hypertens* 25(5):1021-1026
146. Chen HC et al. (2000) Role of the angiotensin AT(1) receptor in rat aortic and cardiac PAI-1 gene expression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20(10):2297-2302
147. Dang MQ et al. (2015) Gene expression profile in the early stage of angiotensin II-induced cardiac remodeling: a time series microarray study in a mouse model. *Cell Physiol Biochem* 35(2):467-476
148. Binder BR et al. (2002) Plasminogen activator inhibitor 1: physiological and pathophysiological roles. *News Physiol Sci* 17:56-61
149. Kim SS und Seo SR (2011) The regulator of calcineurin 1 (RCAN1/DSCR1) activates the cAMP response element-binding protein (CREB) pathway. *J Biol Chem* 286(43):37841-37848
150. Yang H et al. (2013) Activation of cAMP-response element-binding protein is positively regulated by PKA and calcium-sensitive calcineurin and negatively by PKC in insect. *Insect Biochem Mol Biol* 43(11):1028-1036
151. Grossmann C et al. (2010) Interaction between mineralocorticoid receptor and cAMP/CREB signaling. *Steroids* 75(8-9):539-543
152. Lambert LA, Perri H und Meehan TJ (2005) Evolution of duplications in the transferrin family of proteins. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 140(1):11-25
153. Fatigati V und Murphy RA (1984) Actin and tropomyosin variants in smooth muscles. Dependence on tissue type. *J Biol Chem* 259(23):14383-14388
154. Kawasaki Y et al. (2008) Renal expression of alpha-smooth muscle actin and c-Met in children with Henoch-Schonlein purpura nephritis. *Pediatr Nephrol* 23(6):913-919
155. de Frutos S et al. (2007) NFATc3 mediates chronic hypoxia-induced pulmonary arterial remodeling with alpha-actin up-regulation. *J Biol Chem* 282(20):15081-15089
156. Gonzalez EM et al. (2005) BMP-1/Tolloid-like metalloproteases process endorepellin, the angiostatic C-terminal fragment of perlecan. *J Biol Chem* 280(8):7080-7087
157. Leopold JA et al. (2001) Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency promotes endothelial oxidant stress and decreases endothelial nitric oxide bioavailability. *Faseb J* 15(10):1771-1773

158. Simpson JN und McGinty JF (1994) Forskolin increases phosphorylated-CREB and fos immunoreactivity in rat striatum. *Neuroreport* 5(10):1213-1216
159. Delghandi MP, Johannessen M und Moens U (2005) The cAMP signalling pathway activates CREB through PKA, p38 and MSK1 in NIH 3T3 cells. *Cell Signal* 17(11):1343-1351
160. Johannessen M et al. (2004) Synergistic activation of CREB-mediated transcription by forskolin and phorbol ester requires PKC and depends on the glutamine-rich Q2 transactivation domain. *Cell Signal* 16(10):1187-1199
161. Zanassi P et al. (2001) cAMP-dependent protein kinase induces cAMP-response element-binding protein phosphorylation via an intracellular calcium release/ERK-dependent pathway in striatal neurons. *J Biol Chem* 276(15):11487-11495
162. Leopold JA et al. (2003) Glucose-6-phosphate dehydrogenase overexpression decreases endothelial cell oxidant stress and increases bioavailable nitric oxide. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23(3):411-417
163. Liew CC und Gornall AG (1969) Effects of aldosterone on blood pressure and glucose-6-phosphate dehydrogenase activity of heart muscle. *Can J Physiol Pharmacol* 47(2):193-197
164. Moon JU (2013) Recent Update of Renin-angiotensin-aldosterone System in the Pathogenesis of Hypertension *Electrolyte Blood Press* 11:41-45
165. Yayama K et al. (2008) Angiotensin II Regulates Liver Regeneration via Type 1 Receptor Following Partial Hepatectomy in Mice. *Biol Pharm Bull* 31(7):1356-1631
166. Xue B, Johnson AK und Hay M (2007) Sex differences in angiotensin II- induced hypertension. *Braz J Med Biol Res* 40(5):727-734
167. Dubey RK, et al. (2002) Sex hormones and hypertension. *Cardiovasc Res* 53(3):688-708
168. Buys ES. et al. (2008) Gender-specific hypertension and responsiveness to nitric oxide in sGCalpha1 knockout mice. *Cardiovasc Res* 79(1):179-186
169. Xue B, Pamidimukkala J und Hay M (2005) Sex differences in the development of angiotensin II-induced hypertension in conscious mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 288(5):H2177-2184
170. Vignon-Zellweger N et al. (2014) Endothelin-1 overexpression and endothelial nitric oxide synthase knock-out induce different pathological responses in the heart of male and female mice. *Life Sci* 118(2):219-225
171. Pingili AK et al. (2015) 6beta-hydroxytestosterone, a cytochrome P450 1B1 metabolite of testosterone, contributes to angiotensin II-induced hypertension and its pathogenesis in male mice. *Hypertension* 65(6):1279-1287
172. Zimmerman MA et al. (2015) Chronic ANG II infusion induces sex-specific increases in renal T cells in Sprague-Dawley rats. *Am J Physiol Renal Physiol* 308(7):F706-712
173. van Thiel BS et al. (2015) The renin-angiotensin system and its involvement in vascular disease. *Eur J Pharmacol* 763(Pt A):3-14

174. Cacciapuoti F (2011) Molecular mechanisms of left ventricular hypertrophy (LVH) in systemic hypertension (SH)-possible therapeutic perspectives. *J Am Soc Hypertens* 5(6):449-455
175. Fukui T et al. (1997) p22phox mRNA expression and NADPH oxidase activity are increased in aortas from hypertensive rats. *Circ Res* 80(1):45-51
176. Mervaala E et al. (2000) Cyclosporin A protects against angiotensin II-induced end-organ damage in double transgenic rats harboring human renin and angiotensinogen genes. *Hypertension* 35(1 Pt 2):360-366
177. Rafikova O et al. (2015) The sexual dimorphism associated with pulmonary hypertension corresponds to a fibrotic phenotype. *Pulm Circ* 5(1):184-197
178. Earley S und Resta TC (2002) Estradiol attenuates hypoxia-induced pulmonary endothelin-1 gene expression. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 283(1):L86-93
179. Lahm T et al. (2008) The effects of estrogen on pulmonary artery vasoreactivity and hypoxic pulmonary vasoconstriction: potential new clinical implications for an old hormone. *Crit Care Med* 36(7):2174-2183
180. Lahm T et al. (2007) Endogenous estrogen attenuates pulmonary artery vasoreactivity and acute hypoxic pulmonary vasoconstriction: the effects of sex and menstrual cycle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 293(3):E865-871
181. Benza RL et al. (2010) Predicting survival in pulmonary arterial hypertension: insights from the Registry to Evaluate Early and Long-Term Pulmonary Arterial Hypertension Disease Management (REVEAL). *Circulation* 122(2):164-172
182. Humbert M et al. (2010) Survival in incident and prevalent cohorts of patients with pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J* 36(3):549-55
183. Lee WT et al. (2012) Predicting survival in pulmonary arterial hypertension in the UK. *Eur Respir J* 40(3):604-611
184. Dalpiaz PL et al. (2015) Sex Hormones Promote Opposite Effects on ACE and ACE2 Activity, Hypertrophy and Cardiac Contractility in Spontaneously Hypertensive Rats. *PLoS One* 10(5):e0127515
185. Os I et al. (2008) Effects of losartan in women with hypertension and left ventricular hypertrophy: results from the Losartan Intervention for Endpoint Reduction in Hypertension Study. *Hypertension* 51(4):1103-1108
186. Reckelhoff JF et al. (2000) Subpressor doses of angiotensin II increase plasma F(2) isoprostanes in rats. *Hypertension* 35(1 Pt 2):476-479
187. Komukai K, Mochizuki S und Yoshimura M (2010) Gender and the renin-angiotensin-aldosterone system. *Fundam Clin Pharmacol* 24(6):687-698
188. Rygh CB et al. (2014) Image-based assessment of microvascular function and structure in collagen XV- and XVIII-deficient mice. *J Physiol* 592(Pt 2):325-336
189. Passos-Bueno MR et al. (2006) Mutations in collagen 18A1 and their relevance to the human phenotype. *An Acad Bras Cienc* 78(1):123-131

190. Tarasov KV et al. (2009) Col4a1 is associated with arterial stiffness by genome-wide association scan. *Circ Cardiovasc Genet* 2(2):151-158
191. Wang XM et al. (2015) Effects of angiotensin II intervention on MMP-2, MMP-9, TIMP-1, and collagen expression in rats with pulmonary hypertension. *Genet Mol Res* 14(1):1707-1717
192. Hallhuber M et al. (2006) Inhibition of nuclear import of calcineurin prevents myocardial hypertrophy. *Circ Res* 99(6):626-635
193. Meyer J. 1973. Merkmalsbeziehungen zwischen Körpergewicht, Fruchtbarkeit, Aufzuchtleistung, Nutzungsdauer und Alter. Ein Lebensleistungsversuch mit Mäusen. *Habil.-Schrift, München: Universität*

#### **IV Thesen**

1. *Unter basalen Bedingungen gibt es zwischen PPP3CB WT und KO Mäusen keinen Unterschied in Körpergewicht und Trinkmenge.*
2. *Unter basalen Bedingungen besitzen PPP3CB KO Tiere eine geringere mRNA-Expression von PAI-1 in der Aorta als WT Mäuse.*
3. *Unter Kontrollbedingungen gibt es keine Unterschiede im systolischen Blutdruck von PPP3CB KO und WT Mäusen.*
4. *Nach akuter Ang II-Stimulation besitzen PPP3CB KO Mäuse einen geringeren systolischen Blutdruckanstieg und eine kleinere AUC als WT Mäuse.*
5. *Nach chronischer Ang II-Stimulation steigt der systolische Blutdruck bei männlichen Tieren ab Woche eins an. Während bei WT Tieren der Blutdruck erhöht bleibt, sinkt der systolische Blutdruck von männlichen Mäusen ab der zweiten Woche. Der Blutdruckabfall wird ab der vierten Woche signifikant.*
6. *Bei chronischer Ang II-Stimulation besitzen weibliche PPP3CB KO Mäuse einen geringeren systolischen Blutdruck als männliche Tiere, jedoch keine Unterschiede zwischen WT und KO Tieren.*
7. *Nach chronischer Ang II-Stimulation besitzen Aorten aus männlichen PPP3CB KO Tieren eine geringere Wanddicke und Mediafläche im Vergleich zu männlichen WT Tieren. Weibliche PPP3CB KO Mäuse weisen nach Ang II Stimulation keinen Anstieg der Wanddicke und der Lumenfläche der Aorta auf. In weiblichen PPP3CB WT Tieren nimmt unter Einfluss von Ang II das Verhältnis von Mediafläche zu Lumenfläche, aufgrund eines kleineren Lumens, zu.*
8. *Männliche und weibliche PPP3CB KO Mäuse zeigen unter chronischem Einfluss von Ang II, im Vergleich zu PPP3CB WT Tieren, keinen Anstieg der Expression von Proteinbindung-assoziierten Genen wie beispielsweise Col4a1, Col4a2 und Col18a1. Weibliche PPP3CB KO Tiere weisen, im Vergleich zu weiblichen WT Tieren unter Einfluss von Angiotensin II, keine Erhöhung der Col6a1 Expression auf.*

## **V Selbstständigkeitserklärung**

(1) Ich erkläre, dass ich mich an keiner anderen Hochschule einem Promotionsverfahren unterzogen bzw. eine Promotion begonnen habe.

(2) Erklärung zum Wahrheitsgehalt der Angaben

Ich erkläre, die Angaben wahrheitsgemäß gemacht und die wissenschaftliche Arbeit an keiner anderen wissenschaftlichen Einrichtung zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht zu haben.

(3) Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Alle Regeln der guten wissenschaftlichen Praxis wurden eingehalten; es wurden keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt. Die von den verwendeten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen hab ich als solche kenntlich gemacht.

## **VI Danksagung**

Eine wissenschaftliche Arbeit ist nie das Werk einer einzelnen Person, deshalb möchte ich mich bei den Menschen zu bedanken, die mir die Erstellung meiner Dissertation ermöglicht haben.

Herrn Prof. Dr. Michael Gekle und Frau Prof. Dr. Dr. Claudia Großmann danke ich für die Vergabe des interessanten Promotionsthemas und für die Möglichkeit diese Arbeit am Julius-Bernstein-Institut für Physiologie durchzuführen. Katja Schumann und Nicole Strätz danke ich für die tatkräftige Unterstützung.

Meinen Eltern danke ich herzlich für ihre fortwährende Unterstützung und ihr Interesse an meiner Arbeit. Vor allem meiner Mutter und Großmutter möchte ich danken, ohne die mein Weg bis hier hin nicht möglich gewesen wäre.