



„Die Ca²⁺ - und Calmodulin-regulierte Proteinphosphatase Calcineurin als pharmakologisch bedeutsame Zielstruktur“

kumulative

H a b i l i t a t i o n s s c h r i f t

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium habitatus (Dr. rer. nat. habil.)

vorgelegt der

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

von

Herrn Apotheker Dr. rer. nat. Frank Erdmann
geboren am 30. August 1971 in Merseburg

Gutachter/in:

- 1. Prof. Ralf Benndorf (Universität Halle)**
- 2. Prof. Franz Hofmann (Technische Universität München)**
- 3. Prof. Hans-Peter Stasch (Bayer AG, Wuppertal)**

Halle (Saale), 26.04.2018

Publikationsleistungen:

(ohne Posterbeiträge, Stand: 16.02.2017)

① **Buchartikel**

Anzahl: 1 (Verlag Wiley)

② **Patente:**

Anzahl: 9 (DE, EP, WO)

③ **Artikel in internationalen *peer-reviewed* Zeitschriften:**

Anzahl: 40 (darunter mehrmals in „*Angewandte Chemie*“; „*EMBO Journal*“ und „*Nature Chemical Biology*“)

Ausgewählte Artikel, die Bestandteil dieser kumulativer Habilitationsschrift sind:

Publikation 1:

Erdmann F., Weiwad M.
Calcineurin inhibitors: status quo and perspectives.
Biomolecular concepts. 2011;2:65-78.

Publikation 2:

Erdmann F., Weiwad M., Kilka S., Karanik M., Pätzelt M., Baumgrass R., Liebscher J., Fischer G.
The novel calcineurin inhibitor CN585 has potent immunosuppressive properties in stimulated human T cells.
The Journal of biological chemistry. 2010;285:1888-98.

Publikation 3:

Zhang Y., Erdmann F., Baumgrass R., Schutkowski M., Fischer G.
Unexpected side chain effects at residue 8 of cyclosporin a derivatives allow photoswitching of immunosuppression.
The Journal of biological chemistry. 2005;280:4842-50.

Publikation 4:

Baumgrass R., Zhang Y., Erdmann F., Thiel A., Weiwad M., Radbruch A., Fischer G.
Substitution in position 3 of cyclosporin A abolishes the cyclophilin-mediated gain-of-function mechanism but not immunosuppression.
The Journal of biological chemistry. 2004;279:2470-9.

Publikation 5:

Lin W., Erdmann F., Quintero A., Fischer G., Zhang Y.
Thioxyated cyclosporin A for studying protein-drug interactions.
Bioorganic & medicinal chemistry letters. 2016;26:5754-6.

Publikation 6:

Malesevic M., Kühling J., Erdmann F., Balsley M.A., Bukrinsky M.I., Constant S.L., Fischer G.
A cyclosporin derivative discriminates between extracellular and intracellular cyclophilins.
Angewandte Chemie. 2010;49:213-5.

Publikation 7:

Hopkins S., Scorneaux B., Huang Z., Murray M.G., Wring S., Smitley C., Harris R., Erdmann F., Fischer G., Ribeill Y.
SCY-635, a novel nonimmunosuppressive analog of cyclosporine that exhibits potent inhibition of hepatitis C virus RNA replication *in vitro*.
Antimicrobial agents and chemotherapy. 2010;54:660-72.

Publikation 8:

Erdmann F., Zhang Y.
Reversible photoswitching of protein function.
Molecular bioSystems. 2010;6:2103-9.

Publikation 9:

Zhang Y., Erdmann F., Fischer G.
Augmented photoswitching modulates immune signaling.
Nature chemical biology. 2009;5:724-6.

Publikation 10:

Erdmann F., Lin W., Platzer C., Schmidt M., Sippl W., Fischer G., Zhang Y.
Augmented reversible photoswitching of drug-target interaction through "surface borrowing".
Biochemical pharmacology. 2017;125:84-92.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abkürzungsverzeichnis.....	III
Abbildungsverzeichnis.....	VI
Tabellenverzeichnis.....	VII
1 Einleitung.....	1
1.1 Phosphorylierung von Proteinen	1
1.2 Übersicht und Einteilung der Proteinphosphatasen.....	1
1.3 Calcineurin als Proteinphosphatase.....	4
1.3.1 Aufbau und Eigenschaften von Calcineurin	5
1.3.2 Funktion von Calcineurin in physiologischen Prozessen.....	7
1.3.2.1 Immunsystem.....	9
1.3.2.2 Nervensystem	10
1.3.2.3 Fortpflanzung	11
1.3.3 Bedeutung von Calcineurin im pathologischen Geschehen	12
1.3.3.1 Immunsuppression.....	12
1.3.3.2 Kardiale Hypertrophie	13
1.3.3.3 Neuronale Erkrankungen	13
1.3.4 Endogene Calcineurin-Inhibitoren	15
1.3.5 Therapeutisch relevante Calcineurin-Inhibitoren	17
1.3.5.1 Cyclosporine.....	17
1.3.5.1.1 Cyclosporin A.....	21
1.3.5.2 Tacrolimus.....	25
1.3.5.3 Pimecrolimus.....	30
2 ausgewählte Publikationen	33
2.1 Publikation 1	33
2.2 Publikation 2	47
2.3 Publikation 3	58
2.4 Publikation 4	67
2.5 Publikation 5	77
2.6 Publikation 6	87
2.7 Publikation 7	108
2.8 Publikation 8	121

2.9	Publikation 9	128
2.10	Publikation 10	143
3	Zusammenfassung	152
4	Literaturverzeichnis	160
5	Anhang	190
	Danksagung	VIII
	Lebenslauf	X
	Eigenständigkeitserklärung	XII

Abkürzungsverzeichnis

6HODA	6-Hydroxydopamin
aa	Aminosäuren
Abb.	Abbildung
ABC	<i>ATP binding cassette</i>
Abu	Aminobuttersäure
AC	Adenylatzyklase
Adapt78	Adaptor-Protein 78
AKAP79	<i>A-kinase anchor protein 79</i>
AUC	<i>Area under the curve</i>
bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2 protein</i>
BCS	<i>Biopharmaceutics classification system</i>
Bmt	(4R)-4-((E)-2-Butenyl)-4-methyl-L-Threonin
BV	Bioverfügbarkeit
Cabin	<i>Calcineurin binding protein</i>
Cain	Calcineurin-Inhibitor-Protein
CaM	Calmodulin
CaMK	Ca ²⁺ /Calmodulin-abhängige Proteinkinase
cAMP	zyklisches Adenosin 3',5'-monophosphat
CaN	Calcineurin; PP2B
CBP1	<i>Calcineurin binding protein 1</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CK2	Casein-Kinase 2
CK1 α	<i>PI-4,5-P₂-sensitive casein kinase 1α</i>
C _{max}	maximale Plasmakonzentration eines Arzneistoffs
cNMP	<i>cyclic nucleotide 3',5'-monophosphate</i>
CREB	<i>cAMP response element-binding protein</i>
CsA	Cyclosporin A (INN: Ciclosporin)
CsC	Cyclosporin C
CsG	Cyclosporin G
CTD	carboxy-terminale Domäne der RNA-Polymerase II
CYP	Cytochrom P450-Isoenzym
Cyp18	Cyclophilin 18
DAG	Diacylglycerol
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i>
DSCR1	<i>Down syndrom candidate region 1</i>
EBV	Epstein-Barr-Virus (= Humanes-Herpes-Virus 4)
EC	<i>Enzyme class</i> (Enzymklassifizierungssystem)
Egr	<i>Early growth response protein</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FCP	<i>TFIIIF-interacting CTD phosphatase</i>
FK506	INN: Tacrolimus

FK520	Ascomycin; FR-900520
FKBP	FK506-bindendes Protein
FOXO3	<i>Forkhead box class O family member 3</i>
GM-CSF	Granulozyten/Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor
GSK3	Glykogensynthase-Kinase 3
HAD	Haloacid-Dehalogenasen
HBV	Hepatitis B-Virus
HCV	Hepatitis C-Virus
HIV	<i>Human immunodeficiency virus</i>
Hsp	Hitzeschockprotein
HTPS	Hochdurchsatz-Testung
HWZ	Halbwertszeit
IC ₅₀	Inhibitor-Konzentration bei der 50 % der Enzymaktivität gehemmt wird
IFN γ	Interferon γ
IL	Interleukin
INN	<i>International nonproprietary name</i>
IP3	Inositol-1,4,5-trisphosphat
IR	Infrarot
JNK	<i>c-jun N-terminal kinase</i>
K _D	Dissoziationskonstante
kDa	Kilodalton
K _i	Inhibitionskonstante
K _m	Michaelis-Menten-Konstante
K _{off}	Dissoziationsratenkonstante
MCIP1	<i>Myocyte-enriched calcineurin-interacting protein 1</i>
MDa	Megadalton
MDR	<i>Multidrug resistance</i>
MIP-1 α	<i>Macrophage inflammatory protein 1α</i>
MPTP	1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NFAT	<i>Nuclear factor of activated T cells</i>
NF κ B	<i>Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NMR	<i>Nuclear magnetic resonance</i>
nNOS	neuronale Stickstoffmonoxid-Synthase
Nox2	NADPH-Oxidase 2
NS5A	nicht-strukturiertes Protein 5A
NS5B	nicht-strukturiertes Protein 5B
Nva	L-Norvalin
O/W	Öl in Wasser-Emulsionstyp
Oct2	<i>Octamer transcription factor 2</i>
p38	Mitogen-aktivierte Proteinkinase 38

PBMC	<i>Peripheral blood mononuclear cells</i>
PDE5	Phosphodiesterase 5
P-gp	P-Glycoprotein
pI	Isoelektrischer Punkt
P _i	anorganisches Phosphat
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PKG	Proteinkinase G
PLC γ	Phospholipase C γ -Isoform
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PP2B	Calcineurin; CaN
PPIase	Peptidyl-Prolyl- <i>cis/trans</i> -Isomerase
PPM	Phosphoprotein-Phosphatasen, Mg ²⁺ /Mn ²⁺ -abhängig
PPP	Phosphoprotein-Phosphatasen
RCAN1	<i>Regulator of calcineurin 1</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
SAM	S-Adenosyl-Methionin
Sar	Sarcosin
SH3	<i>Src-homology 3</i>
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
Tab.	Tabelle
TCR	T-Zell-Rezeptor; CD3
TFIIIF	Transkriptionsfaktor 2F
TGF β	<i>Transforming growth factor β</i>
t _{max}	Zeit, die vergeht bis die maximale Plasmakonzentration erreicht ist
TNF α	Tumornekrosefaktor α
UAW	Unerwünschte Arzneimittelwirkung
UV	ultraviolett

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Unterteilung der Proteinphosphatasen	2
Abb. 2: Darstellung des PPP-Phosphatoms als phylogenetischer Baum.....	3
Abb. 3: Struktur des humanen Calcineurins	6
Abb. 4: Der Calcineurin/NFAT-Signalweg	9
Abb. 5: Struktur von Cyclosporin A	18
Abb. 6: Cyclosporin A als bifunktionelles Molekül	20
Abb. 7: Ausschnitt aus der Röntgen-Kristallstruktur des CaN/CsA/Cyp18-Komplexes.....	24
Abb. 8: Struktur von Ascomycin und Tacrolimus	25
Abb. 9: Tacrolimus als bifunktionelles Molekül	26
Abb. 10: Ausschnitt aus der Röntgen-Kristallstruktur des CaN/FK506/FKBP12-Komplexes.....	27
Abb. 11: Struktur von Ascomycin und Pimecrolimus	30
Abb. 12: Struktur ausgewählter nicht-immunsuppressiver CsA-Derivate.	156
Abb. 13: mRNA-Expressionsmuster human Calcineurin A alpha (PPP3CA).	190
Abb. 14: mRNA-Expressionsmuster human Calcineurin A beta (PPP3CB)	191
Abb. 15: mRNA-Expressionsmuster human Calcineurin A gamma (PPP3CC)	192
Abb. 16: mRNA-Expressionsmuster human Calcineurin B Isoform 1 (PPP3R1).	193
Abb. 17: mRNA-Expressionsmuster human Calcineurin B Isoform 2 (PPP3R2).	194
Abb. 18: Alignment der Aminosäure-Sequenz der humanen Calcineurin A Untereinheit.....	195
Abb. 19: Alignment der Aminosäure-Sequenz der humanen Calcineurin B Untereinheit.....	196

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Merkmale der humanen Calcineurin-Isoformen	4
Tab. 2: Nomenklatur der humanen RCAN-Gene bzw. -Genprodukte	16
Tab. 3: Auflistung der Aminosäureabfolgen in den Cyclosporinen A bis Z	19

1 Einleitung

1.1 Phosphorylierung von Proteinen

Die Phosphorylierung/Dephosphorylierung von Proteinen stellt ein wichtiges Regulationsprinzip in eukaryotischen Zellen dar. Mittels dieser post-translationalen Modifikation werden sehr viele Signaltransduktionswege moduliert, wodurch die Zellen in die Lage versetzt werden, auf eine Vielzahl sich verändernder Umweltbedingungen zu reagieren und sich anzupassen. Beispiele, bei denen reversible Phosphorylierungen eines Proteins zelluläre Ereignisse regulieren, sind Membrantransport und -permeabilität [1] [2], Metabolismus [3, 4], Stofffluss durch Ionenkanäle [5, 6], Wachstums- und Differenzierungsvorgänge [7, 8], Rezeptor-Aktivität und -Internalisierung [9, 10], muskuläre Kontraktilität [11, 12] oder die Transkription von Genen und die sich anschließende Translation [13, 14]. Die Phosphorylierung bzw. anschließende Dephosphorylierung von Serin-, Threonin- und Tyrosin-Resten erfüllt dabei die Funktion eines molekularen Schalters, der die enzymatische Aktivität eines Proteins bzw. die Bindung an andere Partner (z.B. Proteine, DNA oder niedermolekulare Signalstoffe) verändern kann [15, 16].

1.2 Übersicht und Einteilung der Proteinphosphatasen

Obwohl die Phosphatgruppen-übertragenden Enzyme, die Proteinkinasen, von ebenso großer Wichtigkeit sind, soll im Folgenden auf die Proteinphosphatasen (EC 3.1.3.16) fokussiert werden. Die Proteinphosphatasen, welche von veresterten Hydroxyl-Gruppen der Aminosäuren Serin, Threonin und Tyrosin in Proteinen und Peptiden die Abspaltung von anorganischem Phosphat (P_i) katalysieren, werden demzufolge in die Tyrosin-Proteinphosphatasen, die dualspezifischen Proteinphosphatasen und die Serin/Threonin-Proteinphosphatasen unterteilt [17]. Im Gegensatz zu den Serin/Threonin- und Tyrosin-Proteinphosphatasen erkennen die dualspezifischen Proteinphosphatasen sowohl phosphorylierte Tyrosin- als auch Serin- oder Threonin-Reste. Die Serin/Threonin-Proteinphosphatasen wurden erstmals von INGBRITSEN et al. auf Grund ihrer biochemischen Eigenschaften, wie z.B. Substratspezifität und Inhibierbarkeit in zwei Klassen eingeteilt [18].

Allerdings wurden in den vergangenen Jahren aber auch zahlreiche neue Proteinphosphatasen entdeckt, die sich aber nicht eindeutig in die bestehende Nomenklatur einordnen lassen [19, 20].

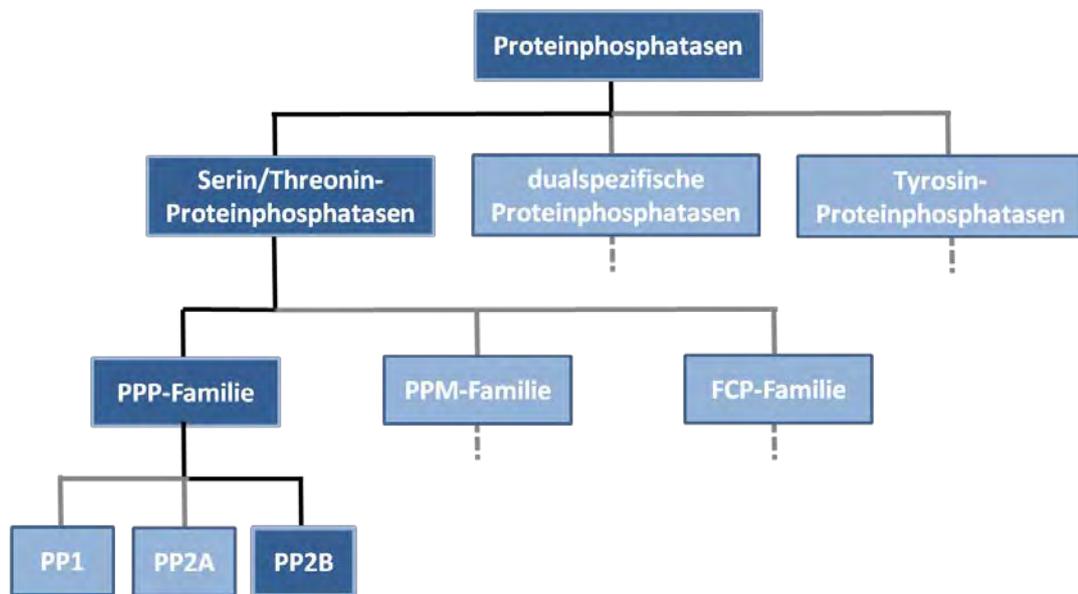


Abb. 1: Unterteilung der Proteinphosphatasen.

Enzyme, die Phosphorsäureester-Bindungen in Proteinen und Peptiden hydrolysieren können, werden in Tyrosin-Proteinphosphatasen, dualspezifische Proteinphosphatasen und Serin/Threonin-Proteinphosphatasen unterteilt. Letztere Gruppe beinhaltet die Familien PPP, PPM und FCP. Die PP2B (Calcineurin) ist ein Vertreter der PPP-Familie.

Die aktuelle Unterteilung der Serin/Threonin-Proteinphosphatasen basiert auf Aminosäuresequenz-Vergleichen der katalytischen Untereinheiten und enthüllt darüber hinaus die Existenz einer dritten Familie (Abb. 1). Die zwei Hauptfamilien PPP (Phosphoprotein-Phosphatasen) mit der PP1 und die Familie PPM (Phosphoprotein-Phosphatasen, Mg^{2+}/Mn^{2+} -abhängig) mit der PP2C als prototypischem Vertreter besitzen keine Ähnlichkeiten in der Aminosäuren-Abfolge und somit auch keine gemeinsame Konsensus-Sequenz. Obwohl sich die Aminosäuren-Anordnung um das aktive Zentrum der Enzyme unterscheidet, existieren doch Gemeinsamkeiten in der dreidimensionalen Struktur und im Katalyse-Mechanismus, was auf einen gemeinsamen evolutionären Ursprung hindeutet [21]. Die PPP-Familie hat sich aus einer Metallophosphoesterase entwickelt [22] und umfasst 7 Hauptstränge (*ppp1-7*) (Abb. 2). Interessanterweise gibt es in dieser Familie zwei Vertreter (*ppp3c* (Calcineurin) und *ppp7c*), deren enzymatische Aktivität durch Ca^{2+} positiv beeinflusst wird [23].

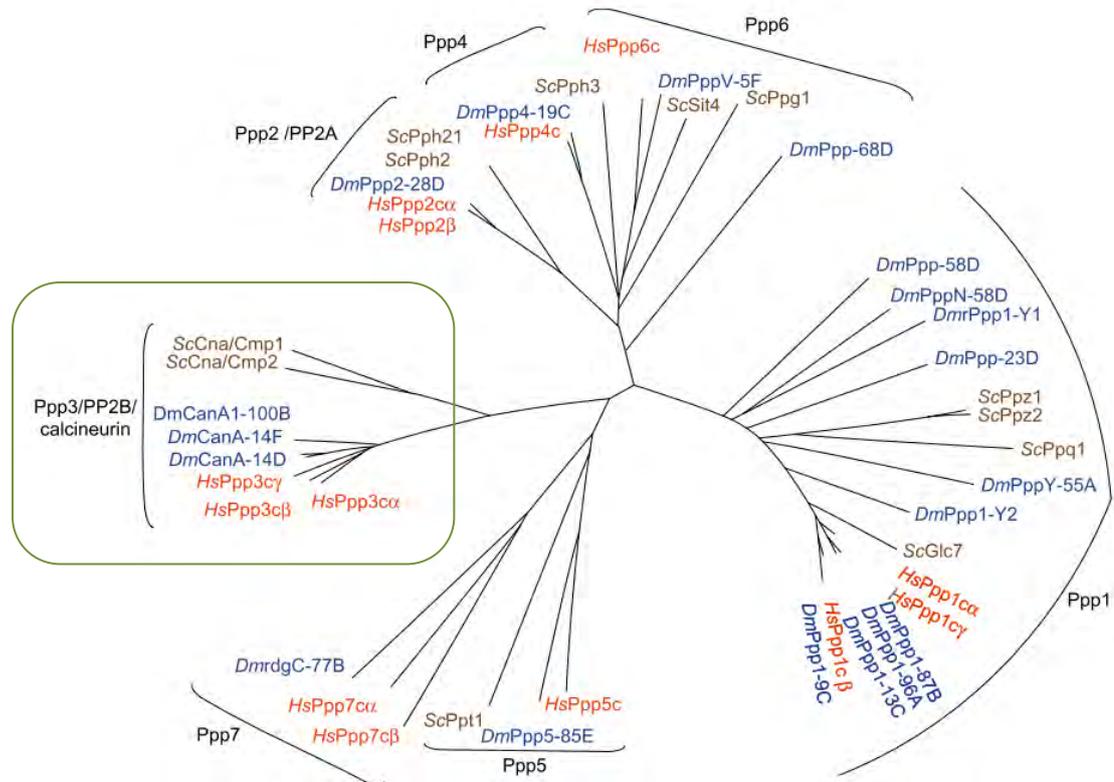


Abb. 2: Darstellung des PPP-Phosphatoms als phylogenetischer Baum. (modifiziert nach [24])

Die Abbildung zeigt die Beziehungen zwischen den Serin/Threonin-Proteinphosphatasen der PPP-Familie aus *Homo sapiens* (Hs, rot), *Drosophila melanogaster* (Dm, blau) und *Saccharomyces cerevisiae* (Sc, braun), welche durch multiples Alignment (<http://www.clustalw.genome.ad.jp/>) partieller Gensequenzen der katalytischen Domänen generiert wurden. Die Vertreter des *ppp3*-Zweiges (Calcineurin) wurden hervorgehoben (siehe Kasten).

Die FCP-Familie verdankt ihren Namen der *TFIIF-interacting CTD phosphatase 1* (FCP1), welche nicht nur den Transkriptionsfaktor IIF (TFIIF) bindet, sondern auch die C-terminale Domäne (CTD) der RNA-Polymerase II dephosphoryliert [25]. Vertreter der FCP-Familie unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Aminosäure-Sequenz und des hydrolytischen Prinzips deutlich von der PPP- bzw. PPM-Familie. So katalysieren sie Mg^{2+} -abhängig die Übertragung einer Phosphat-Gruppe vom Substrat auf Aspartat-Reste im aktiven Zentrum (DxDxV/T-Motiv), so dass intermediär ein Phospho-Aspartat entsteht. Als Zweig der Haloacid-Dehalogenase (HAD)-Superfamilie können sie darüber hinaus auch Nichtprotein-Phosphosubstrate umsetzen [26].

1.3 Calcineurin als Proteinphosphatase

Die Proteinphosphatase 2B (PP2B), auch Calcineurin (CaN) genannt, wurde im Jahr 1979 erstmals von KLEE et al. als Calmodulin-bindendes Protein aus bovinem Hirn isoliert [27]. Dabei wurde festgestellt, dass nicht nur Calmodulin (CaM) mit hoher Affinität Ca^{2+} binden kann ($K_D \leq 1 \mu\text{M}$), sondern auch Calcineurin. Nur drei Jahre später wurde von einer anderen Arbeitsgruppe entdeckt, dass Calcineurin eine Phosphatase ist und die phosphorylierte α -Untereinheit der Phosphorylase-Kinase dephosphorylieren kann [28]. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die Anwesenheit von Ca^{2+} und Calmodulin essentiell für die katalytische Aktivität des Enzyms gegenüber Phospho-Peptiden und Phospho-Proteinen ist. Deshalb wird Calcineurin auch als Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Proteinphosphatase bezeichnet [29, 30].

	katalytische Untereinheit A			regulatorische Untereinheit B	
	CaN A α	CaN A β	CaN A γ	CaN B1	CaN B2
Chromosom	4q24	10q22.2	8p21.3	2p14	9q31.1
Gen	<i>ppp3ca</i>	<i>ppp3cb</i>	<i>ppp3cc</i>	<i>ppp3r1</i>	<i>ppp3r2</i>
aa	521	524	502	168	168
kDa	58.68	59.02	57.12	19.17	19.40
pI	5.58	5.60	6.81	4.64	4.73
Kofaktoren	$\text{Fe}^{3+}, \text{Zn}^{2+}$	$\text{Fe}^{3+}, \text{Zn}^{2+}$	$\text{Fe}^{3+}, \text{Zn}^{2+}$	Ca^{2+}	Ca^{2+}

Tab. 1: Merkmale der humanen Calcineurin-Isoformen.

Das phylogenetisch hoch konservierte Calcineurin konnte bereits in vielen niederen Lebensformen (z.B. *Saccharomyces cerevisiae*, *Dictyostelium discoideum* oder *Cryptococcus neoformans*), als auch in höheren Eukaryoten (z.B. Mammalia, *Drosophila melanogaster* oder *Caenorhabditis elegans*) nachgewiesen werden [31-33]. Eine Ausnahme stellten dabei lange Zeit die Pflanzen dar, in denen dieses Enzym nicht aufgefunden wurde. Allerdings zeigen neuere Befunde einer chinesischen Arbeitsgruppe, dass sowohl in *Nicotiana tabacum*, *Brassica oleracea* und *Arabidopsis thaliana* Calcineurin-Homologa vorkommen, welche mittlerweile bereits isoliert und charakterisiert werden konnten [34]. Zahlreiche Untersuchungen belegen, dass die Proteinphosphatase in vielen Geweben des Säugerorganismus in unterschiedlichen

Varianten gebildet wird (Tab. 1). So werden im Menschen von der katalytischen Untereinheit A drei Isoformen (α , β und γ) und von der regulatorischen Untereinheit B zwei Isoformen (1 und 2) zum Teil sehr gewebespezifisch exprimiert (Anhang Abb. 13 bis Abb. 17) [35, 36]. Während die α - und β -Isoformen vorwiegend im Gehirn und in Zellen des Immunsystems gefunden werden, ist die γ -Isoform bevorzugt in den Testikeln, B-/T-Lymphozyten, natürlichen Killerzellen und dendritischen Zellen anzutreffen. Aufgrund des Expressionsmusters kann außerdem geschlossen werden, dass die Isoform 1 vorwiegend mit den Isoformen α und β und die Isoform 2 mit der γ -Isoform heterodimere Komplexe formt. Die Aminosäuresequenz der β -Isoform ist zu 80 % und die der γ -Isoform zu 77 % identisch mit der Sequenz der α -Isoform (Anhang Abb. 18). Bei den beiden Isoformen 1 und 2 der regulatorischen Untereinheit wurde sogar eine Sequenzidentität von 84 % gefunden (Anhang Abb. 19).

Intrazellulär ist Calcineurin meist im Zytoplasma lokalisiert [37, 38]. Diese Beobachtung konnten wir für alle 3 Isoformen auch in mehreren eigenen Arbeiten machen [39]. Unter bestimmten Umständen, wie z.B. nach Aktivierung der Zelle mit einem Calcium-Ionophor oder in Maus-Spermatozyten transloziert das Enzym allerdings auch in den Nucleus [40, 41]. Von Assoziationen mit Bestandteilen der Zellmembran [42], des Zytoskeletts [43, 44] bzw. neuronaler Mikrosomen [45] wurde auch schon berichtet.

1.3.1 Aufbau und Eigenschaften von Calcineurin

Wie bereits erwähnt, ist Calcineurin aus einer großen katalytischen Untereinheit A (57-59 kDa) und einer kleineren regulatorischen Untereinheit B (19-20 kDa) aufgebaut (Abb. 3) [27]. Proteinchemische Untersuchungen zeigten, dass der *N*-Terminus der B-Untereinheit posttranslational myristoyliert wird und so in der Zelle vorliegt [46]. Zur physiologischen Funktion dieser Modifizierung war bislang wenig bekannt [47, 48]. Wir konnten allerdings beobachten, dass der Myristinsäure-Rest im Molekül zu einer erhöhten Stabilität gegenüber thermisch induzierter Denaturierung führt (unpublizierte Daten). Zwei integrale EF-Hand-Strukturmodule in der regulatorischen Untereinheit sind für die hochaffine Calcium-Bindung ($K_D = 100$ pM) verantwortlich, wobei insgesamt vier Ca^{2+} -Ionen pro Calcineurin-Molekül binden können [49, 50].

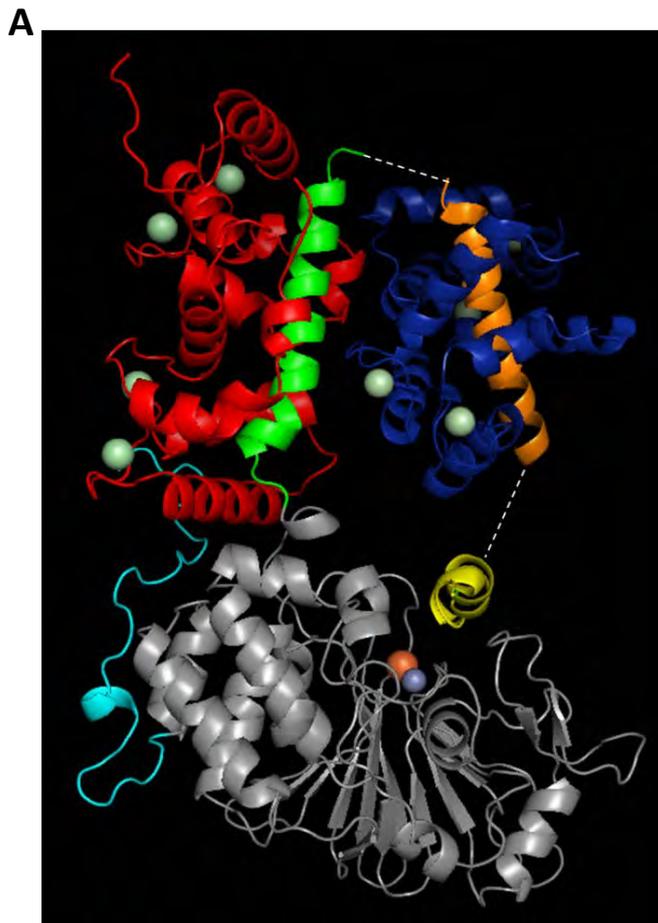
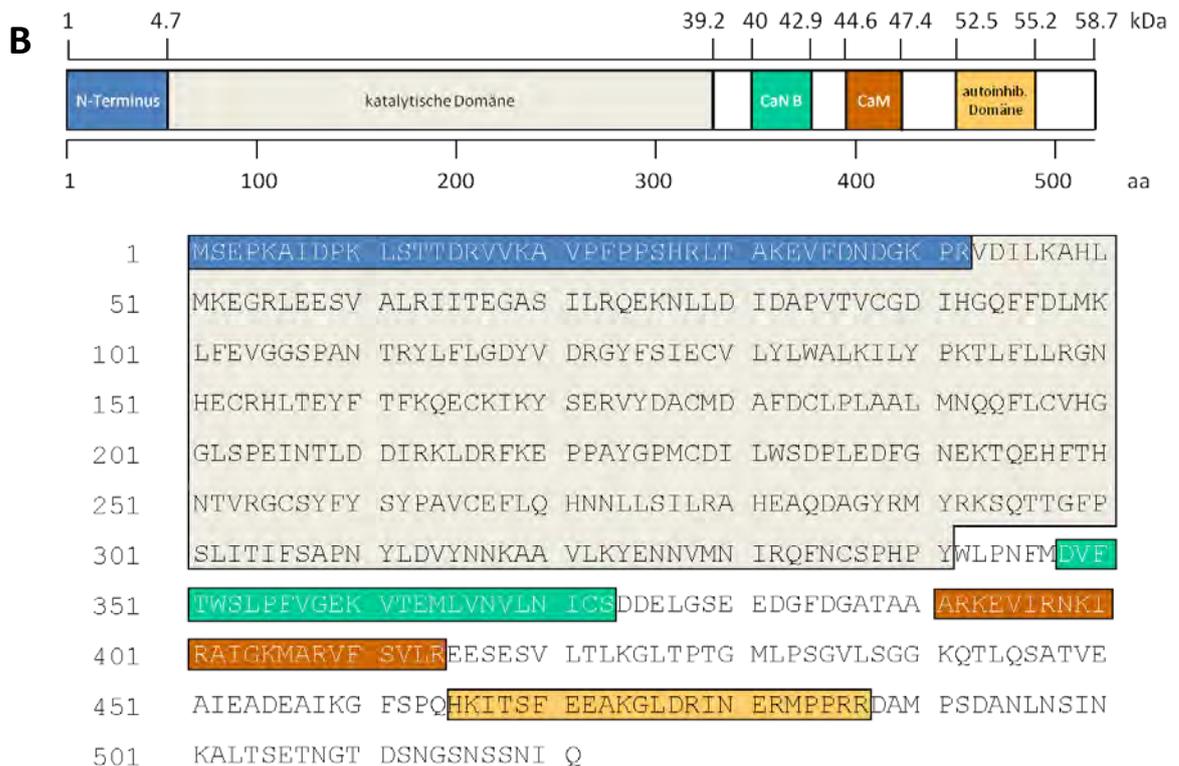


Abb. 3: Struktur des humanen Calcineurins.

(A) Modell der Struktur des heterotrimeren CaN $\alpha\alpha$ /B1/CaM-Komplexes basierend auf PDB 1AU1 und 4Q5U. Die regulatorische Untereinheit B ■ interagiert mit einer Helix der katalytischen Untereinheit ■. Das aktive Zentrum des Enzyms ist in der katalytischen Domäne □ lokalisiert, welches im nicht-aktivierten Zustand durch die autoinhibitorische Domäne ■ abgeschirmt und somit für höhermolekulare Phospho-Substrate unzugänglich ist. Das dort gebundene Fe^{3+} ist als ● und das Zn^{2+} als ● dargestellt. Die Lage der 8 Ca^{2+} ist mit ● markiert. Der N-Terminus des Enzyms □ ist am linken Rand der Abbildung dargestellt. Die CaM-bindende Domäne der Untereinheit A ■ wurde separat mit CaM ■ kokristallisiert und analysiert (PDB 4Q5U). Linien (---) deuten fehlende Aminosäuren und damit nicht vorhandene Strukturinformationen an. **(B)** Aminosäuresequenz und Domänenstruktur der α -Isoform des humanen Calcineurin A.



In ruhenden Zellen beträgt die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration circa 100 nM. Wenn diese Zellen durch physiologische Ereignisse oder Inkubation mit einem Ca^{2+} -Ionophor (z.B. Ionomycin oder A23187) aktiviert werden, strömt der *second messenger* Calcium aus den zellulären Speichern des ER/SRs und erhöht die Konzentration auf ungefähr 1 μM [51]. Dadurch wird neben anderen Ca^{2+} -bindenden Proteinen auch Calmodulin aktiviert, welches an Calcineurin bindet und vermutlich durch Wechselwirkung mit der A-Untereinheit das Enzym aktivieren kann [52]. Im aktiven Zentrum der Phosphatase ist ein $\text{Fe}^{2+/3+}/\text{Zn}^{2+}$ -Cluster als Bestandteil eines „Phosphoesterase-Motivs“ anzutreffen [53, 54]. Wenn das zweiwertige Eisen durch oxidative Prozesse zum dreiwertigen Eisen verändert wird, sinkt die enzymatische Aktivität allerdings sehr schnell. In Anwesenheit einer anti-oxidativ wirkenden Superoxiddismutase kann diese Inaktivierung indessen wirkungsvoll verhindert werden [55, 56]. Von HASHIMOTO et al. wurde berichtet, dass Calcineurin *in vivo* ein Substrat für die Casein-Kinase 2 (CK2) bzw. die Proteinkinase C (PKC) darstellt und phosphoryliert wird. Über die funktionellen Konsequenzen ist nur wenig bekannt. Diese Phosphorylierung hat nur eine Verdopplung des K_m -Wertes für das Phospho-Proteinsubstrat zur Folge, wobei die Calmodulin-Bindung nachweislich unbeeinflusst bleibt [57].

1.3.2 Funktion von Calcineurin in physiologischen Prozessen

Anfänglich vermutete man noch, dass dieses Protein vielleicht ein physiologischer Inhibitor der Calmodulin-abhängigen cNMP-Phosphodiesterase ist [58]. Durch die in den letzten 35 Jahren durchgeführten experimentellen Studien wurde jedoch immer deutlicher, dass Calcineurin eine Schlüsselrolle in vielen Calcium-vermittelten Signalwegen übernimmt und viele zelluläre Vorgänge regulieren kann. Da Calcineurin in der Lage ist, Phospho-Substrate in Abhängigkeit von der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration zu dephosphorylieren, fungiert es als Signal-Modulator. Dieser kann ein Calcium-Signal zu einer Änderung des Phosphorylierungsstatus von Proteinen oder Peptiden konvertieren [59, 60]. Viele physiologische Effekte werden dabei über den Calcineurin/*nuclear factor of activated T cells* (NFAT)-Signalweg vermittelt. Es gibt fünf humane NFAT-Isoformen, die jedoch durch differentielles Splicing oder alternative Initiation zahlreiche Sub-Isoformen hervorbringen.

Die NFAT-Proteine sind eukaryotische Transkriptionsfaktoren, die mittels DNA-Affinitätschromatographie erstmals aus den Zellkernen aktivierter T-Lymphozyten isoliert, mittlerweile aber auch in anderen Zellen nachgewiesen wurden [61-63]. Sie spielen nicht nur eine zentrale Rolle bei der Transkription wichtiger Gene im Rahmen der Immunantwort [64, 65], sondern auch für Wachstums- und Differenzierungsvorgänge u.a. der Skelettmuskulatur und des Herzens [66, 67]. Erstmals beschrieben JAIN et al., dass phosphoryliertes NFATc2 von Calcineurin dephosphoryliert werden kann [68]. In den darauf folgenden Jahren wurden allerdings noch weitere Mitglieder der NFAT-Familie als Calcineurin-Substrate identifiziert [69-71].

Darüber hinaus existieren auch Hinweise darauf, dass über ein oxidationsempfindliches Fe^{2+} im aktiven Zentrum des Calcineurins eine Verbindung zwischen zellulärer Redox-Homöostase und der Auslösung von Apoptose bestehen könnte [55, 72, 73].

Transgene Mausmodelle, bei denen die Calcineurin-kodierenden Gene ausgeschaltet wurden, sind nützliche Tools zur Untersuchung der physiologischen Funktionen. So sind in der Literatur bereits die Maus-Linien: *ppp3ca*^{-/-}, *ppp3cb*^{-/-}, *ppp3cc*^{-/-}, *ppp3r1*^{-/-} und *ppp3r2*^{-/-} und ihre entsprechenden Phänotypen beschrieben [74-79]. Die Veränderungen in den *knockout*-Tieren sind zum Teil recht komplex und mannigfaltig. So ist die Inaktivierung des Gens *ppp3ca* z.B. mit einem Defekt in der antigenspezifischen T-Zell-Antwort und strukturellen Veränderungen im limbischen System, speziell in der *Formatio hippocampi* verbunden. In *ppp3cb*^{-/-}-defizienten Mäusen wurden unter anderem eine Fehlfunktion in der Entwicklung einer kardialen Hypertrophie und Störungen in der Differenzierung von T-Lymphozyten bzw. der Immunantwort beobachtet. Männliche Mäuse, die entweder *ppp3cc*^{-/-} oder *ppp3r2*^{-/-} waren, zeigten eine Infertilität, die auf eine reduzierte Spermienmotilität zurückzuführen war. Im Tier-Modell, in dem das Gen *ppp3r1* Prosencephalon-spezifisch stillgelegt wurde, konnten in Verhaltensexperimenten Veränderungen in der bidirektionalen synaptischen Plastizität und im Arbeitsgedächtnis bzw. episodischem Gedächtnis nachgewiesen werden [80]. Nachfolgend soll exemplarisch auf drei Schwerpunkte näher eingegangen werden.

1.3.2.1 Immunsystem

Zur Funktion von Calcineurin in den Zellen des Immunsystems, insbesondere während der Immunantwort, wurden bislang die meisten Erkenntnisse zusammengetragen. So liegt NFAT im Zytoplasma nicht stimulierter T-Lymphozyten in einer mehrfach phosphorylierten Form vor (Abb. 4). Nach Aktivierung des Calcineurins durch Ca^{2+} und Calmodulin bindet das Enzym an den Transkriptionsfaktor, um dessen anschließende Dephosphorylierung zu katalysieren [81]. Die Entfernung der Phosphatreste hat zur Folge, dass sich die Konformation des NFAT ändert, wodurch eine bis dahin maskierte Kernlokalisationssequenz zugänglich wird [82].

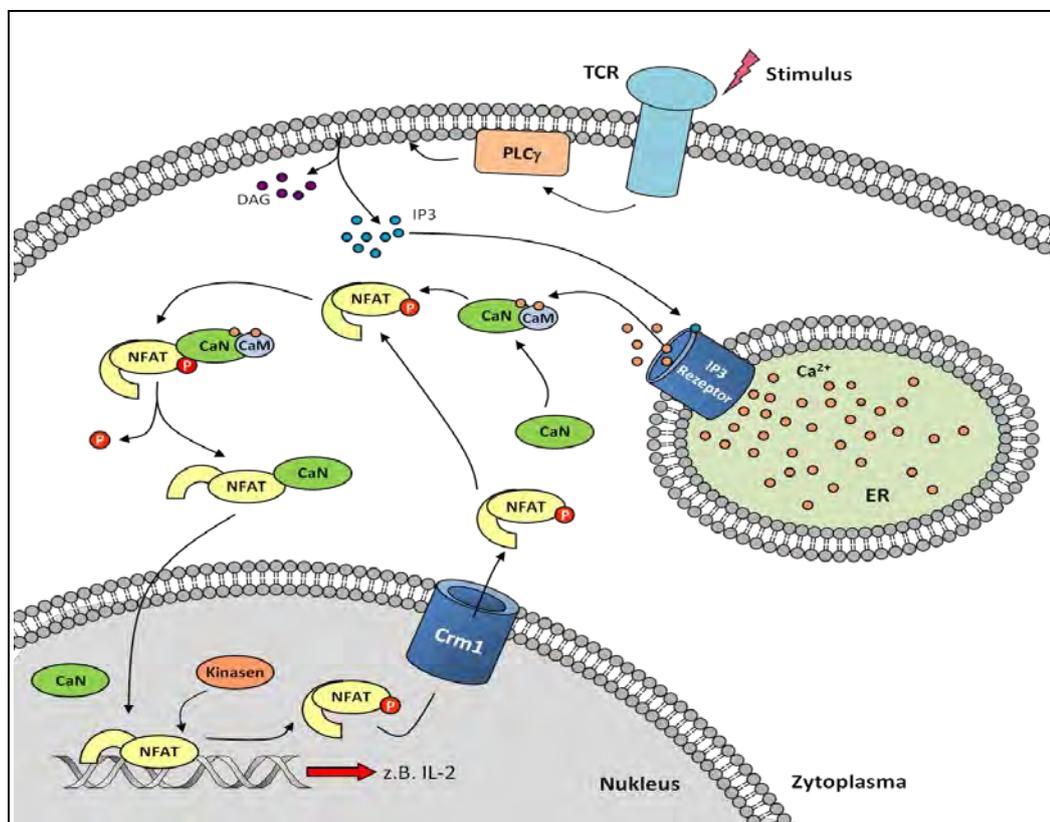


Abb. 4: Der Calcineurin/NFAT-Signalweg.

Der NFAT-Signalweg wird in T-Lymphozyten über den TCR aktiviert. Nachfolgend wird aus Membranlipiden durch die membranständige Phospholipase C γ (PLC γ) neben Diacylglycerol (DAG) auch Inositol-3-phosphat (IP3) gebildet. IP3 öffnet den Ligand-gesteuerten Calcium-Kanal wodurch Ca^{2+} aus dem ER in das Zytosol diffundieren und dort an Calcineurin und Calmodulin binden kann. NFAT erfährt durch die Dephosphorylierung eine konformationelle Veränderung und kann nun in den Nukleus translozieren. Dort bindet es an spezifische DNA-Sequenzen und initiiert dadurch die Transkription von Genen (z.B. IL-2). Kinasen rephosphorylieren NFAT, wodurch seine Bindung an die DNA aufgehoben wird und er durch das Export-Protein Crm1 wieder in das Zytosol zurück transportiert wird [83].

NFAT transloziert dann im Komplex mit Calcineurin in den Zellkern und bindet dort an spezifische DNA-Sequenzen [40, 84]. Solche zum Teil palindromisch angeordnete Basenfolgen wurden bereits in zahlreichen regulativen Bereichen, wie z.B. denen der

Gene für die Zytokine IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, TNF α , GM-CSF, IFN γ ; der Chemokine IL-8, MIP-1 α ; der Transkriptionsfaktoren Egr, Oct2 und sogar Vertretern der NFAT-Familie selbst gefunden [85-89]. Simultan wird die Kern-Exportsequenz des NFAT durch die Proteinphosphatase maskiert, weshalb das nukleäre Export-Protein Crm1 den Transkriptionsfaktor nicht wieder zurück in das Zytoplasma transportieren kann [90]. Nach dem Absinken der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration wird das nun kernständige NFAT durch Kinasen (möglicherweise GSK3, JNK, p38 und CKI α) wieder phosphoryliert, wodurch es erneut eine Konformationsänderung erfährt, von der DNA abdissoziiert und in das Zytoplasma ausgeschleust wird [91-93]. Die Kinasen werden jedoch nicht durch den sinkenden Ca²⁺-Spiegel aktiviert, sondern es besteht ein dynamisches Gleichgewicht zwischen Phosphorylierung und Dephosphorylierung, welches durch Erhöhung der Calcineurin-Aktivität in Richtung Dephosphorylierung verschoben wird [94]. Calcineurin besitzt bei der Aktivierung von T-Zellen vermutlich eine Schlüsselfunktion, obwohl dieses Enzym nur einen Bestandteil eines komplizierten Signal-Netzwerkes aus sich wechselseitig beeinflussenden Proteinkinasen, Proteinphosphatasen und anderen Faktoren darstellt [95]. Wie Inhibitionsversuche mit einer Jurkat-Zelllinie bestätigten, ist die intrazelluläre Phosphatase-Aktivität des Calcineurins als limitierender Faktor der T-Lymphozyten-Aktivierung nach Antigen-Kontakt anzusehen [96].

1.3.2.2 Nervensystem

Die Vermutung einer großen physiologischen Bedeutung in neuronalen Strukturen, wie z.B. Striatum oder Formatio hippocampi liegt nahe, da dort sowohl die α - als auch die β -Isoform in Konzentrationen bis zu 6 $\mu\text{g}/\text{mg}$, und damit fast 10-fach höher als in anderen Geweben, anzutreffen sind [97]. Zahlreiche neuronale Prozesse, wie z.B. Exzitation, Freisetzung von Neurotransmittern, synaptische Plastizität und Gedächtnisbildung werden nachweislich durch Veränderung des Ca²⁺-Spiegels und reversible Protein-Phosphorylierungen moduliert [98-101]. Schon im Jahr 1984 wurden die phosphorylierten Reaktionsprodukte der Proteinkinase A (PKA), Proteinkinase G (PKG), zyklischen-Nukleotid-und-Ca²⁺-unabhängigen Proteinkinase und Ca²⁺/Calmodulin-abhängigen Proteinkinase (CaMK) *in vitro* als Calcineurin-Substrate mit K_m -Werten im einstelligen mikromolaren Bereich identifiziert [102]. Mittlerweile existieren allerdings Studien, die

Calcineurin mit mehreren dieser oben genannten Ereignisse sogar funktionell in Verbindung bringen [103-106]. Weitere gut untersuchte Beispiele sind die Regulation der Adenylatzyklase (AC) [107] bzw. neuronalen NO-Synthase (nNOS) [108, 109]. Dabei korreliert die enzymatische Aktivität der AC in Primärzellen, wie auch immortalisierten Zellen direkt mit der Proteinphosphatase-Aktivität [110]. Zudem werden gleichzeitig die Phosphodiesterasen, als funktionelle Gegenspieler zur AC, durch Calcineurin gehemmt, was auf eine stringente Kontrolle des intrazellulären cAMP-Spiegel hindeutet [58]. Darüber hinaus scheint die Proteinphosphatase bei der Entwicklung des Cerebellums, der Reorganisation des Zytoskeletts und dem Untergang von Nervenzellen eine wichtige Rolle zu spielen [111-113]. In epigenetischen Untersuchungen konnten HANNON et al. 2015 beweisen, dass depolarisationsinduzierte Änderungen im DNA-Methylierungsmuster von Neuronen durch den Ca^{2+} -Einstrom über L-Typ CaV1-Kanäle und/oder Calcineurin bewirkt werden [114].

1.3.2.3 Fortpflanzung

Das testikuläre Calcineurin wird vornehmlich durch Assoziation der γ -Isoform der katalytischen Untereinheit mit der Isoform 2 der regulatorischen Untereinheit gebildet (Anhang Abb. 15 und Abb. 17). MIYATA et al. konnten in einem von ihnen etablierten Mausmodell zeigen, dass sowohl beim *ppp3cc^{-/-}*, als auch beim *ppp3r2^{-/-}*-Genotyp bei männlichen Tieren im Phänotyp eine Infertilität beobachtet werden konnte. Dies ist auf eine verminderte Flexibilität des Mittelstücks des Spermiums zurückzuführen. Durch diese Beeinträchtigung wird die Spermien-Motilität eingeschränkt und es gelingt dem Spermatozoid nicht, in die Epididymis zu wandern. In *in vitro*-Fertilisationsexperimenten konnte außerdem eine reduzierte Penetration der Zona pellucida festgestellt werden. Der oben beschriebene Phänotyp ließ sich ebenso in Wildtyp-Mäusen durch die Applikation von Calcineurin-inhibierenden Substanzen nachahmen. Dieser Effekt war nach 4-5 Tagen voll ausgeprägt und 1 Woche nach dem Absetzen der Medikation vollständig reversibel, so dass der Autor Calcineurin-Inhibitoren als viel versprechenden Ausgangspunkt für die Entwicklung kontrazeptiver Medikamente für Männer erachtet [74]. Die klinische Relevanz dieser Beobachtung wurde 2016 in einer Metaanalyse überprüft [115].

Calcineurin-Inhibitoren senken in der Tat die Fertilität männlicher Nierentransplantat-Patienten, obwohl chronische Nierenerkrankungen ohnehin von einer verminderten Fertilität begleitet werden. Allerdings kehrt die Zeugungsfähigkeit meist nach 15-24 Monaten zurück, wenn nur die niedrigste noch immunsuppressive Dosis gegeben wird. Nichtsdestotrotz besteht noch ein massiver Klärungsbedarf durch prospektive randomisierte doppel-verblindete klinische Studien, da die momentane Studienanzahl bzw -qualität nicht ausreichend ist, um diesbezüglich zuverlässige Aussagen zu treffen.

1.3.3 Bedeutung von Calcineurin im pathologischen Geschehen

Auf Grund der vorstehend erläuterten Schlüsselstellung der PP2B in vielen physiologischen Prozessen, ergibt sich die Möglichkeit, über die Beeinflussung der intrazellulären Calcineurin-Aktivität prophylaktisch oder therapeutisch ins pathologische Geschehen einzugreifen.

1.3.3.1 Immunsuppression

Das Immunsystem eines nicht immunsupprimierten Organempfängers wird durch ein Allo- oder Xenotransplantat (z.B. Niere, Herz, Pancreas oder Lunge) aktiviert und reagiert auf das körperfremde Gewebe mit einer starken und oft lebensbedrohlichen Abstoßungsreaktion [116]. Durch kontinuierliche Gabe von Calcineurin-inhibierenden Medikamenten kann die T-Zell-vermittelte Immunantwort so weit unterdrückt werden, dass keine Abstoßung stattfindet, der Organismus aber noch in der Lage ist, viele Krankheitserreger abzuwehren [117, 118]. Auch die gefürchtete Graft-versus-Host-Reaktion, die nach der Übertragung von allogenen Knochenmark auftritt, lässt sich mit diesen Arzneistoffen ebenso wirksam verhindern [119]. Eine weitere Indikation für diese Substanzen sind schwere Autoimmunerkrankungen, bei denen Antigene auf Körperzellen von selbst-reaktiven Immunzellen erkannt und attackiert werden. Beispiele dafür sind systemischer Lupus erythematosus, rheumatoide Arthritis, Psoriasis, Autoimmun-Hepatitis oder Myasthenia gravis [120-124]. Außerdem können viele Patienten mit hyperreaktiven Immunreaktionen wie z.B. atopischer Dermatitis oder Keratokonjunktivitis von einer Calcineurin-Inhibition ebenso profitieren [125-127].

1.3.3.2 Kardiale Hypertrophie

Es ist schon seit geraumer Zeit bekannt, dass Calcineurin eine wichtige Rolle bei der Entwicklung von skelettalen Muskelfasern spielt [128]. Allerdings ist die Bedeutung der PP2B bei der Entstehung einer myokardialen Hypertrophie als Reaktion auf pathologische Stimuli weitaus höher einzustufen [129]. DE WINDT et al. konnten im Mausmodell zeigen, dass die Herz-spezifische Expression endogener Inhibitoren, wie z.B. die nicht-kompetitiv Calcineurin-inhibierende Domäne des *A-kinase anchoring protein 79* (AKAP79), Cain/Cabin-1 oder *Regulator of calcineurin 1* (RCAN1) zu einer Verminderung der kardialen Hypertrophie nach Isoprenalin-Dauerinfusion oder *Pressure overload* durch abdominale Aorten-Konstriktion führt [130]. Die Anwendung von Calcineurin-inhibierenden Medikamenten für diese Indikation ist unzweckmäßig, da die Nutzen/Risiko-Bewertung wegen dem Auftreten zahlreicher unerwünschter Arzneimittelwirkungen (UAW) bei den notwendig hohen Dosierungen negativ ausfällt [131]. Durch Expression einer konstitutiv aktiven Calcineurin-Variante im Mäuse-Herz ließ sich eine massive kardiale Hypertrophie mit negativem ventrikulärem *Remodeling* nachweisen [132]. Auf der anderen Seite waren die Myokard-Zellen dieser Tiere jedoch vor Reperfusionsschäden nach Ischämie geschützt [133]. Das Enzym scheint auch adaptive und protektive Signalfunktionen zu besitzen, da Mäuse, bei denen ein Aktivitätsverlust aller kardialen Calcineurin-Isoformen induziert wird, einen letalen Phänotyp entwickeln [134]. Der Calcineurin/NFAT-Signalweg wird vermutlich auch nach einem Myokard-Infarkt aktiviert, wie eine tierexperimentelle Studie nahelegt. Physiologische Wachstumsstimuli (z.B. Ausdauertraining) scheinen den Signalweg allerdings eher zu hemmen und die Expression fetaler Gen-Programme, welche für ein pathologisches *Remodeling* essentiell ist, zu supprimieren [135].

1.3.3.3 Neuronale Erkrankungen

Nach einem pathologischen Ereignis, wie z.B. nach einem Apoplex, führt die massive Ausschüttung des exzitatorischen Neurotransmitters Glutamat zu einem starken Ca^{2+} -Influx durch den *N-Methyl-D-Aspartat* (NMDA)-Rezeptor [136]. Dadurch wird Calmodulin aktiviert und kann nun seinerseits die nNOS stimulieren [137]. Darüber hinaus

wird das Enzym durch Calcineurin dephosphoryliert, wodurch dessen NO-generierende Aktivität weiter ansteigt [138, 139]. Neben der verstärkten Neurotransmitter-Freisetzung führt vor allem diese exzessive NO-Produktion zu einer gesteigerten Apoptoserate von neuronalen Zellen [140]. Die Verminderung der Calcineurin-Aktivität kann den Anteil an phosphorylierter nNOS erhöhen, was ebenso wie der Einsatz von nNOS-Inhibitoren zu neuroprotektiven Effekten führt [141]. So wird im Ischämie-Modell das Infarktareal nicht nur verkleinert, sondern die Remission im Vergleich zu unbehandelten Kontrolltieren auch signifikant beschleunigt [142, 143]. Darüber hinaus ist bekannt, dass Calcineurin sowohl mit pro-apoptotischen als auch mit anti-apoptotischen Mitgliedern der bcl-2-Familie interagieren und damit direkt neuronale Apoptose-Vorgänge beeinflussen kann. So ist z.B. das pro-apoptotische bcl-2 in seiner phosphorylierten Form ein Substrat für Calcineurin [144]. Im Ratten-Modell für traumatische Hirnschädigung führte die Applikation von Calcineurin-Inhibitoren im Hippocampus zu einer Normalisierung der synaptischen Funktion und Wiedererlangung der neuronalen Plastizität [145]. Wie bereits in Abschnitt 1.3.2.2 angedeutet, spielt neben der PP1 und PP2A vor allem die PP2B eine große Rolle bei der neuronalen Entwicklung [112]. Die Ausbildung der Zellpolarität bzw. die axonale Elongation sind Prozesse, welche unter anderem von der korrekten Funktion des Zytoskeletts und damit des Mikrotubuli-assoziierten Proteins Tau abhängen [146, 147]. Eine Hemmung der Calcineurin-Aktivität kann die während der normalen neuronalen Entwicklung stattfindenden Tau-Dephosphorylierung partiell blockieren [148]. Bei ultrastrukturellen Untersuchungen solcher Neuronen wurde festgestellt, dass diese nur kleine axonale Elongationen ausbilden konnten [44]. Neuere Studien schreiben Calcineurin eine Schlüsselrolle bei der Entstehung neurodegenerativer Erkrankungen zu [149]. So ist bereits in frühen Stadien der Krankheit eine synaptische Dysfunktion und neuronaler Zelltod nachweisbar. Im Gehirn von Morbus Alzheimer-erkrankten Patienten wurde *post mortem* ein abnormal hyperphosphoryliertes Tau nachgewiesen, was neben der Akkumulation von fibrillären β -Amyloid-Peptiden (Plaques) nach heutigem Wissensstand als unabdingbar für die Entwicklung und das Fortschreiten der Erkrankung anzusehen ist [150]. Lange Zeit lag der Tau-vermittelte Pathomechanismus im Dunkeln. Mittlerweile gibt es jedoch Hinweise, dass die ohnehin schon erhöhte Calcineurin-Aktivität die *CaMKIV/cAMP response element-binding protein* (CREB)-vermittelte

Signaltransduktion abschwächt und damit zu Fehlfunktionen der Synapsen und Gedächtnisdefiziten führt [151]. Wie PLEISS et al. nachweisen konnten, ist die erhöhte Calcineurin-Aktivität nicht auf eine gesteigerte Expression des Enzyms oder die Abwesenheit inhibierender Bindungspartner zurückzuführen, sondern auf eine proteolytische Spaltung. Dabei werden vermutlich die autoinhibitorische Domäne und eventuell auch Teile der CaM-Bindungsdomäne durch Calpain entfernt [152-154]. Hyperphosphoryliertes Tau-Protein spielt aber nicht nur bei der Pathogenese des Morbus Alzheimer eine Rolle, sondern möglicherweise auch bei der Entstehung der Chorea Huntington. Bei dieser Tauopathie induziert das pathologisch veränderte Protein Huntingtin eine *Down*-Regulation der PP2B, wodurch im R2/6- und Q175-Mausmodell vermehrt hyperphosphorylierte Tau-Spezies auftraten [155]. Einen weiteren Beitrag zur β -Amyloid-induzierten Neurotoxizität liefert die Interaktion zwischen Calcineurin und dem Transkriptionsfaktor *forkhead box class O family member 3* (FOXO3), deren Blockade in Astrozyten zu einer Neuroprotektion führt [156].

1.3.4 Endogene Calcineurin-Inhibitoren

Obwohl die Phosphatase-Aktivität des Calcineurins hauptsächlich über die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration und Komplexbildung mit Calmodulin reguliert wird, haben Interaktionen mit anderen Bindungspartnern gleichfalls einen modulierenden Einfluss auf das Enzym. So verfügen einige dieser Proteine, wie z.B. *Regulator of calcineurin 1* (RCAN1) oder NFATc2, mit der Sequenzfolge PxlxIT und/oder LxVP über definierte Calcineurin-Interaktionsmotive [157, 158]. Produkte der *RCAN*-Gene wurden bereits vor der Entdeckung ihrer Calcineurin-regulierenden Eigenschaften unter anderen Namen in der Literatur erwähnt und in anderen Zusammenhängen untersucht (siehe Tab. 2). Im Jahr 2007 erfolgte auf Grund der bestehenden Heterogenität eine Vereinheitlichung und damit auch Vereinfachung der Nomenklatur [159]. Basierend auf den *RCAN*-Genen entstehen jedoch durch alternatives *Splicing* oder differentielle Initiation der Transkription mehrere Isoformen. Die verstärkte oder verminderte Expression dieser Gene kann entsprechende Krankheitsbilder hervorrufen. Zum Beispiel stellten ERMAK et al. einen Zusammenhang zwischen der chronischen Überexpression des *RCAN1*-Gens (z.B. bei Trisomie 21) und dem Auftreten von Morbus Alzheimer her [160].

Aber auch das klinische Erscheinungsbild des Down-Syndroms oder die kardiale Hypertrophie werden mit der unphysiologischen Expression dieses Gens in Verbindung gebracht [161].

Genfamilie	Synonym	Referenz
<i>RCAN1</i>	<i>DSCR1</i>	[162]
	<i>Adapt78</i>	[160]
	MCIP1	[163]
	Calcipressin, Csp1, CALP1	[164], [165], [166]
	RCAN1	[161]
<i>RCAN2</i>	ZAKI-4	[167]
<i>RCAN3</i>	DSCR1L2	[168]
	RCAN3	[169]

Tab. 2: Nomenklatur der humanen RCAN-Gene bzw. -Genprodukte. (modifiziert nach [159])

Die Bedeutung der verwendeten Abkürzungen ist im Abkürzungsverzeichnis aufgeführt, soweit das Akronym nicht schon im Text erläutert wurde.

Unabhängig davon wurde mit Hilfe einer katalytisch inaktiven und C-terminal trunkierten Calcineurin-Variante als *bait* im Hefe-Dihybrid-System das Protein Cabin1/Cain als Bindungspartner identifiziert [170]. Mehrere Arbeiten belegen, dass Cabin1/Cain Calcineurin in zwei zellulären Prozessen inhibiert. Zum Einen führt die Überexpression dieses Proteins in T-Lymphozyten zu einer verminderten transkriptionellen Aktivierung des IL-2-Promoters nach Stimulation der T-Zell-Rezeptor-Signaltransduktion durch Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) und Ionomycin [170, 171]. Dabei sind für die Interaktion zwischen Cabin1/Cain und Calcineurin sowohl der Ca^{2+} -Anstieg, als auch die Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) essentiell. Cabin1/Cain ist ein Phosphoprotein, welches in nicht-aktivierten T-Lymphozyten in einer hypophosphorylierten Form vorliegt und erst durch PKC-katalysierte Phosphorylierung eine Konformationsänderung erfährt, wodurch sich die Affinität zu Calcineurin drastisch erhöht. Dies könnte eventuell einen Sicherheitsmechanismus darstellen, um die Calcineurin-Aktivität im Laufe der T-Zell-Aktivierung zu begrenzen. Zum Anderen ist die synaptische Vesikel-Endozytose der zweite wichtige Prozess [172]. Cabin1/Cain ist ein Multidomänen-Protein, in dem neben einer kurzen C-terminal lokalisierten Calcineurin-Bindungsdomäne zahlreiche Prolin-Cluster zu

finden sind, welche über *Src-homology 3* (SH3)-Domänen putativer Interaktionspartner gebunden werden können. Amphiphysin enthält eine SH3-Domäne und ist Bestandteil eines großen Proteinkomplexes, der für die Ca^{2+} -abhängige synaptische Vesikel-Endozytose und folgende Freisetzung von Neurotransmittern an den Nervenendigungen verantwortlich ist. Durch Überexpression von Cabin1/Cain wird in HEK293-Zellen die Transferrin-Endozytose unterbunden, wie auch alternativ durch Inkubation mit PP2B-Inhibitoren. Über die Interaktion mit Dynamin 1 ist Calcineurin in den Endozytose-Proteinkomplex eingebunden und Cabin1/Cain fungiert als negativer Regulator von Calcineurin und der Neurotransmitter-Endozytose [173]. Neben den proteinischen Modulatoren wurden mittlerweile auch nicht-proteinische Effektormoleküle beschrieben. Beispielhaft soll hier ein Gangliosid aus dem Gehirn von *Rattus norvegicus* erwähnt werden, welches aus einer fraktionierten Membran-Präparation isoliert und als Calcineurin-inhibierend beschrieben wurde [174].

1.3.5 Therapeutisch relevante Calcineurin-Inhibitoren

Obwohl es mehrere Substanzen gibt, die zielgerichtet als Calcineurin-Inhibitoren entwickelt oder deren PP2B-hemmende Eigenschaften eher zufällig entdeckt wurden [175], sind aus dieser Arzneistoffgruppe in der EU momentan nur 3 Substanzen zugelassen: Ciclosporin (Sandimmun® und Generika), Tacrolimus (Prograf®, Protopic® und Generika) und Pimecrolimus (Elidel®). Diese werden je nach Indikation topisch und/oder systemisch angewandt.

1.3.5.1 Cyclosporine

Die ersten beiden Vertreter der Cyclosporine (Cyclosporin A (CsA) und C (CsC)) wurden im Jahr 1976 von einer Arbeitsgruppe der damaligen Sandoz AG in Basel aus Kulturüberständen eines Pilzes isoliert, der fälschlicherweise als *Trichoderma polysporum* bestimmt wurde. Der Mikroorganismus wurde aus Bodenproben vermehrt, die aus Wisconsin (USA) und Hardanger Vidda (Norwegen) stammten. Erst im Jahr 1992 konnten STIMBERG et al. mittels elektrophoretischem Karyotyping charakteristische Chromosomenlängen-Polymorphismen bestimmen und den Fehler bei der Stamm-Bestimmung aufdecken. Bei dem Cyclosporin-Produzenten handelt es sich eigentlich um

den Schlauchpilz *Tolypocladium inflatum* GAMS, der heute immer noch zur Gewinnung dieser Sekundärmetabolite herangezogen wird und großtechnisch in belüfteter Submerskultur wächst.

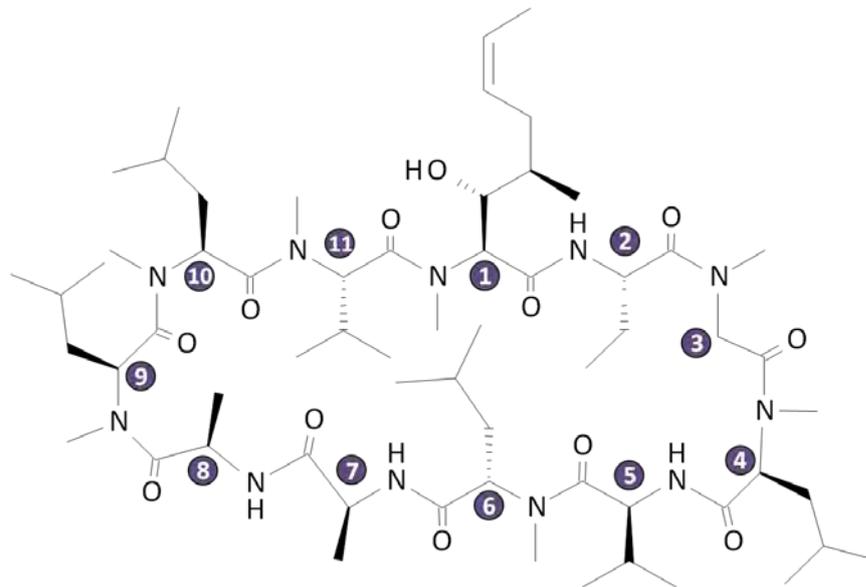


Abb. 5: Struktur von Cyclosporin A.

Dargestellt ist die zyklische Struktur des Cyclosporin A-Moleküls mit Nummerierung der 11 Aminosäuren. Die Namen der einzelnen Bausteine sind Tab. 3 zu entnehmen.

Die Cyclosporine sind cyclische Undekapeptide mit mehreren nicht-proteinogenen Aminosäuren (D-Ala, Sar oder MeBmt) und partiellen *N*-Methylierungen der Peptidbindungen (Abb. 5). Obwohl CsA und CsC bei der Aufreinigung mengenmäßig den Hauptanteil darstellen, konnten in den darauf folgenden Jahren noch zahlreiche weitere Cyclosporine isoliert und zum Teil auch chemisch und zellbiologisch analysiert werden (Tab. 3). Auf Grund der nicht-proteinogenen Aminosäuren in den Molekülen ist davon auszugehen, dass die Cyclosporine nicht durch ribosomale Proteinsynthese gebildet werden. Im Jahr 1990 wurde von LAWEN et al. aus dem Pilz eine Cyclosporin-Synthase (Uniprot: Q09164, Gen: *simA*) aufgereinigt und untersucht [176]. Das hochmolekulare Multidomänen-Enzym (15281 aa, 1,69 MDa), welches mehrere Einzelaktivitäten (z.B. Polyketid-Synthase, AMP-abhängige Ligase und SAM-abhängige Methylase) in sich vereint, biosynthetisiert alle natürlich vorkommenden Cyclosporine und kann durch gezielte Zufuhr ausgewählter Precursor-Moleküle die Bildung bestimmter Metabolite fördern.

So kann z.B. die Ausbeute an CsA durch Zufuhr von DL- α -Abu von 77 % auf 100 % gesteigert oder die Synthese von CsG durch Anreicherung des Kulturmediums mit L-Nva überhaupt erst ermöglicht werden [177].

Cs	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨	⑩	⑪
A	MeBmt	Abu	Sar	MeLeu	Val	MeLeu	Ala	D-Ala	MeLeu	MeLeu	MeVal
B	MeBmt	Ala	Sar	MeLeu	Val	MeLeu	Ala	D-Ala	MeLeu	MeLeu	MeVal
C	MeBmt	Thr	Sar	MeLeu	Val	MeLeu	Ala	D-Ala	MeLeu	MeLeu	MeVal
D	MeBmt	Val	Sar	MeLeu	Val	MeLeu	Ala	D-Ala	MeLeu	MeLeu	MeVal
E	MeBmt	Abu	Sar	MeLeu	Val	MeLeu	Ala	D-Ala	MeLeu	MeLeu	Val
F	Desoxy-MeBmt	Abu	Sar	MeLeu	Val	MeLeu	Ala	D-Ala	MeLeu	MeLeu	MeVal
G	MeBmt	Nva	Sar	MeLeu	Val	MeLeu	Ala	D-Ala	MeLeu	MeLeu	MeVal
H	MeBmt	Abu	Sar	MeLeu	Val	MeLeu	Ala	D-Ala	MeLeu	MeLeu	D-MeVal
I	MeBmt	Val	Sar	MeLeu	Val	MeLeu	Ala	D-Ala	MeLeu	Leu	MeVal
K	Desoxy-MeBmt	Val	Sar	MeLeu	Val	MeLeu	Ala	D-Ala	MeLeu	MeLeu	MeVal
L	Bmt	Abu	Sar	MeLeu	Val	MeLeu	Ala	D-Ala	MeLeu	MeLeu	MeVal
M	MeBmt	Nva	Sar	MeLeu	Nva	MeLeu	Ala	D-Ala	MeLeu	MeLeu	MeVal
N	MeBmt	Nva	Sar	MeLeu	Val	MeLeu	Ala	D-Ala	MeLeu	Leu	MeVal
O	MeLeu	Nva	Sar	MeLeu	Val	MeLeu	Ala	D-Ala	MeLeu	MeLeu	MeVal
P	Bmt	Thr	Sar	MeLeu	Val	MeLeu	Ala	D-Ala	MeLeu	MeLeu	MeVal
Q	MeBmt	Abu	Sar	Val	Val	MeLeu	Ala	D-Ala	MeLeu	MeLeu	MeVal
R	MeBmt	Abu	Sar	MeLeu	Val	Leu (?)	Ala	D-Ala	MeLeu	Leu (?)	MeVal
S	MeBmt	Thr	Sar	Val	Val	MeLeu	Ala	D-Ala	MeLeu	MeLeu	MeVal
T	MeBmt	Abu	Sar	MeLeu	Val	MeLeu	Ala	D-Ala	MeLeu	Leu	MeVal
U	MeBmt	Abu	Sar	MeLeu	Val	Leu	Ala	D-Ala	MeLeu	MeLeu	MeVal
V	MeBmt	Abu	Sar	MeLeu	Val	MeLeu	Abu	D-Ala	MeLeu	MeLeu	MeVal
W	MeBmt	Thr	Sar	MeLeu	Val	MeLeu	Ala	D-Ala	MeLeu	MeLeu	Val
X	MeBmt	Nva	Sar	MeLeu	Val	MeLeu	Ala	D-Ala	Leu	MeLeu	MeVal
Y	MeBmt	Nva	Sar	MeLeu	Val	Leu	Ala	D-Ala	MeLeu	MeLeu	MeVal
Z	Methylamino-octansäure	Abu	Sar	MeLeu	Val	MeLeu	Ala	D-Ala	MeLeu	MeLeu	MeVal

Tab. 3: Auflistung der Aminosäureabfolgen in den Cyclosporinen A bis Z. (modifiziert nach [178])

Die Aminosäuresequenz des CsA bildet die Basis für den Vergleich der anderen 25 aufgereinigten Pilz-Metabolite. Vom CsA abweichende Ringglieder sind blau dargestellt. Bmt= (4R)-4-((E)-2-Butenyl)-4-methyl-L-Threonin

Dreizehn der in Tab. 3 aufgeführten Substanzen zeigen eine starke bis schwache immunsuppressive Aktivität, die *in vivo* mit einer Calcineurin-Inhibition in Verbindung steht [178]. Obwohl CsA oft als Calcineurin-Inhibitor bezeichnet wird, ist diese Bezeichnung streng genommen nicht richtig. In diversen Phosphatase-Aktivitätsassays mit rekombinant hergestelltem oder aus Gewebe-isoliertem Calcineurin ist in Gegenwart von CsA kein Hemmeffekt nachweisbar. Eine Hemmung kommt nur zustande, wenn ein „Vermittler-Protein“ zugegen ist.

Solch ein Protein ist zum Beispiel Cyclophilin 18 (Cyp18), welches als Mitglied der Cyclophilin-Familie zur Enzymklasse der Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerasen (PPlasen) (EC 5.2.1.8) gehört und im Komplex mit CsA die katalytische Aktivität des Calcineurins in einer als „*gain-of-function*“ bezeichneten Weise inhibiert [179]. Es ist demzufolge ein bifunktionelles Molekül mit einer Bindungsdomäne für Calcineurin und einer für Vertreter der Cyclophiline (Abb. 6).

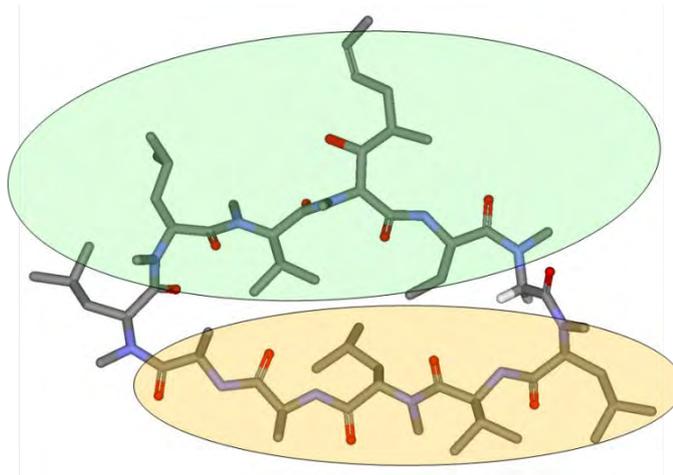


Abb. 6: Cyclosporin A als bifunktionelles Molekül.

Die Aminosäuren 4 bis 8 (gelb) sind an der Interaktion mit Calcineurin beteiligt und die Aminosäuren 1, 2, 10 und 11 an der mit Cyp18 (grün).

PPlasen kommen ubiquitär sowohl in prokaryotischen als auch in eukaryotischen Lebewesen vor und katalysieren dort die *cis/trans*-Isomerisierung der Peptidbindung *N*-terminal von Prolin-Resten in Oligopeptiden und Proteinen [180-182]. Die PPlasen werden entsprechend ihrer Aminosäuresequenz-Homologie und Inhibierbarkeit durch CsA oder Tacrolimus (FK506) in die Familie der Cyclophiline (Cyp), der FK506-bindenden Proteine (FKBP) und die der Parvuline (Par) eingeteilt. Die Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerisierungsaktivität des prototypischen Cyp18 wird durch Bindung an CsA mit K_i -Werten im einstelligen nanomolaren Bereich gehemmt [181]. Zur FKBP-Familie gehörten ursprünglich Proteine, wie z.B. FKBP12, welche FK506 mit vergleichbar hoher Affinität binden können, wodurch sich deren PPlase-Aktivität ebenfalls vermindert [183]. Mittlerweile existieren aber auch Mitglieder, die konstitutiv PPlase-inaktiv sind (FKBP38 [184] oder FKBP36 [185, 186]). Im Gegensatz dazu sind Vertreter der Parvuline, weder alleine, noch in Komplexen mit bislang identifizierten Inhibitoren in der Lage, Calcineurin zu inhibieren (eigene unpublizierte Arbeiten).

1.3.5.1.1 Cyclosporin A

CsA (INN: Cyclosporin) ist aufgrund seiner großen medizinischen Bedeutung das am besten charakterisierte Cyclosporin. Seine Einführung in die klinische Therapie hat vor allem die Erfolge und Fortschritte der Transplantationsmedizin in den letzten Jahrzehnten beflügelt, wenn nicht sogar erst ermöglicht.

Cyclosporin ist in Deutschland für folgende Indikationen zugelassen [187]:

- Prophylaxe der Transplantat-Abstoßung nach allogenen Transplantationen von Niere, Leber, Herz, Herz-Lunge, Lunge und Pankreas sowie Behandlung der Transplantat-Abstoßung bei Patienten, die zuvor andere Immunsuppressiva erhalten haben
- Prophylaxe der Transplantat-Abstoßung nach Knochenmark-Transplantationen; Prophylaxe und Therapie der Graft-versus-Host-Krankheit
- schwere endogene Uveitis
 - manifeste, nicht infektiöse Uveitis intermedia oder posterior mit Erblindungsgefahr, (soweit die übliche Therapie nicht anspricht oder unverträgliche UAW auftreten)
 - Behçet-Uveitis mit rezidivierend-entzündlicher Mitbeteiligung der Retina
- schwerste therapieresistente Formen der Psoriasis, insbesondere vom Plaque-Typ, die mit einer konventionellen systemischen Therapie nicht ausreichend behandelbar sind
- steroidabhängiges und steroidresistentes nephrotisches Syndrom infolge glomerulärer Krankheiten wie glomerulärer Minimalveränderungen, fokaler segmentaler Glomerulosklerose oder membranöser Glomerulonephritis bei Erwachsenen und Kindern, bei denen Glucocorticoide oder Alkylanzien entweder nicht ausreichend wirksam oder aufgrund ihrer Risiken nicht vertretbar sind
- schwere aktive rheumatoide Arthritis bei Patienten, bei denen sich eine konventionelle Therapie einschließlich mindestens eines stark wirksamen Basistherapeutikums (z.B. Sulfasalazin, parenterale Goldverbindungen, niedrig dosiertes Methotrexat) als ungeeignet erwiesen hat
- schwere therapieresistente Formen einer länger bestehenden atopischen Dermatitis, die mit einer konventionellen Therapie nicht ausreichend behandelbar sind

Dabei kommt der Arzneistoff in unterschiedlichen Darreichungsformen zum Einsatz: Weichkapsel, Lösung zur Einnahme, Augentropfen, Konzentrat zur Zubereitung einer Infusionslösung und ein speziell formuliertes Präkonzentrat (Sandimmun Neoral®) zur oralen Einnahme bzw. in einer Weichkapsel, aus denen *in vivo* eine Nanoemulsion entsteht. Die im Gastrointestinaltrakt gebildete Emulsion hat gegenüber den konventionellen Oralien mehrere Vorteile bezüglich der Pharmakokinetik. Die Verabreichung von Sandimmun Neoral® resultiert in einer 59 % höheren c_{\max} und einer ca. 29 % höheren Bioverfügbarkeit als Sandimmun®. Dabei wird c_{\max} schon nach 1-2 h erreicht. Die Beziehung zwischen Dosis und *area under the curve* (AUC) von Ciclosporin ist im therapeutischen Dosisbereich linear, obwohl die interindividuelle und intraindividuelle Variabilität für AUC und c_{\max} etwa 10-20 % beträgt [187].

CsA stellt nicht nur galenisch eine Herausforderung dar (BCS Klasse II), sondern besitzt auch eine relativ geringe therapeutische Breite. Deshalb müssen die Wirkstoff-Spiegel engmaschig kontrolliert werden, um das Auftreten und die Stärke von UAW zu minimieren und gleichzeitig eine ausreichende Immunsuppression zu gewährleisten. In der Transplantationsmedizin wird CsA bei nierentransplantierten Patienten manchmal als Monotherapeutikum, oft aber auch in Kombination mit Glucocorticoiden oder Azathioprin/Mycophenolat bzw. in der Tripeltherapie mit Glucocorticoiden und Azathioprin eingesetzt. Ein Absetzen des Ciclosporins führt gehäuft zu Abstoßungsreaktionen und damit zu einem geringeren Transplantatüberleben. Für die meisten Indikationen werden Vollblut-Spiegel von 150-300 ng/ml angestrebt, wobei die Tal-Spiegel im Regelfall nicht unter 50-150 ng/ml sinken dürfen [187]. Die Metabolisierung erfolgt zu einem großen Teil über CYP3A4/5, CYP2C8 und CYP2C9, so dass zahlreiche Pharmaka oder Nahrungsbestandteile die Pharmakokinetik verändern können. Darüber hinaus wird der Arzneistoff sehr effizient durch den ABC-Transporter P-Glycoprotein (P-gp) befördert. Experimentell hat man versucht, diesen Umstand auszunutzen, um die P-gp-vermittelte *multidrug resistance* (MDR) von Tumorzellen zu unterlaufen und deren Sensitivität gegenüber Zytostatika zu erhöhen [188, 189]. Mittlerweile wurden auf Grund der überzeugenden Ergebnisse auch mehrere klinische Studien initiiert, deren vorläufige Auswertungen positiv ausfielen [190-193].

Allerdings birgt das immunsuppressive CsA auch selbst ein Tumor-promovierendes Potential in sich, da entartete Zellen vom Immunsystem nun nicht mehr so effizient bekämpft werden können und die Inzidenz für bestimmte Tumorerkrankungen steigt [194, 195]. Außerdem aktiviert die Substanz den *transforming growth factor beta* (TGF β)-Signalweg, der mit der Proliferation und der Differenzierung von (Tumor-)Zellen in Verbindung steht. Die Aktivierung von TGF β wird auch als eine molekulare Ursache für das Auftreten einer Reihe von UAW diskutiert, wie z.B. der renalen Fibrosierung oder gingivalen Hyperplasie [196]. Ein TGF β -neutralisierender Antikörper war hingegen im Tiermodell in der Lage, die Entwicklung der beschriebenen UAWs aufzuhalten [197].

Bislang wurden erst zwei Kristallstrukturen des humanen Calcineurin/CsA/Cyp18-Komplexes veröffentlicht (PDB 1MF8 und 1M63), welche im Jahr 2002 von zwei Arbeitsgruppen unabhängig von einander aufgeklärt werden konnten [198, 199]. In beiden Modellen bindet der CsA/Cyp18-Komplex nicht im aktiven Zentrum des Enzyms, sondern nur in dessen Nähe, so dass vermutlich auch sterische Effekte zur Inhibition beitragen. Die Bindung findet dabei in der so genannten *latch*-Region der Phosphatase statt, die durch Interaktion der regulatorischen Untereinheit mit der katalytischen Untereinheit geformt wird (Abb. 7). So ist es gut vorstellbar, dass die gezielte Modifikation des CsA-Moleküls, speziell in den Kontaktregionen zum Cyclophilin bzw. Calcineurin, Derivate mit neuen pharmakodynamischen Eigenschaften hervorbringen sollte. Von Seiten der biochemischen bzw. pharmakologischen Grundlagenforschung, aber auch klinisch interessant wären z.B. monofunktionelle Inhibitoren, die entweder Cyclophiline oder Calcineurin inhibieren können oder deren Aktivität bzw. Lokalisation modulierbar ist. Die Entwicklung Cyclophilin-spezifischer CsA-Derivate war bereits mehrfach erfolgreich [200-202], die Veränderung zu anderen Wirkqualitäten hin ist nach eigenen Erfahrungen weitaus schwieriger zu realisieren, aber möglich. Auch in den nächsten Jahren und Jahrzehnten werden sicher weitere neue Derivate synthetisiert und charakterisiert, die entweder nebenwirkungsärmer sind, ein verbessertes pharmakokinetisches Profil besitzen oder gänzlich neue Eigenschaften aufweisen und damit neue Indikationen beanspruchen.

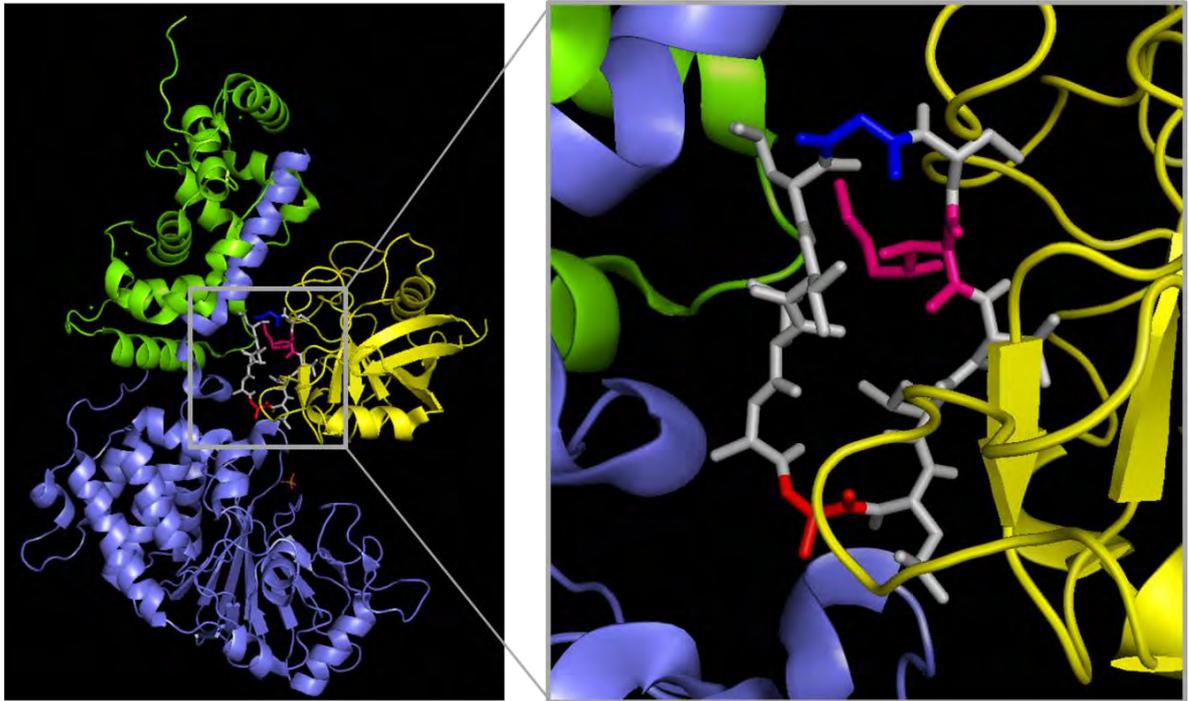


Abb. 7: Ausschnitt aus der Röntgen-Kristallstruktur des CaN/CsA/Cyp18-Komplexes. (PDB: 1M63)

Das Bild zeigt CsA (grau) im Komplex mit humanem Calcineurin A α (cyan)/B1 (grün) basierend auf den Daten von HUA1 et al. [198]. In der Vergrößerung sind die Positionen 1 (MeBmt; violett), 3 (L-Sar; rot) und 8 (D-Ala; blau) des CsA farblich hervorgehoben, um die Orientierung des Moleküls im Komplex zu verdeutlichen.

Ein weiterer spannender pharmakodynamischer Aspekt des CsA ist dessen Wirkung auf das *Human immunodeficiency virus* (HIV). Schon 1992 entdeckten KARPAS et al., dass sowohl CsA, als auch FK506 das Wachstum von HIV1- und HIV2-infizierten CD4⁺-Zellen inhibieren können [203]. Die Idee der Entwicklung neuer HI-antiviraler Medikamente wurde von Forschern der damaligen Sandoz AG aufgegriffen, die daraufhin SDZ NIM811 (Melle4-CsA, siehe Abb. 12) als nicht immunsuppressives Derivat entwickelten und ausgiebig testeten [204]. Es stellte sich heraus, dass durch derartige Cyp-Inhibitoren vermutlich die Cyp18-gag-Interaktion beeinflusst wird und deshalb die Vermehrung des Virus zum Erliegen kommt [205]. Der genaue molekulare Mechanismus der Wechselwirkung war lange Zeit unbekannt. Erst neuere Arbeiten belegen, dass Cyp18 vermutlich das Virus-Capsid stabilisiert, den nukleären Import fördert und damit die Replikationseffizienz erhöht [206, 207].

1.3.5.2 Tacrolimus

FK506 (INN: Tacrolimus) wurde im Jahr 1987 von Wissenschaftlern der Fujisawa Pharmaceutical Company in Osaka aus Kulturüberständen des gram-negativen Bakteriums *Streptomyces tsukubaensis* isoliert und detailliert untersucht. Es zeigte sich schnell, dass die immunsuppressive Wirkung der neuen Verbindung dem CsA in nichts nachstand, wie in mehreren *in vitro*- und *in vivo*-Testmodellen beobachtet wurde [208-213]. Im Gegenteil, FK506 erwies sich sogar oft als die potentere Substanz [214, 215].

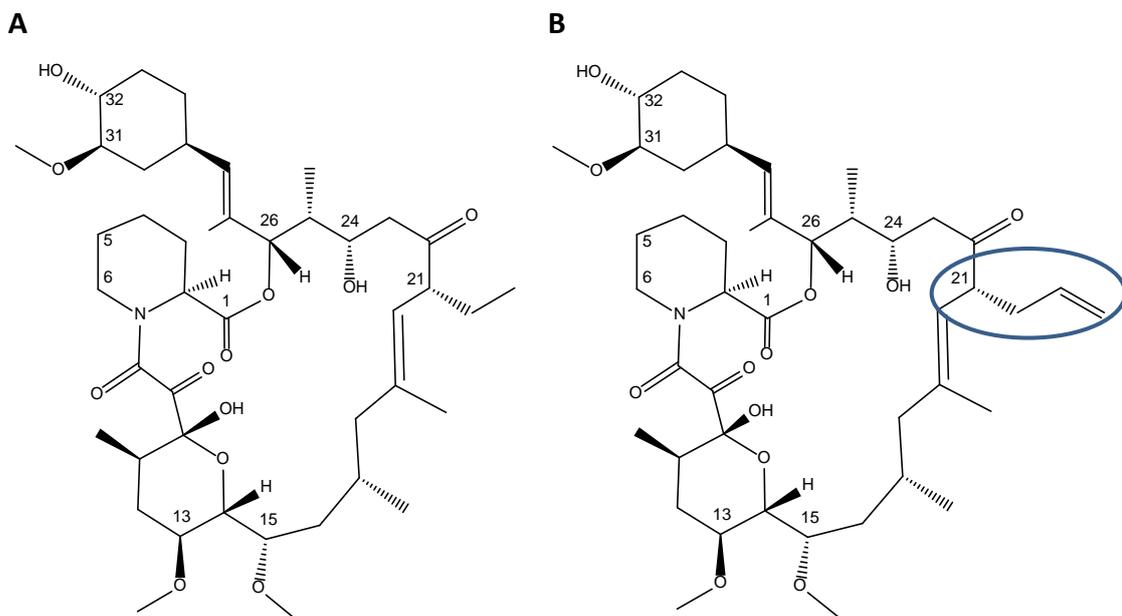


Abb. 8: Struktur von Ascomycin und Tacrolimus.

Darstellung der chemischen Struktur von (A) Ascomycin (FK520; FR-900520) und (B) Tacrolimus (FK506). Der strukturelle Unterschied zum Ascomycin (Ally- statt Ethyl-Gruppe) in Position 21 ist markiert.

Strukturell leitet sich FK506 vom Naturstoff Ascomycin ab (Abb. 8), wobei letzterer schon in den frühen 1960er Jahren als vermeintliches Antibiotikum aus *Streptomyces hygroscopicus* isoliert wurde [216]. Im Jahr 1988 reinigten HATANAKA et al. eine Substanz (FR-900520) aus Fermentationsüberständen auf, die immunsuppressive Eigenschaften hatte [217]. Durch NMR-Untersuchungen konnte deren chemische Struktur aufgeklärt und die Übereinstimmung mit Ascomycin festgestellt werden [218]. Daraufhin wurden in den folgenden Jahren zahlreiche Derivate - meist durch Substitution in Position 32 - synthetisiert und in Hinblick auf ihr therapeutisches Potential getestet [219-222]. Ascomycin wurde bislang nicht als immunsuppressives Medikament zugelassen. Über die möglichen Gründe kann nur spekuliert werden. So konnte für Ascomycin z.B. im

Tiermodell eine nicht-lineare Pharmakokinetik (*ceiling*-Effekt) vermutlich durch limitierte Resorption nach oraler Applikation festgestellt werden [223]. Darüber hinaus ist das immunsuppressive Potential im murinen *Graft-versus-Host*- bzw. Herztransplantat-Modell im Vergleich mit FK506 geringer [224].

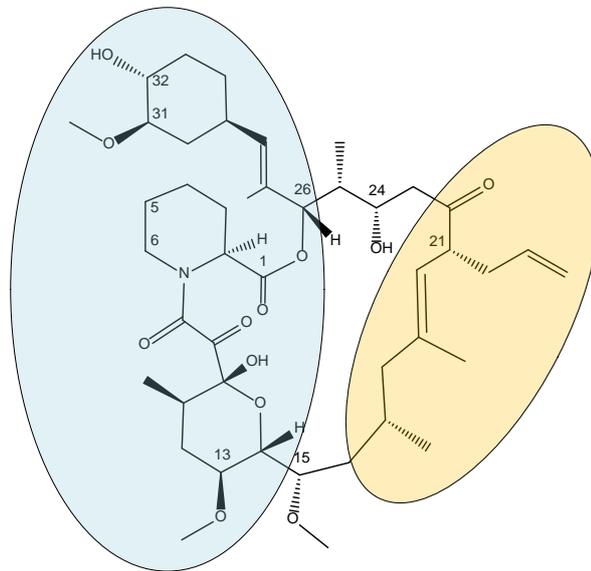


Abb. 9: Tacrolimus als bifunktionelles Molekül.

Gezeigt ist die Makrolactam-Struktur des Tacrolimus mit seiner Calcineurin-Bindungsregion (orange) und dem FKBP-Interaktionsmotiv (blau).

Im Mikroorganismus wird FK506 mit Hilfe einer multifunktionellen Polyketid-Synthase aus entsprechenden Vorstufen gebildet [225]. Das finale Molekül hat ebenso wie CsA bifunktionelle Eigenschaften: neben einem Bindemotiv für Calcineurin sind mehrere zum Teil heterozyklische 6-Ringstrukturen als Interaktionsmotiv für FKBP in einem Makrolactam vereint (Abb. 9). In den letzten Jahren wurden bereits mehrere 3D-Strukturen für diverse FK506/FKBP-Komplexe (nicht gezeigt) und eine für den bovinen Calcineurin/FK506/FKBP12-Komplex (Abb. 10) aufgeklärt. Auch bei FK506 haben Medizinalchemiker versucht, die FKBP-Inhibition strukturell von der Calcineurin-Inhibition abzutrennen. Dabei wurde vor allem auf die spezifische Hemmung der FKBP fokussiert. Die in Analogie zu den Cyclophilinen ebenfalls ubiquitär vorkommenden FKBP, sind im physiologischen und pathologischen Geschehen von Bedeutung. Neben Hsp70 und 90 ist FKBP52 Bestandteil des nicht-aktivierten Mineralocorticoid-Rezeptor-Komplexes [226]. Aber auch die Hormon-Bindung und die nukleäre Translokation des Glucocorticoid-Rezeptor-Komplexes wird durch FKBP52 gefördert, während FKBP51 darauf eher

hemmend wirkt [227]. FKBP51 scheint vorzugsweise an neuronalen Prozessen beteiligt zu sein. Dieses Protein wird unter anderem mit der Regulation des Schlaf-Wach-Rhythmus und der Entwicklung psychischer Erkrankungen, wie z.B. Depressionen in Verbindung gebracht [228].

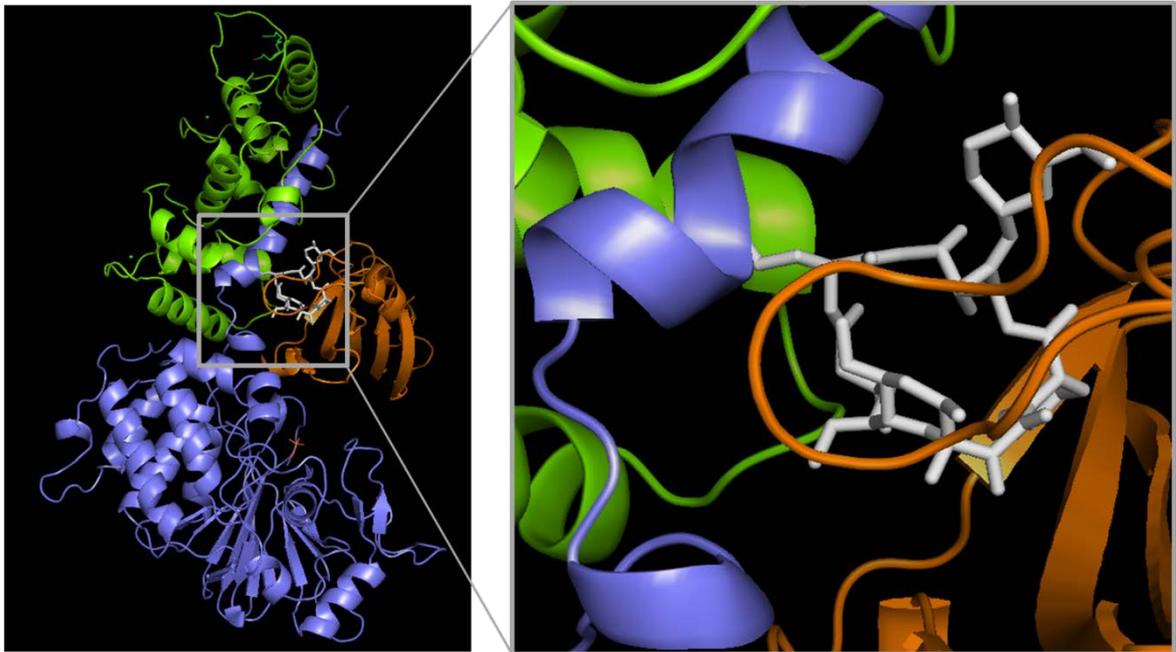


Abb. 10: Ausschnitt aus der Röntgen-Kristallstruktur des CaN/FK506/FKBP12-Komplexes. (PDB: 1TCO) Abgebildet ist FK506 (grau) im Komplex mit bovinem Calcineurin A α (cyan)/B1 (grün) und bovinem FKBP12 (orange), basierend auf den Daten von GRIFFITH et al. [229]. Die Bindungsstelle für den FK506/FKBP12-Komplex liegt am Calcineurin-Molekül etwas oberhalb der des CsA/Cyp18-Komplexes und überlappt mit dieser nur partiell (vgl. Abb. 7).

Zusätzlich zeigen niedermolekulare FKBP-Inhibitoren in verschiedenen Tiermodellen neuroprotektive und -regenerative Eigenschaften [230]. GPI1046 ist eine solche experimentelle Substanz, die z.B. *in vitro* primäre dopaminerge Neurone vor einer Schädigung durch die neurotoxischen Substanzen 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin (MPTP) und 6-Hydroxydopamin (6HODA) schützen kann [231]. Mittlerweile konnten diese Wirkungen bereits *in vivo* in mehreren Rattenmodellen bestätigt werden [232, 233]. Die Nachfolgersubstanz GPI1485 zeigte in präklinischen Tests ähnliche Effekte für die Behandlung des Morbus Parkinson [234]. Von der Firma Vertex Pharmaceutical wurde mit V10367 eine Verbindung entwickelt, welche in Rattenmodellen für Rückenmarks- und periphere Nervenverletzungen die Wiedererlangung der Funktion und eine Nervenregeneration beschleunigt [235-237].

Zugelassen ist Tacrolimus in Deutschland für folgende Indikationen:

Oralia bzw. Parenteralia [238]:

- Prophylaxe der Transplantatabstoßung bei Leber-, Nieren- oder Herztransplantat-Empfängern
- Behandlung der Transplantatabstoßung, die sich gegenüber anderen Immunsuppressiva als therapieresistent erweist

Dermatika [239]:

- Behandlung des Ekzemschubs
Erwachsene und Jugendliche (ab 16 Jahren)
Behandlung des mittelschweren bis schweren atopischen Ekzems bei Erwachsenen, die auf herkömmliche Therapien wie z. B. topische Kortikosteroide nicht ausreichend ansprechen oder diese nicht vertragen
Kinder (ab 2 Jahren)
Behandlung des mittelschweren bis schweren atopischen Ekzems bei Kindern, die nicht ausreichend auf eine herkömmliche Therapie wie z. B. topische Kortikosteroide angesprochen haben
- Erhaltungstherapie
Behandlung des mittelschweren bis schweren atopischen Ekzems zur Vorbeugung von Ekzemschüben und zur Verlängerung der schubfreien Intervalle bei Patienten mit häufigen Exazerbationen (d. h. 4 x pro Jahr oder öfter), die initial auf eine Behandlung mit zweimal täglicher Applikation von Tacrolimus-Salbe nach spätestens 6 Wochen ansprechen (Ekzeme abgeheilt, fast abgeheilt oder nur noch leichte Läsionen)

Im *off-label-use* wäre FK506 z.B. auch zur symptomatischen Behandlung der Psoriasis gut geeignet, wie mehrere experimentelle Ansätze und mittlerweile auch eine klinische Pilotstudien belegen [240-242]. Mögliche Darreichungsformen für den Arzneistoff sind: Hartkapseln, Retardtabletten, Konzentrat zur Herstellung einer Infusionslösung und hydrophobe Salbe.

Je nach transplantiertem Organ und individueller Situation (Alter und Gesundheitszustand des Patienten bzw. Komedikation) erfolgt die Dosierung des Tacrolimus, wobei Konzentrationen im Vollblut zwischen 5 und 20 ng/ml angestrebt werden, die in der Erhaltungstherapie aber oft reduziert werden können.

Aufgrund seiner schlechten Löslichkeit, aber guten Penetration, wird Tacrolimus auch in die Klasse II des BCS eingeordnet [243]. Bereits in den Enterozyten wird ein Teil des Arzneistoffs durch CYP3A4 metabolisiert, wie auch nachfolgend in der Leber. Es wurden bereits mehrere Metabolite mit geringer oder fehlender immunsuppressiver Wirkung nachgewiesen, wobei im systemischen Kreislauf allerdings nur ein inaktiver Metabolit aufgefunden wurde. Somit kann davon ausgegangen werden, dass die Metabolisierungsprodukte nicht zu den pharmakodynamischen Wirkungen von Tacrolimus beitragen. Der Arzneistoff ist aber nicht nur Substrat, sondern auch ein Inhibitor des CYP3A4-Enzyms. Daraus lässt sich ein bedeutendes Interaktionspotential mit anderen Arzneistoffen und Nahrungsmitteln ableiten, welches dadurch ein großes Risiko für Über- und Unterdosierungen in sich birgt. Unterdosierungen führen zu einer unzureichenden Immunsuppression und Überdosierungen zu einem gehäuften Auftreten von UAWs. Diese betreffen nahezu alle Organsysteme und sind im Folgenden auszugsweise aufgeführt: Blutbildungsstörungen (Anämie, Leuko- und Thrombozytopenie), hyperglykämisch Zustände, Hyperkaliämie, Krampfanfälle, Parästhesien, Tremor, Tinnitus, Ischämie der Koronargefäße, Hypertonie, Hepatitis mit Ikterus und Nierenfunktionsstörungen (Oligurie, Tubulusnekrose, akutes Nierenversagen) [238]. Gleichzeitig ist die Inzidenz für bakterielle, virale, mykotische und protozoale Infektionen erhöht, wie auch für benigne und maligne Neoplasien einschließlich Epstein-Barr-Virus-(EBV)-assoziierte lymphoproliferative Erkrankungen und Tumore der Haut.

Pharmakokinetische Untersuchungen haben ergeben, dass c_{\max} nach 1-3 h mit einer durchschnittlichen BV von 20-25 % erreicht wird. Bei den meisten Patienten wird innerhalb von 3 d eine *steady-state*-Konzentration erreicht. Der Nahrungsmittel-Effekt ist stark ausgeprägt: so konnte im Vollblut nach einer Mahlzeit mit moderatem Fettgehalt (34 %) eine Reduktion der AUC um 27 % und c_{\max} um 50 % , sowie eine Erhöhung von t_{\max} auf 173 % beobachtet werden. Die Verteilung von Tacrolimus kann nach einem 2-Kompartiment-Modell beschrieben werden, wobei der meiste Arzneistoff im Blut an

Erythrozyten gebunden vorliegt. Nur 20 % liegen im Plasma an Serumalbumin und α_1 -saures Glycoprotein adsorbiert vor, was letztendlich zu einem apparenten Verteilungsvolumen von 1300 l und bei gesunden Probanden zu einer Gesamtkörper-Clearance von 2,5 l/h führt [238]. Experimentell wurde in gesunden Individuen eine HWZ von 43 h bestimmt. Weniger als 1 % des applizierten Tacrolimus wird unverändert über den Urin und Fäzes ausgeschieden, wobei die hepato-billiäre Elimination den Hauptweg darstellt.

1.3.5.3 Pimecrolimus

Der Arzneistoff Pimecrolimus (Elidel®; SDZ ASM 981) ist ebenfalls ein halbsynthetisches Ascomycin-Derivat (Abb. 11) und wurde 1997 von Wissenschaftlern der Novartis Pharma AG synthetisiert [244]. Er weist ebenfalls immunsuppressive Eigenschaften auf, wird allerdings momentan nur topisch in Form einer 1 %igen O/W-Creme angewandt.

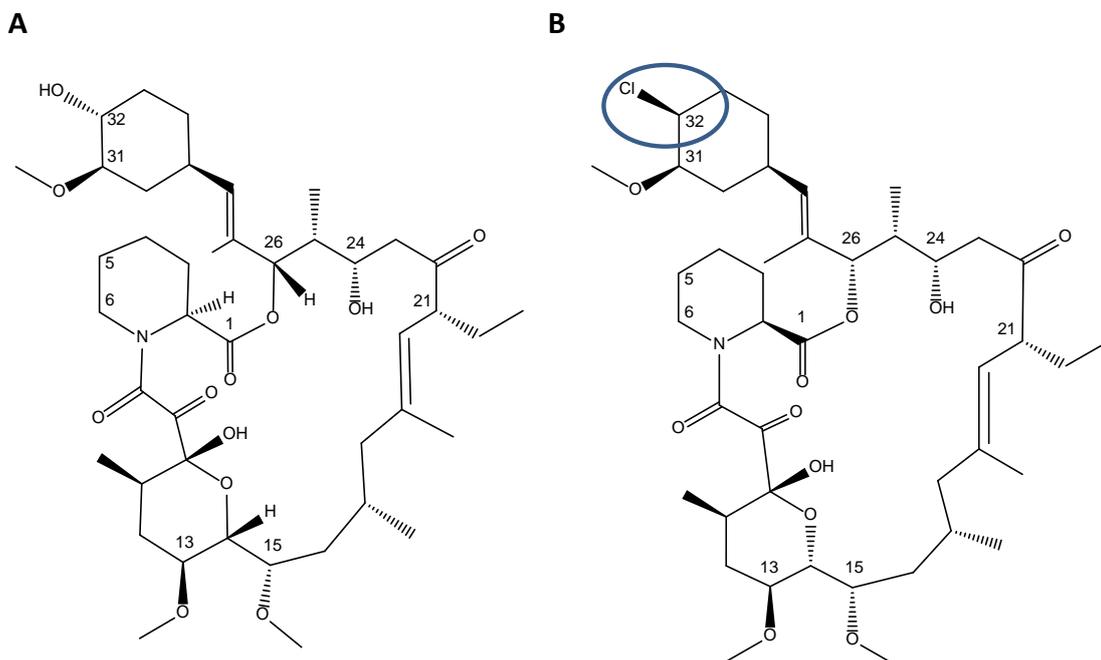


Abb. 11: Struktur von Ascomycin und Pimecrolimus.

Vergleichende Darstellung der chemischen Struktur von (A) Ascomycin (FK520; FR-900520) und (B) Pimecrolimus. Der strukturelle Unterschied zum Ascomycin in Position 32 (Chlor statt Hydroxyl-Gruppe) ist markiert.

In zahlreichen Tiermodellen der allergischen Kontaktdermatitis konnte für Pimecrolimus eine anti-inflammatorische Aktivität nachgewiesen werden [245]. Diese war äquipotent im Vergleich mit Clobetasol-17-propionat, dem stärksten topisch wirksamen

Glucocorticoid. Im Gegensatz zu diesem häufig verordneten Cortisol-Derivat verursacht Pimecrolimus jedoch keine Atrophie der Haut und beeinflusst auch nicht die Funktion der Langerhans-Zellen der Epidermis bzw. dendritischen Zellen der Dermis [246]. Verglichen mit Tacrolimus zeigt es nach topischer Anwendung weniger systemische Effekte, vermutlich durch Anreicherung in den oberen Hautschichten in Verbindung mit einer verminderten transkutanen Resorption [247]. Somit rückt die anti-inflammatorische Wirkung - speziell bei atopischer Dermatitis - deutlich in den Vordergrund [248, 249]. Auch eine längerfristige Behandlung (bis zu 24 Monaten) dieser Erkrankung mit Pimecrolimus ist möglich und nicht durch abnehmende Wirksamkeit oder das Auftreten zusätzlicher UAWs limitiert [250]. Ein weiterer Aspekt ist die Hemmung der Degranulation von aktivierten Mastzellen durch den Arzneistoff [251]. Mehrere klinische Studien konnten zusätzlich den therapeutischen Wert von Pimecrolimus in der Behandlung der Psoriasis belegen [245, 252].

In Deutschland ist Pimecrolimus für nachfolgende Indikationen zugelassen [253]:

- Behandlung von Patienten ab 2 Jahren mit leichtem oder mittelschwerem atopischem Ekzem, wenn eine Behandlung mit topischen Kortikosteroiden entweder nicht angebracht oder nicht möglich ist, wie z. B. bei:
 - Unverträglichkeit gegenüber topischen Kortikosteroiden
 - mangelnder Wirksamkeit von topischen Kortikosteroiden
 - Anwendung im Gesicht und Halsbereich, wo eine intermittierende Langzeitbehandlung mit topischen Kortikosteroiden nicht empfehlenswert ist

Das Präparat Elidel® soll zwei Mal täglich auf die betroffenen Hautareale aufgetragen werden, wobei eine Okklusion zu vermeiden ist. Obwohl Pimecrolimus ausschließlich über CYP3A4 metabolisiert wird, sind Wechselwirkungen mit anderen Pharmaka aufgrund der minimalen Wirkstoffspiegel im Blut unwahrscheinlich. Als UAWs traten am Ehesten lokale Reaktionen, wie z.B. Hautinfektionen (Folikulitis) und ein Brennen an der Applikationsstelle auf. Allerdings wurden nach der Markteinführung auch Fälle von Malignität (kutane und andere Lymphome bzw. Hautkrebs) und Lymphadenopathie bekannt [253]. Die BV betrug nach dermalen Einmal-Applikation nur 0,03 % (22 h, Semiokklusion, Zwergschwein).

Aufgrund der Hautselektivität sind die Blutspiegel von Pimecrolimus nach topischer Anwendung sehr niedrig, so dass zur Metabolisierung *in vivo* keine validen Daten für größere Patientenkollektive verfügbar sind. Der Arzneistoff weist mit 99,6 % eine sehr hohe Plasma-Protein-Bindung auf, wobei er vornehmlich an Lipoproteine adsorbiert vorliegt. Die Elimination von radioaktiv-markiertem Pimecrolimus erfolgt zu 78,4 % über den Fäzes und nur zu 2,5 % über den Urin (bei 80,9 % Gesamtwiederfindungsrate), wobei unverändertes Pimecrolimus zu weniger als 1 % im Fäzes und im Urin gar nicht nachgewiesen werden konnte. Nach oraler Gabe einer Einmaldosis wurden hauptsächlich mäßig polare Metabolite, wie z.B. O-Demethylierungs- und Oxidationsprodukte im Blut gefunden [253].

2 ausgewählte Publikationen

2.1 Publikation 1

DOI: [10.1515/bmc.2011.011](https://doi.org/10.1515/bmc.2011.011)

2.2 Publikation 2

DOI: [10.1074/jbc.M109.024844](https://doi.org/10.1074/jbc.M109.024844)

2.3 Publikation 3

DOI: [10.1074/jbc.M409178200](https://doi.org/10.1074/jbc.M409178200)

2.4 Publikation 4

DOI: [10.1074/jbc.M304754200](https://doi.org/10.1074/jbc.M304754200)

DOI: 10.1074/jbc.M304754200

DOI: [10.1074/jbc.M304754200](https://doi.org/10.1074/jbc.M304754200)

2.5 Publikation 5

DOI: [10.1016/j.bmcl.2016.10.050](https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2016.10.050)

2.6 Publikation 6

DOI: [10.1002/anie.200904529](https://doi.org/10.1002/anie.200904529)

2.7 Publikation 7

DOI: [10.1128/AAC.00660-09](https://doi.org/10.1128/AAC.00660-09)

DOI: 10.1128/AAC.00660-09

2.8 Publikation 8

DOI: [10.1016/j.bcp.2016.11.011](https://doi.org/10.1016/j.bcp.2016.11.011)

DOI: 10.1016/j.bcp.2016.11.011

DOI: [10.1016/j.bcp.2016.11.011](https://doi.org/10.1016/j.bcp.2016.11.011)

DOI: [10.1016/j.bcp.2016.11.011](https://doi.org/10.1016/j.bcp.2016.11.011)

DOI: [10.1016/j.bcp.2016.11.011](https://doi.org/10.1016/j.bcp.2016.11.011)

DOI: [10.1016/j.bcp.2016.11.011](https://doi.org/10.1016/j.bcp.2016.11.011)

DOI: [10.1016/j.bcp.2016.11.011](https://doi.org/10.1016/j.bcp.2016.11.011)

2.9 Publikation 9

DOI: [10.1038/nchembio.214](https://doi.org/10.1038/nchembio.214)

2.10 Publikation 10

DOI: [10.1016/j.bcp.2016.11.011](https://doi.org/10.1016/j.bcp.2016.11.011)

3 Zusammenfassung

Die vorstehend aufgeführten Publikationen spiegeln in Auszügen meinen wissenschaftlichen Beitrag auf dem Gebiet der Calcineurin-(Inhibitor)-Forschung wider, wobei einige interessante Veröffentlichungen aus Platzgründen hier unerwähnt blieben. So konnten wir z.B. zeigen, dass der Prolin-reiche *N*-terminale Bereich im Calcineurin A β maßgeblich zur Bindung der Phosphoprotein-Substrate beiträgt [39]. In einer anderen Arbeit wurden von uns die Ergebnisse einer umfangreichen komparativen Calcineurin-Inhibitionsstudie mit FK506 im Komplex mit verschiedenen humanen FKBP-Isoformen vorgestellt [254].

In einem initialen Übersichtsartikel wurde ein umfassender Überblick über alle zum damaligen Zeitpunkt publizierten Calcineurin-Inhibitoren gegeben (Publikation 1; [175]). Dabei fanden niedermolekulare Verbindungen ebenso Eingang wie peptidische Strukturen und Proteine. Neben den chemischen Strukturen und IUPAC-konformen Bezeichnungen der Verbindungen sind ergänzend die Inhibitionsdaten - je nach Verfügbarkeit - als K_i -, K_D - oder IC_{50} -Werte aufgelistet.

Mit Hilfe eines Phosphatase-Assays im Hochdurchsatz-Verfahren (HTPS) wurden umfangreiche Substanzbanken, die Naturstoffe und synthetische Verbindungen enthielten, auf das Vorhandensein putativer Calcineurin-Inhibitoren getestet (Publikation 2; [255]). Unter anderem wurden dabei mehrere hetrozyklische Synthetika als Hemmstoffe identifiziert. Dabei stellten sich 2,6-Diaryl-substituierte Pyrimidin-Derivate als besonders potent heraus. Die Verbindung CN585 wurde für eine weiterführende enzymkinetische und zellbiologische Charakterisierung ausgewählt. Es zeigte sich, dass CN585 nur eine geringe Zytotoxizität aufwies und weder PPlasen, noch eine der anderen getesteten Proteinphosphatasen inhibieren konnte. Die immunsuppressiven Eigenschaften der Verbindung konnten in NFAT-Translokations-, Zytokin-Produktions- und Proliferationsassays überzeugend nachgewiesen werden. CN585 ist schon seit mehreren Jahren bei der Firma Merck-Millipore kommerziell erhältlich und steht damit der wissenschaftlichen Gemeinschaft für Forschungszwecke zur Verfügung. Daraus resultierten in den letzten Jahren unter anderem 2 US-Patente und zahlreiche Publikationen in hochrangigen Zeitschriften, wie z.B. Nature, Leukemia und

Human Molecular Genetics. Sicher werden diesen Veröffentlichungen noch weitere folgen. Um weitere wissenschaftliche Fragestellungen zu klären, könnte CN585 in Zukunft durchaus auch in Tiermodellen eingesetzt werden. Seine geringe Zytotoxizität sollte dies auf jeden Falle begünstigen.

Die anfängliche Euphorie, mit der die Markteinführung von CsA als immunsuppressives Medikament begrüßt wurde, ist mittlerweile abgeebbt. Gründe dafür sind zum Einen die große Anzahl schwerwiegender UAWs, als auch die Verfügbarkeit neuer Immunsuppressiva, wie z.B. Mycophenolat-Mofetil mit einem günstigeren Nutzen/Risiko-Verhältnis. Das Hauptproblem stellt jedoch die hohe CsA-assoziierte Nephrotoxizität dar, die gerade in der Langzeit-Medikation einen großen Stellenwert einnimmt [256-259]. Diese kann sich durch eine eventuell erforderliche Komedikation noch weiter erhöhen [260-263]. Allerdings sind die molekularen Mechanismen der Nephrotoxizität noch weitestgehend unbekannt. Es gibt aber mittlerweile einige Hypothesen und Erklärungsversuche. So wird in renalen Epithelzellen die PKC-Aktivität durch CsA in einer konzentrationsabhängigen Weise inhibiert, was von WALKER et al. als mögliche Ursache der Nierenschädigung angesehen wird [264]. Die Arbeitsgruppe um KUMANO et al. hingegen macht reaktive Sauerstoffspezies (ROS) dafür verantwortlich [265]. Eine neuere Arbeit von DJAMADI et al. stellt zur letzteren Hypothese eine Verbindung her: die mRNA und das phagozytären NADPH-Oxidase 2 (Nox2)-Protein selbst werden nach CsA-Applikation verstärkt und TGF β -abhängig gebildet, wie *in vitro* und *in vivo* (Tiermodell und klinische Studie) nachgewiesen wurde [266, 267]. Von einigen Arzneistoffen, wie z.B. Verapamil, Dihydropyridinen, Enalaprilat oder Phosphodiesterase 5 (PDE5)-Inhibitoren ist bekannt, dass sie im Tiermodell nephroprotektive Eigenschaften besitzen [268-271].

Möglicherweise ist es aber nicht die CsA-induzierte Calcineurin-Hemmung, sondern die simultane Inhibition der ubiquitär vorkommenden Cyclophiline, die zu einer irreversiblen Schädigung der Nieren führt. Aus diesem Grund haben wir in einem ersten Schritt versucht, ein CsA-Molekül zu entwickeln, dessen Aktivität sich modulieren lässt (Publikation 3, [272]). Mit mehreren an Position 8 modifizierten CsA-Derivaten konnten wir demonstrieren, dass über die Einführung verschiedener Substituenten in dieser Zwischenkontaktregion sowohl die Inhibition von Calcineurin, als auch Cyp18 effektiv beeinflusst werden kann. Zusätzlich konnten wir ein photodeaktivierbares

caged compound (Cs11) synthetisieren und durch Lichteinwirkung *in situ* dessen immunsuppressive Wirkung irreversibel abschalten, wie wir eindrucksvoll in einem Zellproliferationstest und IL-2- bzw. IFN γ -Produktionsassay mit peripheren mononucleären Zellen des Blutes (PBMC) belegen konnten.

In einem zweiten Schritt haben wir versucht, ein CsA-Derivat zu entwickeln, welches die Proteinphosphatase-Aktivität des Calcineurins direkt, also ohne vorherige Komplexbildung mit einem Cyclophilin, hemmen kann. Die in Position 3 veränderte Verbindung [DAT-Sar³]-CsA erfüllte diese Forderung (Publikation 4; [273]). Dies war allerdings ein relativ überraschender Befund, da bis zu diesem Zeitpunkt im Allgemeinen davon ausgegangen wurde, dass für die Inhibition immer ein Cyclophilin zugegen sein muss. Auch dieses Derivat wurde detailliert untersucht. Leider war [DAT-Sar³]-CsA immer noch in der Lage, humanes Cyp18 im unteren nanomolaren Bereich zu hemmen, obwohl der dabei gebildete Komplex Calcineurin nicht mehr inhibiert. Deshalb konnte mit dieser Verbindung nur *in vitro* eine Calcineurin-Inhibition erzielt werden, welche sich aus den vorstehenden Gründen *in vivo* allerdings nicht realisieren ließ. [DAT-Sar³]-CsA ist aber ein erfolversprechender Ausgangspunkt für die Entwicklung neuer CsA-basierender monofunktionaler Calcineurin-Inhibitoren mit hoher Spezifität und eventuell auch weniger UAWs.

Eine weitere Herausforderung war die Herstellung thioxylierter CsA-Derivate und deren Verwendung als molekulare Sonden für die Untersuchung von Protein/Ligand-Interaktionen (Publikation 5; [274]). Humanes Cyp18 hat im aktiven Zentrum in Position 121 einen Tryptophan-Rest, dessen Fluoreszenz-Intensität sich mit der Bindung von CsA erhöht, während gleichzeitig ein konzentrationsabhängiger *Blue-shift* gemessen werden kann. Das Maximum der UV-Absorption des Tryptophans liegt um die 280 nm und das der thioxylierten Amidbindung bei ungefähr 275 nm, wodurch dessen Bindung am Protein einen Quenching-Effekt hervorruft. Dieser kann ausgenutzt werden, um fluoreszenzspektroskopisch zu verfolgen, wie Cyp18-gebundenes CsA durch ein in Position 7 thioxyliertes CsA-Derivat (Cs7) kompetitiv aus dem Komplex verdrängt wird. Mit Hilfe dieser Daten war es anschließend möglich, die k_{off} -Werte verschieden gebildeter Cyp18/CsA-Komplexe experimentell zu bestimmen.

CsA ist - wie bereits erwähnt - ein sehr lipophiles Molekül und kann deshalb auch gut Lipidschichten durchdringen und sich intrazellulär anreichern, zumal viele Cyclophiline als CsA-Bindungspartner dort lokalisiert sind. Ein Ziel eines ambitionierten Projektes war es, CsA-Derivate zu entwickeln, deren Lipophilie durch die Einführung hydrophiler Reste so weit gesenkt wird, dass die Permeation der Zellmembran verhindert wird (Publikation 6; [275]). Ausgangspunkt war auch hier [D-Ser⁸]-CsA, in das eine hydrophile Hexa-D-Glutamyl-Kette und zur visuellen Detektion des Derivats zusätzlich noch eine Tetramethylrhodamin-Gruppe eingeführt wurde. Die Verbindung **3** inhibiert Calcineurin *in vitro* zwar um den Faktor 30 schlechter als CsA, verlor durch die Modifizierung allerdings *in vivo* gänzlich seine Calcineurin-vermittelten immunsuppressiven Eigenschaften. Extrazelluläre Cyclophiline konnten von ihm jedoch immer noch potent und exklusiv inhibiert werden, was zuvor als Hauptziel definiert wurde. Diese Enzyme spielen unter anderem bei der Neuroprotektion, Epithel-Differenzierung und Leukozyten-Migration durch Interaktion mit dem Zelloberflächen-Rezeptor CD147 eine wichtige Rolle [276-278]. In einem durchgeführten Leukozyten-Migrationsassay mit murinen CD4⁺ T-Lymphozyten konnte die Verbindung die Cyp18-abhängige Chemotaxis der Zellen fast auf Basalniveau reduzieren. In künftigen Studien könnte mit solchen Derivaten die Bedeutung der extrazellulären Cyclophiline - z.B. bei Entzündungsreaktionen - besser erforscht und eventuell die Basis für neue Medikamente geschaffen werden.

In Kooperation mit der Firma SCYNEXIS Inc. konnten wir mit SCY-635 einen nicht mehr immunsuppressiven Cyclosporin-Abkömmling entwickeln, der die Hepatitis C-Virus (HCV)-Replikation hemmt (Publikation 7; [279]). Klinische Befunde zeigten bereits, dass der Cyp-Inhibitor CsA die RNA-Replikation und Proteinproduktion des HCV wirksam senken kann [280]. Dieser Effekt ließ sich jedoch mit nicht-immunsuppressiven Derivaten, wie z.B. Alisporivir (Debio 025) und SDZ NIM811 (Abb. 12) ebenso reproduzieren, so dass die Inhibition von Calcineurin als Wirkprinzip ausgeschlossen werden kann. Seit wenigen Jahren ist bekannt, dass die viralen nicht-strukturierten Proteine 5A und B (NS5A und NS5B) mit dem Cyp18 der Wirtszelle Komplexe bilden, die essentiell für die Replikation des HCV sind. Wie die Arbeit von CHATTERJI et al. nahelegt, scheint dabei die PPlase-Aktivität des Cyclophilins eine entscheidende Rolle zu spielen [281]. Auf dieser Erkenntnis aufbauend wurde von SCYNEXIS zahlreiche in Position 3 und 4 modifizierte Verbindungen

synthetisiert und SCY-635 aus diesem Substanz-Pool ausgewählt. Die Verbindung inhibiert Cyp18 etwas potenter als CsA und zeigt im Komplex mit dieser PPlase bis 2 μM keinen Hemmeffekt auf Calcineurin. Eine geringe immunsuppressive Wirkung wurde nur bei sehr hohen Konzentrationen beobachtet. Darüber hinaus zeichnet sich SCY0635 durch eine vorteilhafte Pharmakokinetik aus. Der oral gut verfügbare Wirkstoff induziert weder die Bildung von CYP1A2, noch CYP2B6 oder CYP3A4 und ist nur ein schwacher Inhibitor bzw. Substrat für das P-gp.

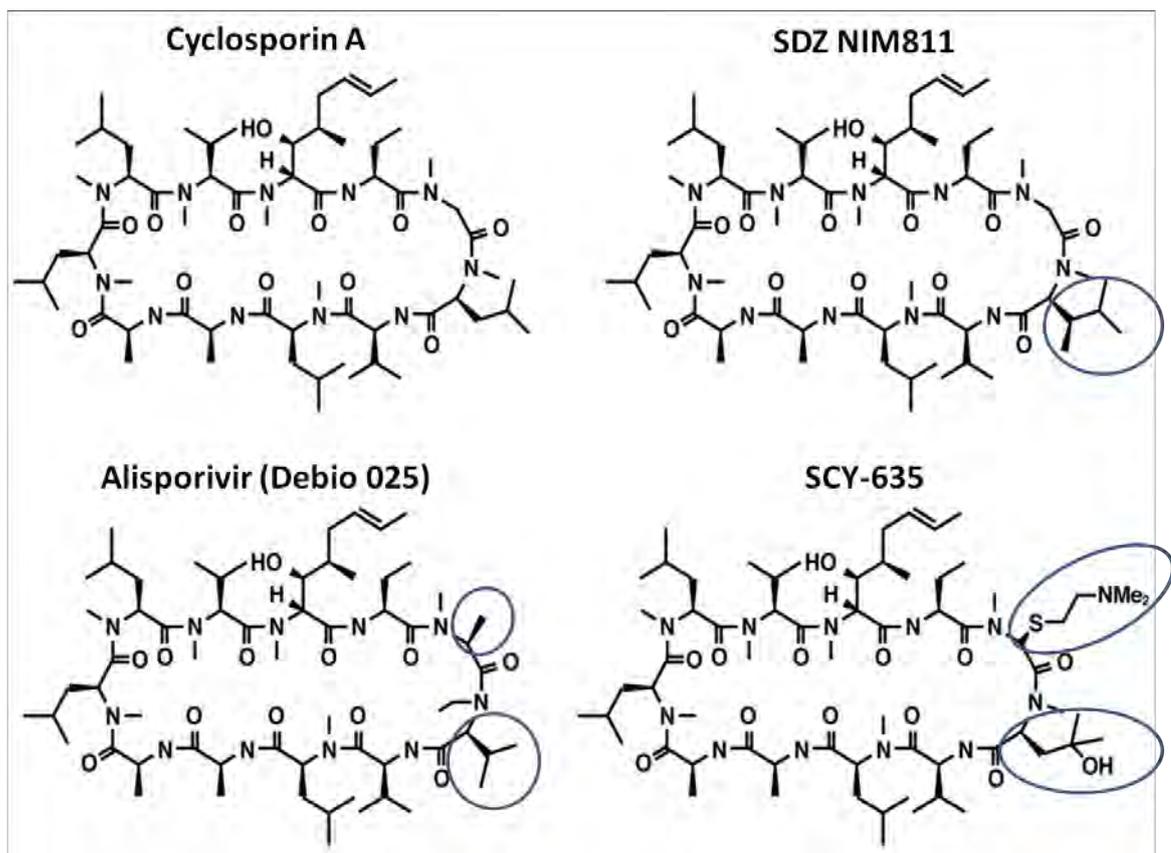


Abb. 12: Struktur ausgewählter nicht-immunsuppressiver CsA-Derivate.

Dargestellt sind die Strukturen von SDZ NIM811 (Modifikation in Position 4), Alisporivir (Modifikation in Position 3 und 4) und SCY-635 (Modifikation in Position 3 und 4) im Vergleich mit CsA.

In einer *in vitro*-Kombinationsstudie mit α -Interferon 2b zeigte die Verbindung synergistische und mit dem Nukleosid-Analogen Ribavirin additive Effekte in einem Luciferase-gekoppelten *subgenomic replicon assay* mit 72 h Inkubationsdauer. Mittlerweile wird in der Cyp18-Inhibition auch ein wirksames Prinzip für die Behandlung von Hepatitis B-Virus (HBV)- und HIV1-Infektion bzw. Koinfektionen gesehen. So wurde der neue Cyp-Inhibitor CPI-431-32 speziell für die Behandlung von HCV/HIV1-

Koinfektionen entwickelt [282]. Auch die kürzlich publizierte Verbindung STG-175 zeigt bei allen HCV-Genotypen (1a-4a) eine exzellente antivirale Aktivität im unteren nanomolaren Bereich, wie auch in Kombinationsstudien bei HCV, HBV und HIV1 im einfachen, zweifachen oder dreifachen Infektionsmodell und basiert letztendlich ebenfalls auf einer potenten Cyp18-Inhibition [283].

In einem zweiten Review werden Möglichkeiten und Anwendungen der Photo-Schaltung beschrieben, mit deren Hilfe sowohl die Struktur, als auch die Funktion von Proteinen reversibel beeinflusst werden kann (Publikation 8; [284]). Dabei bietet die Nutzung der Photo-Schaltung mehrere Vorteile gegenüber anderen Verfahren. Zum Einen können selektiv Zellen oder subzelluläre Strukturen adressiert werden und zum Anderen kann durch Variation der Intensität ein gradueller Effekt hervorgerufen werden. Ein weiterer Vorteil kann bestehen, wenn Nah-IR- Strahlung (Bereich 700-800 nm) verwendet wird, da viele Gewebe für diesen Wellenlängenbereich nahezu transparent erscheinen und mit dieser 2-Photonen-Anregungstechnik sogar Tiefenwirkungen erzielt werden können. Exemplarisch werden in der Arbeit die strahlungsabhängige Aktivierung/Deaktivierung von bakteriellen Rhodopsinen in murinen Neuronen und die licht-induzierte Öffnung von ionotropen Glutamat-Rezeptoren vorgestellt.

Die Etablierung eines photo-schaltbaren CsA/Cyp-Systems wurde in einer eigenen Arbeit verwirklicht (Publikation 9; [285]). Dafür wurden drei [Ser⁸]-CsA-Derivate synthetisiert, bei denen über Position 8 ein Azobenzol als photo-sensitives Element in das Molekül eingeführt wurde. Derivat **2** enthielt zusätzlich einen Biotin-Rest, welcher mit hoher Affinität Avidin bzw. Streptavidin binden kann. Das Azobenzol-Element kann durch Einwirkung von IR-Strahlung (740 nm, 2-Photonen-Anregung) oder durch UV-Strahlung (370 nm, 1-Photon-Anregung) von der *trans* in die *cis*-Konformation überführt werden. Dadurch ändert sich folglich auch die räumliche Ausrichtung des CsA-Teils zu dem des Biotins. Allerdings wird die inhibitorische Aktivität des Moleküls primär durch die Photo-Schaltung nur marginal verändert und zeigt in *cis*-Konformation eine etwas stärkere Inhibition. Der Effekt der Photo-Schaltung kann jedoch sekundär durch Bindung eines hochmolekularen Liganden - wie z.B. Streptavidin über die Biotin-Gruppe im Sinne einer *Protein borrowing strategy* - dramatisch erhöht werden. Diese Beobachtung konnte sowohl im PPIase-Assay, als auch bei Messungen der Calcineurin-spezifischen

Proteinphosphatase-Aktivität gemacht werden. Darüber hinaus konnte die *trans*→*cis*-Photo-Isomerisierung auch *in situ* realisiert und damit die NFAT-abhängige Reporterogenaktivität und Proliferation in zwei T-Lymphozyten-Modellen beeinflusst werden. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass nur durch die Licht-induzierte Veränderung der Konformation einer Bindung die Aktivität des 140 kDa großen Calcineurin/2/Cyp18/Streptavidin-Komplexes *in vitro* und *in vivo* moduliert werden kann. Dabei ist die Photo-Isomerisierung ein reversibler Prozess und das gebildete *cis*-Isomer wandelt sich durch thermische Isomerisierung spontan oder durch Einstrahlung von Licht einer anderen Wellenlänge wieder in das entsprechende *trans*-Isomer um. Obwohl die Biotin/Streptavidin-Interaktion ein gut funktionierendes Modellsystem ist, könnte durch Wahl eines physiologischen Interaktionspaares (Ligand/abundantes intrazelluläres Protein) auch eine therapeutische Anwendung möglich werden. Als Indikationen sind z.B. psoriatische Hautveränderung oder auch eine Uveitis denkbar. Dabei kann die Wirkung über das Vorkommen des jeweiligen Proteins sogar auf bestimmte Zelltypen beschränkt werden.

Aufbauend auf den vorherigen Untersuchungen haben wir das Konzept der Photo-Schaltung in Bezug auf das *Protein borrowing* erweitert (Publikation 10; [286]). Dafür wurde folgende Vorüberlegung angestellt: wenn die Bindung eines 17 kDa großen Liganden (Streptavidin) den Effekt der Photo-Isomerisierung erhöht, dann könnte die Interaktion des CsA-Derivats mit einem noch größeren Makromolekül oder einer Oberfläche zu einer weiteren Verstärkung führen. Deshalb wurde das *Protein borrowing* experimentell zu einem *Surface borrowing* weiterentwickelt, bei dem das Derivat auf Matrixpartikeln immobilisiert vorlag. Die Hypothese wurde in Ko-Präzipitationsexperimenten und enzymkinetischen Messungen überprüft und es zeigte sich, dass die funktionellen Unterschiede beider Photo-Isomere durch eine Erhöhung der sterischen Hinderung im Gesamtkomplex noch weiter gesteigert werden. Darüber hinaus konnten wir nachweisen, dass die Photo-Isomerisierung des verwendeten Azobenzens-Systems nicht nur durch UV- bzw. IR-Strahlung zu erzielen ist, sondern auch durch kurzzeitige Einstrahlung von Licht im sichtbaren Bereich. Mit Hilfe komplexer *Molecular modeling* bzw. *docking*-Techniken konnte erstmals sowohl für das *trans*- als auch das *cis*-Isomer ein Strukturmodell des Calcineurin/2/Cyp18/Streptavidin-Komplexes erstellt

werden. Daraus konnte abgeleitet werden, dass die Licht-induzierte Konformationsänderung in der Seitenkette drastische Auswirkungen auf das Gesamtmolekül hat und der CsA-Teil des Moleküls eine unvorteilhafte Konformation einnimmt, welche schon die Interaktion mit Cyp18 und erst recht mit Calcineurin beeinträchtigt. Somit bietet das von uns aufgestellte Model eine gute Erklärung für die experimentellen Beobachtungen in den Publikationen 9 und 10.

4 Literaturverzeichnis

- [1] **Zarpellon A, Donella-Deana A, Folda A, Turetta L, Pavanetto M, Deana R.** Serotonin (5-HT) transport in human platelets is modulated by Src-catalysed Tyrosine phosphorylation of the plasma membrane transporter SERT. *Cellular Physiology and Biochemistry*. (2008); **21**:87-94.
- [2] **Chen Y, Craigen WJ, Riley DJ.** Nek1 regulates cell death and mitochondrial membrane permeability through phosphorylation of VDAC1. *Cell Cycle*. (2009); **8**:257-67.
- [3] **Muller MS, Pedersen SE, Walls AB, Waagepetersen HS, Bak LK.** Isoform-selective regulation of glycogen phosphorylase by energy deprivation and phosphorylation in astrocytes. *Glia*. (2015); **63**:154-62.
- [4] **Miyake M, Nomura A, Ogura A, Takehana K, Kitahara Y, Takahara K, Tsugawa K, et al.** Skeletal muscle-specific eukaryotic translation initiation factor 2alpha phosphorylation controls amino acid metabolism and fibroblast growth factor 21-mediated non-cell-autonomous energy metabolism. *FASEB Journal*. (2016); **30**:798-812.
- [5] **Duan DD, Wang G.** Double the keys, double the control: coupled phosphorylation sites provide novel molecular targets for precise control of ion channel function. Focus on "Differential regulation of a CLC anion channel by SPAK kinase ortholog-mediated multisite phosphorylation". *American Journal of Physiology: Cell Physiology*. (2012); **302**:C1699-701.
- [6] **Adragna NC, Ravilla NB, Lauf PK, Begum G, Khanna AR, Sun D, Kahle KT.** Regulated phosphorylation of the K-Cl cotransporter KCC3 is a molecular switch of intracellular potassium content and cell volume homeostasis. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. (2015); **9**:255.
- [7] **Yamada M, Ikeuchi T, Aimoto S, Hatanaka H.** EGF-induced sustained tyrosine phosphorylation and decreased rate of down-regulation of EGF receptor in PC12h-R cells which show neuronal differentiation in response to EGF. *Neurochemical Research*. (1996); **21**:815-22.
- [8] **Shin WS, Shim HJ, Lee YH, Pyo M, Park JS, Ahn SY, Lee ST.** PTK6 Localized at the Plasma Membrane Promotes Cell Proliferation and Migration through Phosphorylation of Eps8. *Journal of Cellular Biochemistry*. (2017).

-
- [9] **Paradis JS, Ly S, Blondel-Tepaz E, Galan JA, Beautrait A, Scott MG, Enslen H, et al.** Receptor sequestration in response to beta-arrestin-2 phosphorylation by ERK1/2 governs steady-state levels of GPCR cell-surface expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. (2015); **112**:E5160-8.
- [10] **Fan X, Gu X, Zhao R, Zheng Q, Li L, Yang W, Ding L, et al.** Cardiac beta2-Adrenergic Receptor Phosphorylation at Ser355/356 Regulates Receptor Internalization and Functional Resensitization. *PLoS One*. (2016); **11**:e0161373.
- [11] **Chu J, Pham NT, Olate N, Kislitsyna K, Day MC, LeTourneau PA, Kots A, et al.** Biphasic regulation of myosin light chain phosphorylation by p21-activated kinase modulates intestinal smooth muscle contractility. *Journal of Biological Chemistry*. (2013); **288**:1200-13.
- [12] **Srivastava AK, St-Louis J.** Smooth muscle contractility and protein tyrosine phosphorylation. *Molecular and Cellular Biochemistry*. (1997); **176**:47-51.
- [13] **Leung-Theung-Long S, Mondor I, Guiraud M, Lamare C, Nagaleekar V, Paulet PE, Rincon M, et al.** Impaired NFAT transcriptional activity in antigen-stimulated CD8 T cells linked to defective phosphorylation of NFAT transactivation domain. *Journal of Immunology*. (2009); **182**:6807-14.
- [14] **Zhu X, Dahlmans V, Thali R, Preisinger C, Viollet B, Voncken JW, Neumann D.** AMP-activated Protein Kinase Up-regulates Mitogen-activated Protein (MAP) Kinase-interacting Serine/Threonine Kinase 1a-dependent Phosphorylation of Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E. *Journal of Biological Chemistry*. (2016); **291**:17020-7.
- [15] **Kumar A, Singhal M, Chopra C, Srinivasan S, Surabhi RP, Kanumuri R, Tentu S, et al.** Threonine 209 phosphorylation on RUNX3 by Pak1 is a molecular switch for its dualistic functions. *Oncogene*. (2016); **35**:4857-65.
- [16] **Yoshimura A.** Stat1 phosphorylation is a molecular switch of Ras signaling and oncogenesis. *Cell Cycle*. (2009); **8**:1981-2.
- [17] **Cohen P.** The structure and regulation of protein phosphatases. *Annual Review of Biochemistry*. (1989); **58**:453-508.

-
- [18] **Ingebritsen TS, Cohen P.** Protein phosphatases: properties and role in cellular regulation. *Science*. (1983); **221**:331-8.
- [19] **Wera S, Hemmings BA.** Serine/threonine protein phosphatases. *Biochemical Journal*. (1995); **311 (Pt 1)**:17-29.
- [20] **Chinkers M.** Protein phosphatase 5 in signal transduction. *Trends in Endocrinology and Metabolism*. (2001); **12**:28-32.
- [21] **Das AK, Helps NR, Cohen PT, Barford D.** Crystal structure of the protein serine/threonine phosphatase 2C at 2.0 Å resolution. *EMBO Journal*. (1996); **15**:6798-809.
- [22] **Guddat LW, McAlpine AS, Hume D, Hamilton S, de Jersey J, Martin JL.** Crystal structure of mammalian purple acid phosphatase. *Structure*. (1999); **7**:757-67.
- [23] **Huang X, Honkanen RE.** Molecular cloning, expression, and characterization of a novel human serine/threonine protein phosphatase, PP7, that is homologous to Drosophila retinal degeneration C gene product (rdgC). *Journal of Biological Chemistry*. (1998); **273**:1462-8.
- [24] **Cohen PTW.** Chapter 85 - Phosphatase Families Dephosphorylating Serine and Threonine Residues in Proteins A2 - Bradshaw, Ralph A. In: Dennis EA, editor. *Handbook of Cell Signaling (Second Edition)*. San Diego: Academic Press; (2010). p. 659-75.
- [25] **Kobor MS, Archambault J, Lester W, Holstege FC, Gileadi O, Jansma DB, Jennings EG, et al.** An unusual eukaryotic protein phosphatase required for transcription by RNA polymerase II and CTD dephosphorylation in *S. cerevisiae*. *Molecular Cell*. (1999); **4**:55-62.
- [26] **Burroughs AM, Allen KN, Dunaway-Mariano D, Aravind L.** Evolutionary genomics of the HAD superfamily: Understanding the structural adaptations and catalytic diversity in a superfamily of phosphoesterases and allied enzymes. *Journal of Molecular Biology*. (2006); **361**:1003-34.
- [27] **Klee CB, Crouch TH, Krinks MH.** Calcineurin: a calcium- and calmodulin-binding protein of the nervous system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. (1979); **76**:6270-3.

-
- [28] **Stewart AA, Ingebritsen TS, Cohen P.** The protein phosphatases involved in cellular regulation. 5. Purification and properties of a Ca²⁺/calmodulin-dependent protein phosphatase (2B) from rabbit skeletal muscle. *European Journal of Biochemistry.* (1983); **132**:289-95.
- [29] **Klee CB, Krinks MH, Manalan AS, Cohen P, Stewart AA.** Isolation and characterization of bovine brain calcineurin: a calmodulin-stimulated protein phosphatase. *Methods in Enzymology.* (1983); **102**:227-44.
- [30] **Tonks NK, Cohen P.** Calcineurin is a calcium ion-dependent, calmodulin-stimulated protein phosphatase. *Biochimica et Biophysica Acta.* (1983); **747**:191-3.
- [31] **Dammann H, Hellstern S, Husain Q, Mutzel R.** Primary structure, expression and developmental regulation of a Dictyostelium calcineurin A homologue. *European Journal of Biochemistry.* (1996); **238**:391-9.
- [32] **Odom A, Muir S, Lim E, Toffaletti DL, Perfect J, Heitman J.** Calcineurin is required for virulence of *Cryptococcus neoformans*. *EMBO Journal.* (1997); **16**:2576-89.
- [33] **Bandyopadhyay J, Lee J, Bandyopadhyay A.** Regulation of calcineurin, a calcium/calmodulin-dependent protein phosphatase, in *C. elegans*. *Molecules and Cells.* (2004); **18**:10-6.
- [34] **Yang CG, Song HT, Weng H, Wei Q.** The primary identification of a calcineurin A subunit-like protein in plants. *Biochimie.* (2009); **91**:646-9.
- [35] **Rusnak F, Mertz P.** Calcineurin: form and function. *Physiological Reviews.* (2000); **80**:1483-521.
- [36] **Nishio H, Matsui H, Etoh S, Moia LJ, Tokuda M, Itano T, Hatase O.** Identification of testis specific calcineurin beta subunit isoform by a monoclonal antibody and detection of a specific six amino acid sequence. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* (1992); **182**:34-8.
- [37] **Omura M, Kurota H, Yamaguchi M.** Inhibitory effect of regucalcin on Ca²⁺/calmodulin-dependent phosphatase activity in rat renal cortex cytosol. *Biological and Pharmaceutical Bulletin.* (1998); **21**:440-3.
- [38] **Hanley RM, Dedman JR, Shenolikar S.** Identification of high-affinity calmodulin-binding proteins in rat liver. *American Journal of Physiology.* (1987); **252**:C277-84.

-
- [39] **Kilka S, Erdmann F, Migdoll A, Fischer G, Weiwad M.** The proline-rich N-terminal sequence of calcineurin A β determines substrate binding. *Biochemistry*. (2009); **48**:1900-10.
- [40] **Shibasaki F, Price ER, Milan D, McKeon F.** Role of kinases and the phosphatase calcineurin in the nuclear shuttling of transcription factor NF-AT4. *Nature*. (1996); **382**:370-3.
- [41] **Moriya M, Fujinaga K, Yazawa M, Katagiri C.** Immunohistochemical localization of the calcium/calmodulin-dependent protein phosphatase, calcineurin, in the mouse testis: its unique accumulation in spermatid nuclei. *Cell and Tissue Research*. (1995); **281**:273-81.
- [42] **Alexander DR, Hexham JM, Crumpton MJ.** The association of type 1, type 2A and type 2B phosphatases with the human T lymphocyte plasma membrane. *Biochemical Journal*. (1988); **256**:885-92.
- [43] **Papadopoulos V, Brown AS, Hall PF.** Calcium-calmodulin-dependent phosphorylation of cytoskeletal proteins from adrenal cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*. (1990); **74**:109-23.
- [44] **Ferreira A, Kincaid R, Kosik KS.** Calcineurin is associated with the cytoskeleton of cultured neurons and has a role in the acquisition of polarity. *Molecular Biology of the Cell*. (1993); **4**:1225-38.
- [45] **Anthony FA, Winkler MA, Edwards HH, Cheung WY.** Quantitative subcellular localization of calmodulin-dependent phosphatase in chick forebrain. *Journal of Neuroscience*. (1988); **8**:1245-53.
- [46] **Aitken A, Klee CB, Cohen P.** The structure of the B subunit of calcineurin. *European Journal of Biochemistry*. (1984); **139**:663-71.
- [47] **Kennedy MT, Brockman H, Rusnak F.** Contributions of myristoylation to calcineurin structure/function. *Journal of Biological Chemistry*. (1996); **271**:26517-21.
- [48] **Zhu D, Cardenas ME, Heitman J.** Myristoylation of calcineurin B is not required for function or interaction with immunophilin-immunosuppressant complexes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*. (1995); **270**:24831-8.

-
- [49] **Klee CB, Haiech J.** Concerted role of calmodulin and calcineurin in calcium regulation. *Annals of the New York Academy of Sciences.* (1980); **356**:43-54.
- [50] **Kakalis LT, Kennedy M, Sikkink R, Rusnak F, Armitage IM.** Characterization of the calcium-binding sites of calcineurin B. *FEBS Letters.* (1995); **362**:55-8.
- [51] **Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD.** The versatility and universality of calcium signalling. *Nature Reviews: Molecular Cell Biology.* (2000); **1**:11-21.
- [52] **Yang SD, Tallant EA, Cheung WY.** Calcineurin is a calmodulin-dependent protein phosphatase. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* (1982); **106**:1419-25.
- [53] **King MM, Huang CY.** The calmodulin-dependent activation and deactivation of the phosphoprotein phosphatase, calcineurin, and the effect of nucleotides, pyrophosphate, and divalent metal ions. Identification of calcineurin as a Zn and Fe metalloenzyme. *Journal of Biological Chemistry.* (1984); **259**:8847-56.
- [54] **Villafranca JE, Kissinger CR, Parge HE.** Protein serine/threonine phosphatases. *Current Opinion in Biotechnology.* (1996); **7**:397-402.
- [55] **Namgaladze D, Hofer HW, Ullrich V.** Redox control of calcineurin by targeting the binuclear Fe(2+)-Zn(2+) center at the enzyme active site. *Journal of Biological Chemistry.* (2002); **277**:5962-9.
- [56] **Wang X, Culotta VC, Klee CB.** Superoxide dismutase protects calcineurin from inactivation. *Nature.* (1996); **383**:434-7.
- [57] **Hashimoto Y, Soderling TR.** Regulation of calcineurin by phosphorylation. Identification of the regulatory site phosphorylated by Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II and protein kinase C. *Journal of Biological Chemistry.* (1989); **264**:16524-9.
- [58] **Cheung WY, Lynch TJ, Wallace RW, Tallant EA.** cAMP renders Ca²⁺-dependent phosphodiesterase refractory to inhibition by a calmodulin-binding protein (calcineurin). *Journal of Biological Chemistry.* (1981); **256**:4439-43.
- [59] **Tong Y, Song F.** Intracellular calcium signaling regulates autophagy via calcineurin-mediated TFEB dephosphorylation. *Autophagy.* (2015); **11**:1192-5.

-
- [60] **Castillo Bennett J, Roggero CM, Mancifesta FE, Mayorga LS.** Calcineurin-mediated dephosphorylation of synaptotagmin VI is necessary for acrosomal exocytosis. *Journal of Biological Chemistry.* (2010); **285**:26269-78.
- [61] **Molkentin JD, Lu JR, Antos CL, Markham B, Richardson J, Robbins J, Grant SR, et al.** A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy. *Cell.* (1998); **93**:215-28.
- [62] **Swoap SJ, Hunter RB, Stevenson EJ, Felton HM, Kansagra NV, Lang JM, Esser KA, et al.** The calcineurin-NFAT pathway and muscle fiber-type gene expression. *American Journal of Physiology: Cell Physiology.* (2000); **279**:C915-24.
- [63] **Al-Daraji WI, Grant KR, Ryan K, Saxton A, Reynolds NJ.** Localization of calcineurin/NFAT in human skin and psoriasis and inhibition of calcineurin/NFAT activation in human keratinocytes by cyclosporin A. *Journal of Investigative Dermatology.* (2002); **118**:779-88.
- [64] **Shaw JP, Utz PJ, Durand DB, Toole JJ, Emmel EA, Crabtree GR.** Identification of a putative regulator of early T cell activation genes. *Science.* (1988); **241**:202-5.
- [65] **Northrop JP, Ho SN, Chen L, Thomas DJ, Timmerman LA, Nolan GP, Admon A, et al.** NF-AT components define a family of transcription factors targeted in T-cell activation. *Nature.* (1994); **369**:497-502.
- [66] **Delling U, Tureckova J, Lim HW, De Windt LJ, Rotwein P, Molkentin JD.** A calcineurin-NFATc3-dependent pathway regulates skeletal muscle differentiation and slow myosin heavy-chain expression. *Molecular and Cellular Biology.* (2000); **20**:6600-11.
- [67] **Ranger AM, Oukka M, Rengarajan J, Glimcher LH.** Inhibitory function of two NFAT family members in lymphoid homeostasis and Th2 development. *Immunity.* (1998); **9**:627-35.
- [68] **Jain J, McCaffrey PG, Miner Z, Kerppola TK, Lambert JN, Verdine GL, Curran T, et al.** The T-cell transcription factor NFATp is a substrate for calcineurin and interacts with Fos and Jun. *Nature.* (1993); **365**:352-5.
- [69] **Chow CW, Dong C, Flavell RA, Davis RJ.** c-Jun NH(2)-terminal kinase inhibits targeting of the protein phosphatase calcineurin to NFATc1. *Molecular and Cellular Biology.* (2000); **20**:5227-34.

-
- [70] **Horiba M, Muto T, Ueda N, Opthof T, Miwa K, Hojo M, Lee JK, et al.** T-type Ca²⁺ channel blockers prevent cardiac cell hypertrophy through an inhibition of calcineurin-NFAT3 activation as well as L-type Ca²⁺ channel blockers. *Life Sciences*. (2008); **82**:554-60.
- [71] **Tomita M, Reinhold MI, Molkentin JD, Naski MC.** Calcineurin and NFAT4 induce chondrogenesis. *Journal of Biological Chemistry*. (2002); **277**:42214-8.
- [72] **Ullrich V, Namgaladze D, Frein D.** Superoxide as inhibitor of calcineurin and mediator of redox regulation. *Toxicology Letters*. (2003); **139**:107-10.
- [73] **Ferri A, Gabbianelli R, Casciati A, Paolucci E, Rotilio G, Carri MT.** Calcineurin activity is regulated both by redox compounds and by mutant familial amyotrophic lateral sclerosis-superoxide dismutase. *Journal of Neurochemistry*. (2000); **75**:606-13.
- [74] **Miyata H, Satouh Y, Mashiko D, Muto M, Nozawa K, Shiba K, Fujihara Y, et al.** Sperm calcineurin inhibition prevents mouse fertility with implications for male contraceptive. *Science*. (2015); **350**:442-5.
- [75] **Cottrell JR, Levenson JM, Kim SH, Gibson HE, Richardson KA, Sivula M, Li B, et al.** Working memory impairment in calcineurin knock-out mice is associated with alterations in synaptic vesicle cycling and disruption of high-frequency synaptic and network activity in prefrontal cortex. *Journal of Neuroscience*. (2013); **33**:10938-49.
- [76] **Kayyali US, Zhang W, Yee AG, Seidman JG, Potter H.** Cytoskeletal changes in the brains of mice lacking calcineurin A alpha. *Journal of Neurochemistry*. (1997); **68**:1668-78.
- [77] **Zhang BW, Zimmer G, Chen J, Ladd D, Li E, Alt FW, Wiederrecht G, et al.** T cell responses in calcineurin A alpha-deficient mice. *Journal of Experimental Medicine*. (1996); **183**:413-20.
- [78] **Bueno OF, Brandt EB, Rothenberg ME, Molkentin JD.** Defective T cell development and function in calcineurin A beta -deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. (2002); **99**:9398-403.

-
- [79] **Bueno OF, Wilkins BJ, Tymitz KM, Glascock BJ, Kimball TF, Lorenz JN, Molkentin JD.** Impaired cardiac hypertrophic response in Calcineurin Abeta -deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* (2002); **99**:4586-91.
- [80] **Zeng H, Chattarji S, Barbarosie M, Rondi-Reig L, Philpot BD, Miyakawa T, Bear MF, et al.** Forebrain-specific calcineurin knockout selectively impairs bidirectional synaptic plasticity and working/episodic-like memory. *Cell.* (2001); **107**:617-29.
- [81] **Ruff VA, Leach KL.** Direct demonstration of NFATp dephosphorylation and nuclear localization in activated HT-2 cells using a specific NFATp polyclonal antibody. *Journal of Biological Chemistry.* (1995); **270**:22602-7.
- [82] **Okamura H, Aramburu J, Garcia-Rodriguez C, Viola JP, Raghavan A, Tahliliani M, Zhang X, et al.** Concerted dephosphorylation of the transcription factor NFAT1 induces a conformational switch that regulates transcriptional activity. *Molecular Cell.* (2000); **6**:539-50.
- [83] **Rao A, Luo C, Hogan PG.** Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. *Annual Review of Immunology.* (1997); **15**:707-47.
- [84] **Luo C, Shaw KT, Raghavan A, Aramburu J, Garcia-Cozar F, Perrino BA, Hogan PG, et al.** Interaction of calcineurin with a domain of the transcription factor NFAT1 that controls nuclear import. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* (1996); **93**:8907-12.
- [85] **Luo C, Burgeon E, Carew JA, McCaffrey PG, Badalian TM, Lane WS, Hogan PG, et al.** Recombinant NFAT1 (NFATp) is regulated by calcineurin in T cells and mediates transcription of several cytokine genes. *Molecular and Cellular Biology.* (1996); **16**:3955-66.
- [86] **Csonga R, Prieschl EE, Jaksche D, Novotny V, Baumruker T.** Common and distinct signaling pathways mediate the induction of TNF-alpha and IL-5 in IgE plus antigen-stimulated mast cells. *Journal of Immunology.* (1998); **160**:273-83.
- [87] **Campbell PM, Pimm J, Ramassar V, Halloran PF.** Identification of a calcium-inducible, cyclosporine sensitive element in the IFN-gamma promoter that is a potential NFAT binding site. *Transplantation.* (1996); **61**:933-9.

-
- [88] **Shannon MF, Himes SR, Coles LS.** GM-CSF and IL-2 share common control mechanisms in response to costimulatory signals in T cells. *Journal of Leukocyte Biology.* (1995); **57**:767-73.
- [89] **Decker EL, Skerka C, Zipfel PF.** The early growth response protein (EGR-1) regulates interleukin-2 transcription by synergistic interaction with the nuclear factor of activated T cells. *Journal of Biological Chemistry.* (1998); **273**:26923-30.
- [90] **Zhu J, McKeon F.** NF-AT activation requires suppression of Crm1-dependent export by calcineurin. *Nature.* (1999); **398**:256-60.
- [91] **Chow CW, Rincon M, Cavanagh J, Dickens M, Davis RJ.** Nuclear accumulation of NFAT4 opposed by the JNK signal transduction pathway. *Science.* (1997); **278**:1638-41.
- [92] **Zhu J, Shibasaki F, Price R, Guillemot JC, Yano T, Dotsch V, Wagner G, et al.** Intramolecular masking of nuclear import signal on NF-AT4 by casein kinase I and MEKK1. *Cell.* (1998); **93**:851-61.
- [93] **Crabtree GR, Olson EN.** NFAT signaling: choreographing the social lives of cells. *Cell.* (2002); **109 Suppl**:S67-79.
- [94] **Scott JE, Ruff VA, Leach KL.** Dynamic equilibrium between calcineurin and kinase activities regulates the phosphorylation state and localization of the nuclear factor of activated T-cells. *Biochemical Journal.* (1997); **324 (Pt 2)**:597-603.
- [95] **Sugiura R, Sio SO, Shuntoh H, Kuno T.** Molecular genetic analysis of the calcineurin signaling pathways. *Cellular and Molecular Life Sciences.* (2001); **58**:278-88.
- [96] **Clipstone NA, Crabtree GR.** Calcineurin is a key signaling enzyme in T lymphocyte activation and the target of the immunosuppressive drugs cyclosporin A and FK506. *Annals of the New York Academy of Sciences.* (1993); **696**:20-30.
- [97] **Su Q, Zhao M, Weber E, Eugster HP, Ryffel B.** Distribution and activity of calcineurin in rat tissues. Evidence for post-transcriptional regulation of testis-specific calcineurin B. *European Journal of Biochemistry.* (1995); **230**:469-74.
- [98] **Berridge MJ.** Neuronal calcium signaling. *Neuron.* (1998); **21**:13-26.

-
- [99] **Bito H.** The role of calcium in activity-dependent neuronal gene regulation. *Cell Calcium*. (1998); **23**:143-50.
- [100] **Greengard P, Allen PB, Nairn AC.** Beyond the dopamine receptor: the DARPP-32/protein phosphatase-1 cascade. *Neuron*. (1999); **23**:435-47.
- [101] **Antoni FA, Palkovits M, Simpson J, Smith SM, Leitch AL, Rosie R, Fink G, et al.** Ca²⁺/calcineurin-inhibited adenylyl cyclase, highly abundant in forebrain regions, is important for learning and memory. *Journal of Neuroscience*. (1998); **18**:9650-61.
- [102] **King MM, Huang CY, Chock PB, Nairn AC, Hemmings HC, Jr., Chan KF, Greengard P.** Mammalian brain phosphoproteins as substrates for calcineurin. *Journal of Biological Chemistry*. (1984); **259**:8080-3.
- [103] **Wu XS, Zhang Z, Zhao WD, Wang D, Luo F, Wu LG.** Calcineurin is universally involved in vesicle endocytosis at neuronal and nonneuronal secretory cells. *Cell Rep*. (2014); **7**:982-8.
- [104] **Dittmer PJ, Dell'Acqua ML, Sather WA.** Ca²⁺/calcineurin-dependent inactivation of neuronal L-type Ca²⁺ channels requires priming by AKAP-anchored protein kinase A. *Cell Rep*. (2014); **7**:1410-6.
- [105] **Havekes R, Nijholt IM, Visser AK, Eisel UL, Van der Zee EA.** Transgenic inhibition of neuronal calcineurin activity in the forebrain facilitates fear conditioning, but inhibits the extinction of contextual fear memories. *Neurobiology of Learning and Memory*. (2008); **89**:595-8.
- [106] **Groth RD, Dunbar RL, Mermelstein PG.** Calcineurin regulation of neuronal plasticity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. (2003); **311**:1159-71.
- [107] **Antoni FA, Smith SM, Simpson J, Rosie R, Fink G, Paterson JM.** Calcium control of adenylyl cyclase: the calcineurin connection. *Advances in Second Messenger and Phosphoprotein Research*. (1998); **32**:153-72.
- [108] **Dawson VL, Dawson TM, Bartley DA, Uhl GR, Snyder SH.** Mechanisms of nitric oxide-mediated neurotoxicity in primary brain cultures. *Journal of Neuroscience*. (1993); **13**:2651-61.

-
- [109] **Snyder SH, Sabatini DM.** Immunophilins and the nervous system. *Nature Medicine.* (1995); **1**:32-7.
- [110] **Baukal AJ, Hunyady L, Catt KJ, Balla T.** Evidence for participation of calcineurin in potentiation of agonist-stimulated cyclic AMP formation by the calcium-mobilizing hormone, angiotensin II. *Journal of Biological Chemistry.* (1994); **269**:24546-9.
- [111] **Suzuki K, Sato M, Morishima Y, Nakanishi S.** Neuronal depolarization controls brain-derived neurotrophic factor-induced upregulation of NR2C NMDA receptor via calcineurin signaling. *Journal of Neuroscience.* (2005); **25**:9535-43.
- [112] **Hoffman A, Taleski G, Sontag E.** The protein serine/threonine phosphatases PP2A, PP1 and calcineurin: A triple threat in the regulation of the neuronal cytoskeleton. *Molecular and Cellular Neurosciences.* (2017).
- [113] **Terada H, Matsushita M, Lu YF, Shirai T, Li ST, Tomizawa K, Moriwaki A, et al.** Inhibition of excitatory neuronal cell death by cell-permeable calcineurin autoinhibitory peptide. *Journal of Neurochemistry.* (2003); **87**:1145-51.
- [114] **Hannon E, Chand AN, Evans MD, Wong CC, Grubb MS, Mill J.** A role for CaV1 and calcineurin signaling in depolarization-induced changes in neuronal DNA methylation. *Neuroepigenetics.* (2015); **3**:1-6.
- [115] **Georgiou GK, Dounousi E, Harissis HV.** Calcineurin inhibitors and male fertility after renal transplantation - a review. *Andrologia.* (2016); **48**:483-90.
- [116] **Kirby JA, Parfett GJ, Reader JA, Pepper JR.** Lung transplantation in the rat: a model for study of the cellular mechanisms of allograft rejection. *Immunology.* (1988); **63**:369-72.
- [117] **Truffa-Bachi P.** Cyclosporin A: a tool for dissecting the mechanisms of the immune response. *Annales de l'Institut Pasteur: Immunologie.* (1987); **138**:644-8.
- [118] **Roilides E, Robinson T, Sein T, Pizzo PA, Walsh TJ.** In vitro and ex vivo effects of cyclosporin A on phagocytic host defenses against *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* (1994); **38**:2883-8.

-
- [119] **Locatelli F, Bruno B, Zecca M, Van-Lint MT, McCann S, Arcese W, Dallorso S, et al.** Cyclosporin A and short-term methotrexate versus cyclosporin A as graft versus host disease prophylaxis in patients with severe aplastic anemia given allogeneic bone marrow transplantation from an HLA-identical sibling: results of a GITMO/EBMT randomized trial. *Blood*. (2000); **96**:1690-7.
- [120] **Nakamura S, Kaneko S, Shinde A, Morita J, Fujita K, Nakano S, Kusaka H.** Prednisolone-sparing effect of cyclosporin A therapy for very elderly patients with myasthenia gravis. *Neuromuscular Disorders*. (2013); **23**:176-9.
- [121] **Fagioli S, Bruni F, Bravi M, Candusso M, Gaffuri G, Colledan M, Torre G.** Cyclosporin in steroid-resistant autoimmune hepatitis and HCV-related liver diseases. *Digestive and Liver Disease*. (2007); **39 Suppl 3**:S379-85.
- [122] **Oh EH, Koh WS, Shin JM, Kim JE, Ko JY, Ro YS.** Clinical experience of cyclosporin treatment in patients with psoriasis and psoriatic arthritis. *Journal of Dermatology*. (2017).
- [123] **Saxne T, Wollheim FA.** Cyclosporin A in rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*. (2003); **62**:1121-2; author reply 2-3.
- [124] **Griffiths B, Emery P.** The treatment of lupus with cyclosporin A. *Lupus*. (2001); **10**:165-70.
- [125] **Fonacier L, Spergel J, Charlesworth EN, Weldon D, Beltrani V, Bernhisel-Broadbent J, Boguniewicz M, et al.** Report of the Topical Calcineurin Inhibitor Task Force of the American College of Allergy, Asthma and Immunology and the American Academy of Allergy, Asthma and Immunology. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. (2005); **115**:1249-53.
- [126] **Schmitt J, Schmitt N, Meurer M.** Cyclosporin in the treatment of patients with atopic eczema - a systematic review and meta-analysis. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*. (2007); **21**:606-19.
- [127] **Cornish KS, Gregory ME, Ramaesh K.** Systemic cyclosporin A in severe atopic keratoconjunctivitis. *European Journal of Ophthalmology*. (2010); **20**:844-51.
- [128] **Chin ER, Olson EN, Richardson JA, Yang Q, Humphries C, Shelton JM, Wu H, et al.** A calcineurin-dependent transcriptional pathway controls skeletal muscle fiber type. *Genes and Development*. (1998); **12**:2499-509.

-
- [129] **Molkentin JD.** Parsing good versus bad signaling pathways in the heart: role of calcineurin-nuclear factor of activated T-cells. *Circulation Research*. (2013); **113**:16-9.
- [130] **De Windt LJ, Lim HW, Bueno OF, Liang Q, Delling U, Braz JC, Glascock BJ, et al.** Targeted inhibition of calcineurin attenuates cardiac hypertrophy in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. (2001); **98**:3322-7.
- [131] **Wilkins BJ, Molkentin JD.** Calcium-calcineurin signaling in the regulation of cardiac hypertrophy. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. (2004); **322**:1178-91.
- [132] **Molkentin JD, Lu JR, Antos CL, Markham B, Richardson J, Robbins J, Grant SR, et al.** A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy. *Cell*. (1998); **93**:215-28.
- [133] **De Windt LJ, Lim HW, Taigen T, Wencker D, Condorelli G, Dorn GW, 2nd, Kitsis RN, et al.** Calcineurin-mediated hypertrophy protects cardiomyocytes from apoptosis in vitro and in vivo: An apoptosis-independent model of dilated heart failure. *Circulation Research*. (2000); **86**:255-63.
- [134] **Maillet M, Davis J, Auger-Messier M, York A, Osinska H, Piquereau J, Lorenz JN, et al.** Heart-specific deletion of CnB1 reveals multiple mechanisms whereby calcineurin regulates cardiac growth and function. *Journal of Biological Chemistry*. (2010); **285**:6716-24.
- [135] **Wilkins BJ, Dai YS, Bueno OF, Parsons SA, Xu J, Plank DM, Jones F, et al.** Calcineurin/NFAT coupling participates in pathological, but not physiological, cardiac hypertrophy. *Circulation Research*. (2004); **94**:110-8.
- [136] **Rameau GA, Chiu LY, Ziff EB.** NMDA receptor regulation of nNOS phosphorylation and induction of neuron death. *Neurobiology of Aging*. (2003); **24**:1123-33.
- [137] **Mittal CK, Jadhav AL.** Calcium-dependent inhibition of constitutive nitric oxide synthase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. (1994); **203**:8-15.

-
- [138] **Dawson TM, Steiner JP, Dawson VL, Dinerman JL, Uhl GR, Snyder SH.** Immunosuppressant FK506 enhances phosphorylation of nitric oxide synthase and protects against glutamate neurotoxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* (1993); **90**:9808-12.
- [139] **Ruiz F, Alvarez G, Ramos M, Hernandez M, Bogonez E, Satrustegui J.** Cyclosporin A targets involved in protection against glutamate excitotoxicity. *European Journal of Pharmacology.* (2000); **404**:29-39.
- [140] **Felipo V, Hermenegildo C, Montoliu C, Llansola M, Minana MD.** Neurotoxicity of ammonia and glutamate: molecular mechanisms and prevention. *Neurotoxicology.* (1998); **19**:675-81.
- [141] **Sharkey J, Butcher SP.** Immunophilins mediate the neuroprotective effects of FK506 in focal cerebral ischaemia. *Nature.* (1994); **371**:336-9.
- [142] **Kelly JS, Sharkey J.** Immunosuppressants-ligands as neuroprotectants. *Transplantation Proceedings.* (2001); **33**:2217-9.
- [143] **Sharkey J, Jones PA, McCarter JF, Kelly JS.** Calcineurin inhibitors as neuroprotectants - Focus of tacrolimus and cyclosporin. *CNS Drugs.* (2000); **13**:1-13.
- [144] **Asai A, Qiu J, Narita Y, Chi S, Saito N, Shinoura N, Hamada H, et al.** High level calcineurin activity predisposes neuronal cells to apoptosis. *Journal of Biological Chemistry.* (1999); **274**:34450-8.
- [145] **Furman JL, Sompol P, Kraner SD, Pleiss MM, Putman EJ, Dunkerson J, Mohmmad Abdul H, et al.** Blockade of Astrocytic Calcineurin/NFAT Signaling Helps to Normalize Hippocampal Synaptic Function and Plasticity in a Rat Model of Traumatic Brain Injury. *Journal of Neuroscience.* (2016); **36**:1502-15.
- [146] **Mata M, Honegger P, Fink DJ.** Modulation of phosphorylation of neuronal cytoskeletal proteins by neuronal depolarization. *Cellular and Molecular Neurobiology.* (1997); **17**:129-40.
- [147] **Tokuda M, Hatase O.** Regulation of neuronal plasticity in the central nervous system by phosphorylation and dephosphorylation. *Molecular Neurobiology.* (1998); **17**:137-56.

-
- [148] **Goto S, Yamamoto H, Fukunaga K, Iwasa T, Matsukado Y, Miyamoto E.** Dephosphorylation of microtubule-associated protein 2, tau factor, and tubulin by calcineurin. *Journal of Neurochemistry*. (1985); **45**:276-83.
- [149] **Shah SZ, Hussain T, Zhao D, Yang L.** A central role for calcineurin in protein misfolding neurodegenerative diseases. *Cellular and Molecular Life Sciences*. (2017); **74**:1061-74.
- [150] **Harris KA, Oyler GA, Doolittle GM, Vincent I, Lehman RA, Kincaid RL, Billingsley ML.** Okadaic acid induces hyperphosphorylated forms of tau protein in human brain slices. *Annals of Neurology*. (1993); **33**:77-87.
- [151] **Yin Y, Gao D, Wang Y, Wang ZH, Wang X, Ye J, Wu D, et al.** Tau accumulation induces synaptic impairment and memory deficit by calcineurin-mediated inactivation of nuclear CaMKIV/CREB signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. (2016); **113**:E3773-81.
- [152] **Pleiss MM, Sompol P, Kraner SD, Abdul HM, Furman JL, Guttmann RP, Wilcock DM, et al.** Calcineurin proteolysis in astrocytes: Implications for impaired synaptic function. *Biochimica et Biophysica Acta*. (2016); **1862**:1521-32.
- [153] **Shioda N, Fukunaga K.** [Functional roles of constitutively active calcineurin in delayed neuronal death after brain ischemia]. *Yakugaku Zasshi Journal of the Pharmaceutical Society of Japan*. (2011); **131**:13-20.
- [154] **Shioda N, Han F, Moriguchi S, Fukunaga K.** Constitutively active calcineurin mediates delayed neuronal death through Fas-ligand expression via activation of NFAT and FKHR transcriptional activities in mouse brain ischemia. *Journal of Neurochemistry*. (2007); **102**:1506-17.
- [155] **Gratuze M, Noel A, Julien C, Cisbani G, Milot-Rousseau P, Morin F, Dickler M, et al.** Tau hyperphosphorylation and deregulation of calcineurin in mouse models of Huntington's disease. *Human Molecular Genetics*. (2015); **24**:86-99.
- [156] **Fernandez AM, Hervas R, Dominguez-Fraile M, Garrido VN, Gomez-Gutierrez P, Vega M, Vitorica J, et al.** Blockade of the Interaction of Calcineurin with FOXO in Astrocytes Protects Against Amyloid-beta-Induced Neuronal Death. *Journal of Alzheimer's Disease*. (2016); **52**:1471-8.

-
- [157] **Gal M, Li S, Luna RE, Takeuchi K, Wagner G.** The LxVP and PxlXIT NFAT motifs bind jointly to overlapping epitopes on calcineurin's catalytic domain distant to the regulatory domain. *Structure*. (2014); **22**:1016-27.
- [158] **Rodriguez A, Roy J, Martinez-Martinez S, Lopez-Maderuelo MD, Nino-Moreno P, Orti L, Pantoja-Uceda D, et al.** A conserved docking surface on calcineurin mediates interaction with substrates and immunosuppressants. *Molecular Cell*. (2009); **33**:616-26.
- [159] **Davies KJ, Ermak G, Rothermel BA, Pritchard M, Heitman J, Ahnn J, Henrique-Silva F, et al.** Renaming the DSCR1/Adapt78 gene family as RCAN: regulators of calcineurin. *FASEB Journal*. (2007); **21**:3023-8.
- [160] **Ermak G, Morgan TE, Davies KJ.** Chronic overexpression of the calcineurin inhibitory gene DSCR1 (Adapt78) is associated with Alzheimer's disease. *Journal of Biological Chemistry*. (2001); **276**:38787-94.
- [161] **Harris CD, Ermak G, Davies KJ.** Multiple roles of the DSCR1 (Adapt78 or RCAN1) gene and its protein product calcipressin 1 (or RCAN1) in disease. *Cellular and Molecular Life Sciences*. (2005); **62**:2477-86.
- [162] **Fuentes JJ, Pritchard MA, Planas AM, Bosch A, Ferrer I, Estivill X.** A new human gene from the Down syndrome critical region encodes a proline-rich protein highly expressed in fetal brain and heart. *Human Molecular Genetics*. (1995); **4**:1935-44.
- [163] **Rothermel B, Vega RB, Yang J, Wu H, Bassel-Duby R, Williams RS.** A protein encoded within the Down syndrome critical region is enriched in striated muscles and inhibits calcineurin signaling. *Journal of Biological Chemistry*. (2000); **275**:8719-25.
- [164] **Fuentes JJ, Genesca L, Kingsbury TJ, Cunningham KW, Perez-Riba M, Estivill X, de la Luna S.** DSCR1, overexpressed in Down syndrome, is an inhibitor of calcineurin-mediated signaling pathways. *Human Molecular Genetics*. (2000); **9**:1681-90.
- [165] **Ryeom S, Greenwald RJ, Sharpe AH, McKeon F.** The threshold pattern of calcineurin-dependent gene expression is altered by loss of the endogenous inhibitor calcipressin. *Nature Immunology*. (2003); **4**:874-81.
- [166] **Genesca L, Aubareda A, Fuentes JJ, Estivill X, De La Luna S, Perez-Riba M.** Phosphorylation of calcipressin 1 increases its ability to inhibit calcineurin and decreases calcipressin half-life. *Biochemical Journal*. (2003); **374**:567-75.

-
- [167] **Miyazaki T, Kanou Y, Murata Y, Ohmori S, Niwa T, Maeda K, Yamamura H, et al.** Molecular cloning of a novel thyroid hormone-responsive gene, ZAKI-4, in human skin fibroblasts. *Journal of Biological Chemistry*. (1996); **271**:14567-71.
- [168] **Strippoli P, Lenzi L, Petrini M, Carinci P, Zannotti M.** A new gene family including DSCR1 (Down Syndrome Candidate Region 1) and ZAKI-4: characterization from yeast to human and identification of DSCR1-like 2, a novel human member (DSCR1L2). *Genomics*. (2000); **64**:252-63.
- [169] **Mulero MC, Aubareda A, Schluter A, Perez-Riba M.** RCAN3, a novel calcineurin inhibitor that down-regulates NFAT-dependent cytokine gene expression. *Biochimica et Biophysica Acta*. (2007); **1773**:330-41.
- [170] **Sun L, Youn HD, Loh C, Stolow M, He W, Liu JO.** Cabin 1, a negative regulator for calcineurin signaling in T lymphocytes. *Immunity*. (1998); **8**:703-11.
- [171] **Liu JO.** Endogenous protein inhibitors of calcineurin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. (2003); **311**:1103-9.
- [172] **Lai MM, Luo HR, Burnett PE, Hong JJ, Snyder SH.** The calcineurin-binding protein cain is a negative regulator of synaptic vesicle endocytosis. *Journal of Biological Chemistry*. (2000); **275**:34017-20.
- [173] **Lai MM, Hong JJ, Ruggiero AM, Burnett PE, Slepnev VI, De Camilli P, Snyder SH.** The calcineurin-dynamitin 1 complex as a calcium sensor for synaptic vesicle endocytosis. *Journal of Biological Chemistry*. (1999); **274**:25963-6.
- [174] **Kobayashi Y, da Silva R, Kumanogoh H, Miyata S, Sato C, Kitajima K, Nakamura S, et al.** Ganglioside contained in the neuronal tissue-enriched acidic protein of 22 kDa (NAP-22) fraction prepared from the detergent-resistant membrane microdomain of rat brain inhibits the phosphatase activity of calcineurin. *Journal of Neuroscience Research*. (2015); **93**:1462-70.
- [175] **Erdmann F, Weiwad M.** Calcineurin inhibitors: status quo and perspectives. *Biomol Concepts*. (2011); **2**:65-78.
- [176] **Lawen A, Zocher R.** Cyclosporin synthetase. The most complex peptide synthesizing multienzyme polypeptide so far described. *Journal of Biological Chemistry*. (1990); **265**:11355-60.

-
- [177] **Kobel H, Traber R.** Directed Biosynthesis of Cyclosporins. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology.* (1982); **14**:237-40.
- [178] **von Wartburg A, Traber R.** Cyclosporins, fungal metabolites with immunosuppressive activities. *Progress in Medicinal Chemistry.* (1988); **25**:1-33.
- [179] **Liu J, Farmer JD, Jr., Lane WS, Friedman J, Weissman I, Schreiber SL.** Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell.* (1991); **66**:807-15.
- [180] **Fischer G, Bang H, Mech C.** [Determination of enzymatic catalysis for the cis-trans-isomerization of peptide binding in proline-containing peptides]. *Biomedica Biochimica Acta.* (1984); **43**:1101-11.
- [181] **Fischer G, Wittmann-Liebold B, Lang K, Kiefhaber T, Schmid FX.** Cyclophilin and peptidyl-prolyl cis-trans isomerase are probably identical proteins. *Nature.* (1989); **337**:476-8.
- [182] **Lang K, Schmid FX, Fischer G.** Catalysis of protein folding by prolyl isomerase. *Nature.* (1987); **329**:268-70.
- [183] **Rosen MK, Standaert RF, Galat A, Nakatsuka M, Schreiber SL.** Inhibition of FKBP rotamase activity by immunosuppressant FK506: twisted amide surrogate. *Science.* (1990); **248**:863-6.
- [184] **Edlich F, Weiwad M, Erdmann F, Fanghanel J, Jarczowski F, Rahfeld JU, Fischer G.** Bcl-2 regulator FKBP38 is activated by Ca²⁺/calmodulin. *EMBO Journal.* (2005); **24**:2688-99.
- [185] **Jarczowski F, Jahreis G, Erdmann F, Schierhorn A, Fischer G, Edlich F.** FKBP36 is an inherent multifunctional glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase inhibitor. *Journal of Biological Chemistry.* (2009); **284**:766-73.
- [186] **Jarczowski F, Fischer G, Edlich F.** FKBP36 forms complexes with clathrin and Hsp72 in spermatocytes. *Biochemistry.* (2008); **47**:6946-52.
- [187] **MMI_Pharmindex_Plus.** Fachinformation Sandimmun® 100 mg Weichkapseln (Stand: 19.04.2017).

-
- [188] **Jiang XR, Kelsey SM, Wu YL, Newland AC.** Circumvention of P-glycoprotein-mediated drug resistance in human leukaemic cells by non-immunosuppressive cyclosporin D analogue, SDZ PSC 833. *British Journal of Haematology.* (1995); **90**:375-83.
- [189] **Frydrych I, Mlejnek P, Dolezel P.** Cyclosporin A sensitises Bcr-Abl positive cells to imatinib mesylate independently of P-glycoprotein expression. *Toxicology in Vitro.* (2009); **23**:1482-90.
- [190] **Becton D, Dahl GV, Ravindranath Y, Chang MN, Behm FG, Raimondi SC, Head DR, et al.** Randomized use of cyclosporin A (CsA) to modulate P-glycoprotein in children with AML in remission: Pediatric Oncology Group Study 9421. *Blood.* (2006); **107**:1315-24.
- [191] **Helgason HH, Koolen SL, Werkhoven E, Malingre MM, Kruijtzter CM, Huitema AD, Schot ME, et al.** Phase II and pharmacological study of oral docetaxel plus cyclosporin A in anthracycline pre-treated metastatic breast cancer. *Current Clinical Pharmacology.* (2014); **9**:139-47.
- [192] **Middleton G, Brown S, Lowe C, Maughan T, Gwyther S, Oliver A, Richman S, et al.** A randomised phase III trial of the pharmacokinetic biomodulation of irinotecan using oral ciclosporin in advanced colorectal cancer: results of the Panitumumab, Irinotecan & Ciclosporin in COLOrectal cancer therapy trial (PICCOLO). *European Journal of Cancer.* (2013); **49**:3507-16.
- [193] **Chester JD, Joel SP, Cheeseman SL, Hall GD, Braun MS, Perry J, Davis T, et al.** Phase I and pharmacokinetic study of intravenous irinotecan plus oral ciclosporin in patients with fluorouracil-refractory metastatic colon cancer. *Journal of Clinical Oncology.* (2003); **21**:1125-32.
- [194] **Ryffel B, Mihatsch MJ, Fisher GL.** Immunosuppression and cancer: the ciclosporin case. *Drug and Chemical Toxicology.* (1992); **15**:95-115.
- [195] **Marcil I, Stern RS.** Squamous-cell cancer of the skin in patients given PUVA and ciclosporin: nested cohort crossover study. *Lancet.* (2001); **358**:1042-5.
- [196] **Akool el S, Doller A, Babelova A, Tsalastra W, Moreth K, Schaefer L, Pfeilschifter J, et al.** Molecular mechanisms of TGF beta receptor-triggered signaling cascades rapidly induced by the calcineurin inhibitors cyclosporin A and FK506. *Journal of Immunology.* (2008); **181**:2831-45.

-
- [197] **Ling H, Li X, Jha S, Wang W, Karetzkaya L, Pratt B, Ledbetter S.** Therapeutic role of TGF-beta-neutralizing antibody in mouse cyclosporin A nephropathy: morphologic improvement associated with functional preservation. *Journal of the American Society of Nephrology.* (2003); **14**:377-88.
- [198] **Huai Q, Kim HY, Liu Y, Zhao Y, Mondragon A, Liu JO, Ke H.** Crystal structure of calcineurin-cyclophilin-cyclosporin shows common but distinct recognition of immunophilin-drug complexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* (2002); **99**:12037-42.
- [199] **Jin L, Harrison SC.** Crystal structure of human calcineurin complexed with cyclosporin A and human cyclophilin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* (2002); **99**:13522-6.
- [200] **Mlynar E, Bevec D, Billich A, Rosenwirth B, Steinkasserer A.** The non-immunosuppressive cyclosporin A analogue SDZ NIM 811 inhibits cyclophilin A incorporation into virions and virus replication in human immunodeficiency virus type 1-infected primary and growth-arrested T cells. *Journal of General Virology.* (1997); **78 (Pt 4)**:825-35.
- [201] **Twentyman PR, Wright KA, Wallace HM.** Effects of cyclosporin A and a non-immunosuppressive analogue, O-acetyl cyclosporin A, upon the growth of parent and multidrug resistant human lung cancer cells in vitro. *British Journal of Cancer.* (1992); **65**:335-40.
- [202] **Stokes SS, Rich DH.** Biological activities of non-immunosuppressive cyclosporin analogs. *IDrugs.* (1999); **2**:782-95.
- [203] **Karpas A, Lowdell M, Jacobson SK, Hill F.** Inhibition of human immunodeficiency virus and growth of infected T cells by the immunosuppressive drugs cyclosporin A and FK 506. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* (1992); **89**:8351-5.
- [204] **Steinkasserer A, Harrison R, Billich A, Hammerschmid F, Werner G, Wolff B, Peichl P, et al.** Mode of action of SDZ NIM 811, a nonimmunosuppressive cyclosporin A analog with activity against human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1): interference with early and late events in HIV-1 replication. *Journal of Virology.* (1995); **69**:814-24.

-
- [205] **Billich A, Hammerschmid F, Peichl P, Wenger R, Zenke G, Quesniaux V, Rosenwirth B.** Mode of action of SDZ NIM 811, a nonimmunosuppressive cyclosporin A analog with activity against human immunodeficiency virus (HIV) type 1: interference with HIV protein-cyclophilin A interactions. *Journal of Virology*. (1995); **69**:2451-61.
- [206] **Liu C, Perilla JR, Ning J, Lu M, Hou G, Ramalho R, Himes BA, et al.** Cyclophilin A stabilizes the HIV-1 capsid through a novel non-canonical binding site. *Nat Commun*. (2016); **7**:10714.
- [207] **Schaller T, Ocwieja KE, Rasaiyaah J, Price AJ, Brady TL, Roth SL, Hue S, et al.** HIV-1 capsid-cyclophilin interactions determine nuclear import pathway, integration targeting and replication efficiency. *PLoS Pathogens*. (2011); **7**:e1002439.
- [208] **Inamura N, Hashimoto M, Nakahara K, Aoki H, Yamaguchi I, Kohsaka M.** Immunosuppressive effect of FK506 on collagen-induced arthritis in rats. *Clinical Immunology and Immunopathology*. (1988); **46**:82-90.
- [209] **Inamura N, Hashimoto M, Nakahara K, Nakajima Y, Nishio M, Aoki H, Yamaguchi I, et al.** Immunosuppressive effect of FK506 on experimental allergic encephalomyelitis in rats. *International Journal of Immunopharmacology*. (1988); **10**:991-5.
- [210] **Inamura N, Nakahara K, Kino T, Goto T, Aoki H, Yamaguchi I, Kohsaka M, et al.** Prolongation of skin allograft survival in rats by a novel immunosuppressive agent, FK506. *Transplantation*. (1988); **45**:206-9.
- [211] **Kawashima H, Fujino Y, Mochizuki M.** Effects of a new immunosuppressive agent, FK506, on experimental autoimmune uveoretinitis in rats. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. (1988); **29**:1265-71.
- [212] **Nakajima K, Sakamoto K, Ochiai T, Nagata M, Asano T, Isono K.** Prolongation of cardiac xenograft survival in rats treated with 15-deoxyspergualin alone and in combination with FK506. *Transplantation*. (1988); **45**:1146-8.
- [213] **Ochiai T, Sakamoto K, Nagata M, Nakajima K, Goto T, Hori S, Kenmochi T, et al.** Studies on FK506 in experimental organ transplantation. *Transplantation Proceedings*. (1988); **20**:209-14.
- [214] **Hewitt CW, Black KS.** Comparative studies of FK506 with cyclosporine. *Transplantation*. (1988); **46**:482-3.

-
- [215] **Todo S, Murase N, Ueda Y, Podesta L, ChapChap P, Kahn D, Okuda K, et al.** Effect of FK506 in experimental organ transplantation. *Transplantation Proceedings*. (1988); **20**:215-9.
- [216] **Arai T, Kouama Y, Suenaga T, Honda H.** Ascomycin, an antifungal antibiotic. *Journal of Antibiotics*. (1962); **15**:231-2.
- [217] **Hatanaka H, Kino T, Miyata S, Inamura N, Kuroda A, Goto T, Tanaka H, et al.** FR-900520 and FR-900523, novel immunosuppressants isolated from a *Streptomyces*. II. Fermentation, isolation and physico-chemical and biological characteristics. *Journal of Antibiotics*. (1988); **41**:1592-601.
- [218] **Morisaki M, Arai T.** Identity of immunosuppressant FR-900520 with ascomycin. *Journal of Antibiotics*. (1992); **45**:126-8.
- [219] **Goulet MT, McAlpine SR, Staruch MJ, Koprak S, Dumont FJ, Cryan JG, Wiederrecht GJ, et al.** C32-O-imidazol-2-yl-methyl ether derivatives of the immunosuppressant ascomycin with improved therapeutic potential. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. (1998); **8**:2253-8.
- [220] **Koch K, Newborg MF, Hanson DC, Cooper K, Shepard RM, Biehl ML, Biggers MS, et al.** The C-32 triacetyl-L-rhamnose derivative of ascomycin: a potent, orally active macrolactone immunosuppressant. *Journal of Medicinal Chemistry*. (1995); **38**:1255-8.
- [221] **Becker JW, Rotonda J, Cryan JG, Martin M, Parsons WH, Sinclair PJ, Wiederrecht G, et al.** 32-Indolyl ether derivatives of ascomycin: three-dimensional structures of complexes with FK506-binding protein. *Journal of Medicinal Chemistry*. (1999); **42**:2798-804.
- [222] **Goulet MT, Sinclair PJ, Wong F, Staruch MJ, Dumont FJ, Cryan JG, Wiederrecht GJ, et al.** C32-O-phenalkyl ether derivatives of the immunosuppressant ascomycin: a tether length study. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. (1999); **9**:2085-8.
- [223] **Mollison KW, Fey TA, Krause RA, Andrews JM, Bretheim PT, Cusick PK, Hsieh GC, et al.** Nephrotoxicity studies of the immunosuppressants tacrolimus (FK506) and ascomycin in rat models. *Toxicology*. (1998); **125**:169-81.

-
- [224] **Mollison KW, Fey TA, Krause RA, Thomas VA, Mehta AP, Luly JR.** Comparison of FK-506, rapamycin, ascomycin, and cyclosporine in mouse models of host-versus-graft disease and heterotopic heart transplantation. *Annals of the New York Academy of Sciences*. (1993); **685**:55-7.
- [225] **Motamedi H, Cai SJ, Shafiee A, Elliston KO.** Structural organization of a multifunctional polyketide synthase involved in the biosynthesis of the macrolide immunosuppressant FK506. *European Journal of Biochemistry*. (1997); **244**:74-80.
- [226] **Bruner KL, Derfoul A, Robertson NM, Guerriero G, Fernandes-Alnemri T, Alnemri ES, Litwack G.** The unliganded mineralocorticoid receptor is associated with heat shock proteins 70 and 90 and the immunophilin FKBP-52. *Receptors and Signal Transduction*. (1997); **7**:85-98.
- [227] **Cluning C, Ward BK, Rea SL, Arulpragasam A, Fuller PJ, Ratajczak T.** The helix 1-3 loop in the glucocorticoid receptor LBD is a regulatory element for FKBP cochaperones. *Molecular Endocrinology*. (2013); **27**:1020-35.
- [228] **Albu S, Romanowski CP, Letizia Curzi M, Jakubcakova V, Flachskamm C, Gassen NC, Hartmann J, et al.** Deficiency of FK506-binding protein (FKBP) 51 alters sleep architecture and recovery sleep responses to stress in mice. *Journal of Sleep Research*. (2014); **23**:176-85.
- [229] **Griffith JP, Kim JL, Kim EE, Sintchak MD, Thomson JA, Fitzgibbon MJ, Fleming MA, et al.** X-ray structure of calcineurin inhibited by the immunophilin-immunosuppressant FKBP12-FK506 complex. *Cell*. (1995); **82**:507-22.
- [230] **Christner C, Herdegen T, Fischer G.** FKBP ligands as novel therapeutics for neurological disorders. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*. (2001); **1**:377-97.
- [231] **Guo X, Dawson VL, Dawson TM.** Neuroimmunophilin ligands exert neuroregeneration and neuroprotection in midbrain dopaminergic neurons. *European Journal of Neuroscience*. (2001); **13**:1683-93.
- [232] **Ross DT, Guo HZ, Howorth P, Chen Y, Hamilton GS, Steiner JP.** The small molecule FKBP ligand GPI 1046 induces partial striatal re-innervation after intranigral 6-hydroxydopamine lesion in rats. *Neuroscience Letters*. (2001); **297**:113-6.

-
- [233] **Steiner JP, Hamilton GS, Ross DT, Valentine HL, Guo H, Connolly MA, Liang S, et al.** Neurotrophic immunophilin ligands stimulate structural and functional recovery in neurodegenerative animal models. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* (1997); **94**:2019-24.
- [234] **Wu YQ, Wilkinson DE, Limburg D, Li JH, Sauer H, Ross D, Liang S, et al.** Synthesis of ketone analogues of prolyl and pipecolyl ester FKBP12 ligands. *J Med Chem.* (2002); **45**:3558-68.
- [235] **Gold BG, Zeleny-Pooley M, Chaturvedi P, Wang MS.** Oral administration of a nonimmunosuppressant FKBP-12 ligand speeds nerve regeneration. *Neuroreport.* (1998); **9**:553-8.
- [236] **Gold BG, Zeleny-Pooley M, Wang MS, Chaturvedi P, Armistead DM.** A nonimmunosuppressant FKBP-12 ligand increases nerve regeneration. *Experimental Neurology.* (1997); **147**:269-78.
- [237] **Gold BG, Armistead DM, Wang MS.** Non-FK506-binding protein-12 neuroimmunophilin ligands increase neurite elongation and accelerate nerve regeneration. *Journal of Neuroscience Research.* (2005); **80**:56-65.
- [238] **MMI_Pharmindex_Plus.** Fachinformation Prograf® 5 mg Hartkapseln. (Stand: 19.04.2017).
- [239] **MMI_Pharmindex_Plus.** Fachinformation Protopic® 0,1 % Salbe. (Stand: 19.04.2017).
- [240] **Karashima T, Hachisuka H, Sasai Y.** FK506 and cyclosporin A inhibit growth factor-stimulated human keratinocyte proliferation by blocking cells in the G0/G1 phases of the cell cycle. *Journal of Dermatological Science.* (1996); **12**:246-54.
- [241] **Michel G, Auer H, Kemeny L, Bocking A, Ruzicka T.** Antioncogene P53 and mitogenic cytokine interleukin-8 aberrantly expressed in psoriatic skin are inversely regulated by the antipsoriatic drug tacrolimus (FK506). *Biochemical Pharmacology.* (1996); **51**:1315-20.
- [242] **Mittal A, Dogra S, Narang T, Sharma A.** Pilot Study to Evaluate the Efficacy and Safety of Oral Tacrolimus in Adult Patients With Refractory Severe Plaque Psoriasis. *Journal of Cutaneous Medicine and Surgery.* (2016); **20**:228-32.

-
- [243] **Tamura S, Ohike A, Ibuki R, Amidon GL, Yamashita S.** Tacrolimus is a class II low-solubility high-permeability drug: The effect of P-glycoprotein efflux on regional permeability of tacrolimus in rats. *Journal of Pharmaceutical Sciences.* (2002); **91**:719-29.
- [244] **Meingassner JG, Grassberger M, Fahrngruber H, Moore HD, Schuurman H, Stutz A.** A novel anti-inflammatory drug, SDZ ASM 981, for the topical and oral treatment of skin diseases: in vivo pharmacology. *British Journal of Dermatology.* (1997); **137**:568-76.
- [245] **Paul C, Graeber M, Stuetz A.** Ascomycins: promising agents for the treatment of inflammatory skin diseases. *Expert Opin Investig Drugs.* (2000); **9**:69-77.
- [246] **Queille-Roussel C, Paul C, Duteil L, Lefebvre MC, Rapatz G, Zagula M, Ortonne JP.** The new topical ascomycin derivative SDZ ASM 981 does not induce skin atrophy when applied to normal skin for 4 weeks: a randomized, double-blind controlled study. *British Journal of Dermatology.* (2001); **144**:507-13.
- [247] **Grassberger M, Steinhoff M, Schneider D, Luger TA.** Pimecrolimus -- an anti-inflammatory drug targeting the skin. *Experimental Dermatology.* (2004); **13**:721-30.
- [248] **Van Leent EJ, Graber M, Thurston M, Wagenaar A, Spuls PI, Bos JD.** Effectiveness of the ascomycin macrolactam SDZ ASM 981 in the topical treatment of atopic dermatitis. *Archives of Dermatology.* (1998); **134**:805-9.
- [249] **Harper J, Green A, Scott G, Gruendl E, Dorobek B, Cardno M, Burtin P.** First experience of topical SDZ ASM 981 in children with atopic dermatitis. *British Journal of Dermatology.* (2001); **144**:781-7.
- [250] **Kapp A, Papp K, Bingham A, Folster-Holst R, Ortonne JP, Potter PC, Gulliver W, et al.** Long-term management of atopic dermatitis in infants with topical pimecrolimus, a nonsteroid anti-inflammatory drug. *Journal of Allergy and Clinical Immunology.* (2002); **110**:277-84.
- [251] **Hultsch T, Muller KD, Meingassner JG, Grassberger M, Schopf RE, Knop J.** Ascomycin macrolactam derivative SDZ ASM 981 inhibits the release of granule-associated mediators and of newly synthesized cytokines in RBL 2H3 mast cells in an immunophilin-dependent manner. *Archives for Dermatological Research Archiv für Dermatologische Forschung.* (1998); **290**:501-7.

-
- [252] **Mrowietz U, Graeber M, Brautigam M, Thurston M, Wagenaar A, Weidinger G, Christophers E.** The novel ascomycin derivative SDZ ASM 981 is effective for psoriasis when used topically under occlusion. *British Journal of Dermatology*. (1998); **139**:992-6.
- [253] **MMI_Pharmindex_Plus.** Fachinformation Elidel® 10 mg/g Creme. (Stand: 19.04.2017).
- [254] **Weiwad M, Edlich F, Kilka S, Erdmann F, Jarczowski F, Dorn M, Moutty MC, et al.** Comparative analysis of calcineurin inhibition by complexes of immunosuppressive drugs with human FK506 binding proteins. *Biochemistry*. (2006); **45**:15776-84.
- [255] **Erdmann F, Weiwad M, Kilka S, Karanik M, Patzel M, Baumgrass R, Liebscher J, et al.** The novel calcineurin inhibitor CN585 has potent immunosuppressive properties in stimulated human T cells. *Journal of Biological Chemistry*. (2010); **285**:1888-98.
- [256] **Hows JM, Chipping PM, Fairhead S, Smith J, Baughan A, Gordon-Smith EC.** Nephrotoxicity in bone marrow transplant recipients treated with cyclosporin A. *British Journal of Haematology*. (1983); **54**:69-78.
- [257] **Gluckman E, Devergie A, Lokiec F, Poirier O, Baumelou A.** Nephrotoxicity of cyclosporin A in bone-marrow transplantation. *Lancet*. (1981); **2**:144-5.
- [258] **Dieperink H, Leyssac PP, Starklint H, Kemp E.** Long-term cyclosporin nephrotoxicity in the rat: effects on renal function and morphology. *Nephrology, Dialysis, Transplantation*. (1988); **3**:317-26.
- [259] **Rao KV, Crosson JT, Kjellstrand CM.** Chronic irreversible nephrotoxicity from cyclosporin A. *Nephron*. (1985); **41**:75-7.
- [260] **Whiting PH, Simpson JG.** The enhancement of cyclosporin A-induced nephrotoxicity by gentamicin. *Biochemical Pharmacology*. (1983); **32**:2025-8.
- [261] **Novakova I, Donnelly P, de Witte T, de Pauw B, Boezeman J, Veltman G.** Itraconazole and cyclosporin nephrotoxicity. *Lancet*. (1987); **2**:920-1.
- [262] **Deray G, Baumelou B, Le Hoang P, Aupetit B, Girard B, Baumelou A, Legrand JC, et al.** Enhancement of cyclosporin nephrotoxicity by diuretic therapy. *Clinical Nephrology*. (1989); **32**:47.

-
- [263] **Jadoul M, Pirson Y, van Ypersele de Strihou C.** Drugs potentiating cyclosporin nephrotoxicity. *Nephron*. (1991); **58**:383-4.
- [264] **Walker RJ, Lazzaro VA, Duggin GG, Horvath JS, Tiller DJ.** Cyclosporin A inhibits protein kinase C activity: a contributing mechanism in the development of nephrotoxicity? *Biochemical and Biophysical Research Communications*. (1989); **160**:409-15.
- [265] **Kumano K, Yoshida K, Iwamura M, Endo T, Sakai T, Nakamura K, Kuwao T.** The role for reactive oxygen species in cyclosporin A induced nephrotoxicity in rats. *Transplantation Proceedings*. (1989); **21**:941-2.
- [266] **Djamali A, Reese S, Hafez O, Vidyasagar A, Jacobson L, Swain W, Kolehmainen C, et al.** Nox2 is a mediator of chronic CsA nephrotoxicity. *American Journal of Transplantation*. (2012); **12**:1997-2007.
- [267] **Khanna AK, Cairns VR, Becker CG, Hosenpud JD.** TGF-beta: a link between immunosuppression, nephrotoxicity, and CsA. *Transplantation Proceedings*. (1998); **30**:944-5.
- [268] **Yang JW, Kim JS, Kim MK, Lee JY, Han BG, Choi SO.** The renoprotective effect of cGMP phosphodiesterase inhibitor and nitroprusside in a rat model of cyclosporin A-induced nephrotoxicity. *Clinical Nephrology*. (2013); **80**:53-62.
- [269] **Johnson DW, Saunders HJ, Vesey DA, Qi W, Field MJ, Pollock CA.** Enalaprilat directly ameliorates in vitro cyclosporin nephrotoxicity in human tubulo-interstitial cells. *Nephron*. (2000); **86**:473-81.
- [270] **Bagnis C, Deray G, Dubois M, Jacquiaud C, Bitker MO, Jacobs C.** Prevention of acute cyclosporin nephrotoxicity by verapamil and atrial natriuretic factor in the rat. *Nephrology, Dialysis, Transplantation*. (1994); **9**:1143-8.
- [271] **Dieperink H, Hansen HV, Kemp M, Leyssac PP, Starklint H, Kemp E.** Antagonist capacity of felodipine on cyclosporin A nephrotoxicity in the rat. *Nephrology, Dialysis, Transplantation*. (1992); **7**:1124-9.
- [272] **Zhang Y, Erdmann F, Baumgrass R, Schutkowski M, Fischer G.** Unexpected side chain effects at residue 8 of cyclosporin a derivatives allow photoswitching of immunosuppression. *Journal of Biological Chemistry*. (2005); **280**:4842-50.

-
- [273] **Baumgrass R, Zhang Y, Erdmann F, Thiel A, Weiwad M, Radbruch A, Fischer G.** Substitution in position 3 of cyclosporin A abolishes the cyclophilin-mediated gain-of-function mechanism but not immunosuppression. *Journal of Biological Chemistry*. (2004); **279**:2470-9.
- [274] **Lin W, Erdmann F, Quintero A, Fischer G, Zhang Y.** Thioxylated cyclosporin A for studying protein-drug interactions. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. (2016); **26**:5754-6.
- [275] **Malesevic M, Kuhling J, Erdmann F, Balsley MA, Bukrinsky MI, Constant SL, Fischer G.** A cyclosporin derivative discriminates between extracellular and intracellular cyclophilins. *Angewandte Chemie International Ed In English*. (2010); **49**:213-5.
- [276] **Boulos S, Meloni BP, Arthur PG, Majda B, Bojarski C, Knuckey NW.** Evidence that intracellular cyclophilin A and cyclophilin A/CD147 receptor-mediated ERK1/2 signalling can protect neurons against in vitro oxidative and ischemic injury. *Neurobiology of Disease*. (2007); **25**:54-64.
- [277] **Peng H, Vijayakumar S, Schiene-Fischer C, Li H, Purkerson JM, Malesevic M, Liebscher J, et al.** Secreted cyclophilin A, a peptidylprolyl cis-trans isomerase, mediates matrix assembly of hensin, a protein implicated in epithelial differentiation. *Journal of Biological Chemistry*. (2009); **284**:6465-75.
- [278] **Yurchenko V, Constant S, Bukrinsky M.** Dealing with the family: CD147 interactions with cyclophilins. *Immunology*. (2006); **117**:301-9.
- [279] **Hopkins S, Scorneaux B, Huang Z, Murray MG, Wring S, Smitley C, Harris R, et al.** SCY-635, a novel nonimmunosuppressive analog of cyclosporine that exhibits potent inhibition of hepatitis C virus RNA replication in vitro. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. (2010); **54**:660-72.
- [280] **Akiyama H, Yoshinaga H, Tanaka T, Hiruma K, Tanikawa S, Sakamaki H, Onozawa Y, et al.** Effects of cyclosporin A on hepatitis C virus infection in bone marrow transplant patients. Bone Marrow Transplantation Team. *Bone Marrow Transplantation*. (1997); **20**:993-5.
- [281] **Chatterji U, Bobardt M, Selvarajah S, Yang F, Tang H, Sakamoto N, Vuagniaux G, et al.** The isomerase active site of cyclophilin A is critical for hepatitis C virus replication. *Journal of Biological Chemistry*. (2009); **284**:16998-7005.

-
- [282] **Gallay PA, Bobardt MD, Chatterji U, Trepanier DJ, Ure D, Ordonez C, Foster R.** The Novel Cyclophilin Inhibitor CPI-431-32 Concurrently Blocks HCV and HIV-1 Infections via a Similar Mechanism of Action. *PLoS One*. (2015); **10**:e0134707.
- [283] **Gallay PA, Chatterji U, Bobardt MD, Long Z, Zhang S, Su Z.** Characterization of the Anti-HCV Activities of the New Cyclophilin Inhibitor STG-175. *PLoS One*. (2016); **11**:e0152036.
- [284] **Erdmann F, Zhang Y.** Reversible photoswitching of protein function. *Mol Biosyst*. (2010); **6**:2103-9.
- [285] **Zhang Y, Erdmann F, Fischer G.** Augmented photoswitching modulates immune signaling. *Nature Chemical Biology*. (2009); **5**:724-6.
- [286] **Erdmann F, Lin W, Platzer C, Schmidt M, Sippl W, Fischer G, Zhang Y.** Augmented reversible photoswitching of drug-target interaction through "surface borrowing". *Biochemical Pharmacology*. (2017); **125**:84-92.

5 Anhang

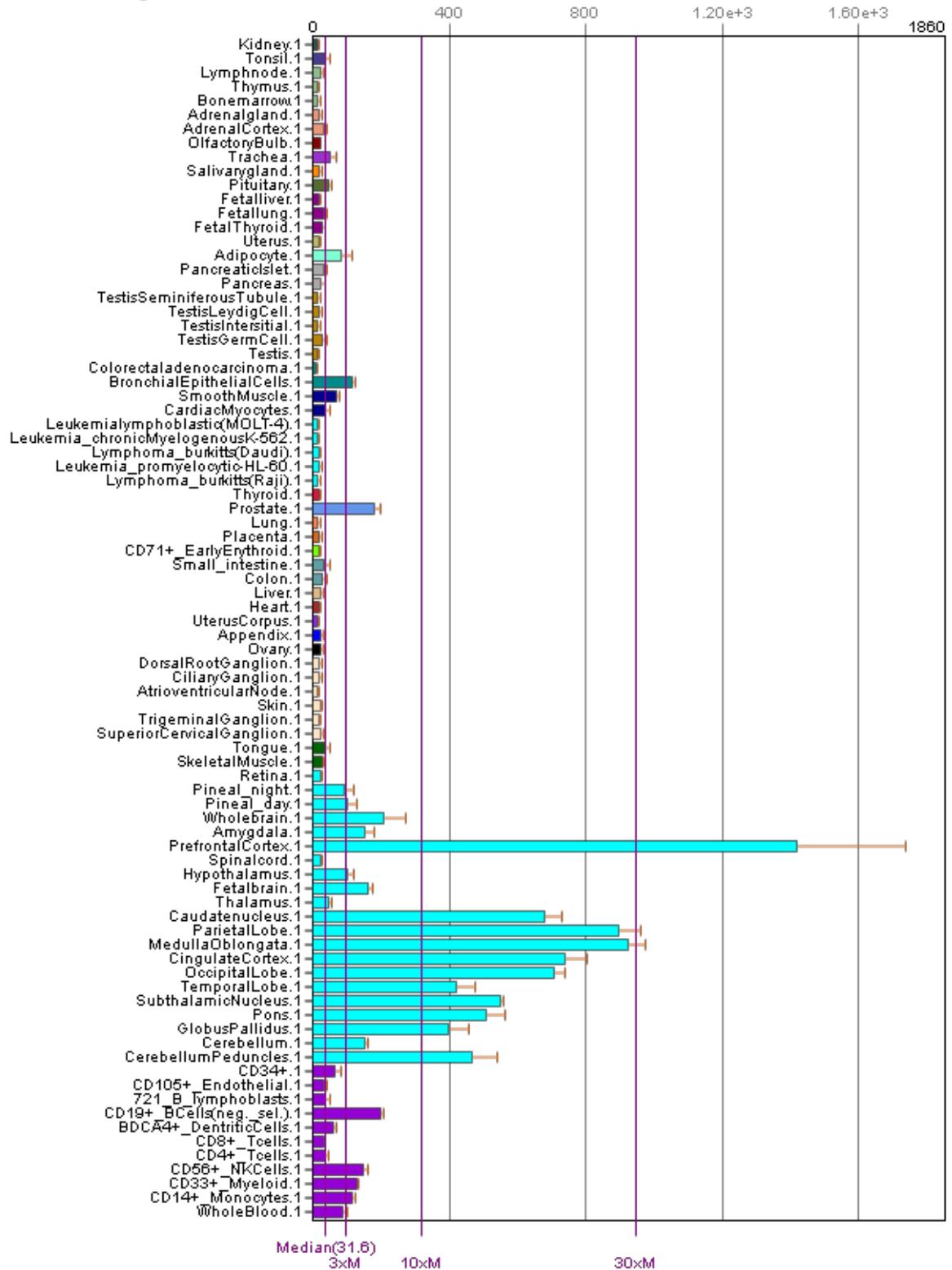


Abb. 13: mRNA-Expressionsmuster human Calcineurin A alpha. (PPP3CA)

Beispiel des Gewebe-spezifischen mRNA-Expressionsmusters der humanen Calcineurin A α -Isoform, basierend auf dem Datenset: GeneAtlas U133A, gcrma und dem Probeset: 202490_s_at, welches mit Hilfe von biogps.org ausgewertet wurde.

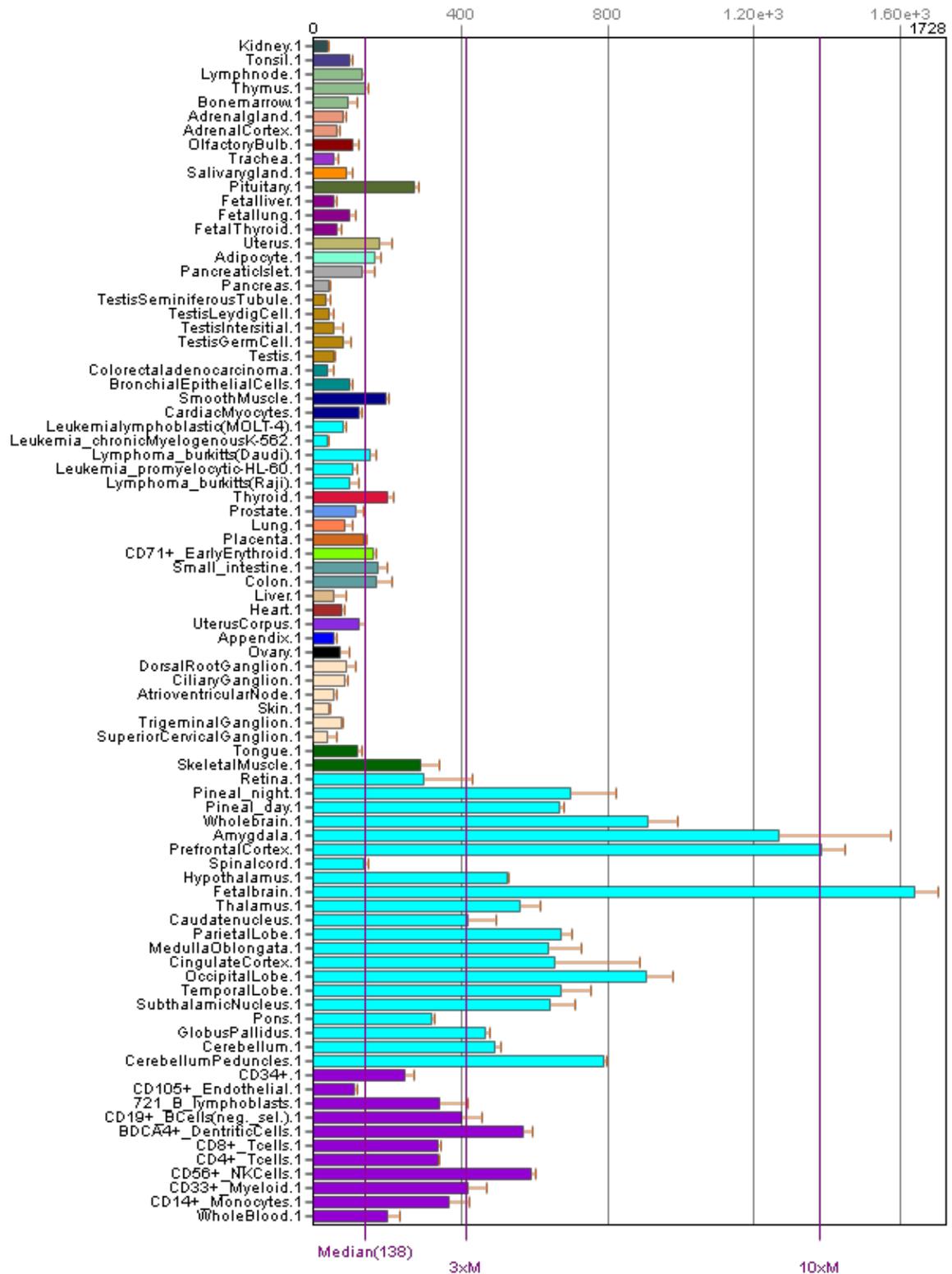


Abb. 14: mRNA-Expressionsmuster human Calcineurin A beta. (PPP3CB)

Beispiel des Gewebe-spezifischen mRNA-Expressionsmusters der humanen Calcineurin A β -Isoform, basierend auf dem Dataset: GeneAtlas U133A, gcma und dem Probeset: 209817_at, welches mit Hilfe von biogps.org ausgewertet wurde.

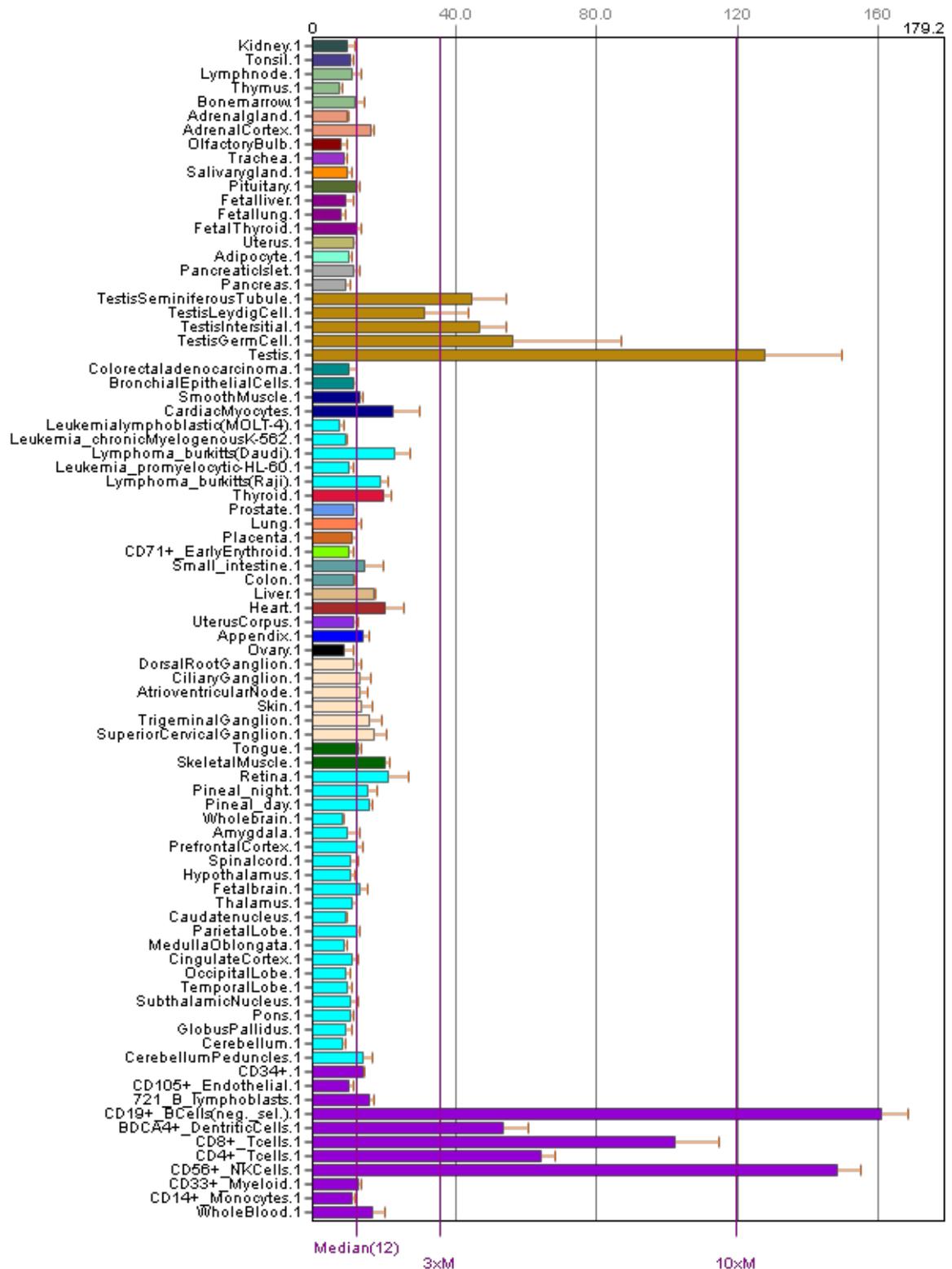


Abb. 15: mRNA-Expressionsmuster human Calcineurin A gamma. (PPP3CC)

Beispiel des Gewebe-spezifischen mRNA-Expressionsmusters der humanen Calcineurin A γ -Isoform, basierend auf dem Dataset: GeneAtlas U133A, gcrma und dem Probeset: 32541_at, welches mit Hilfe von biogps.org ausgewertet wurde.

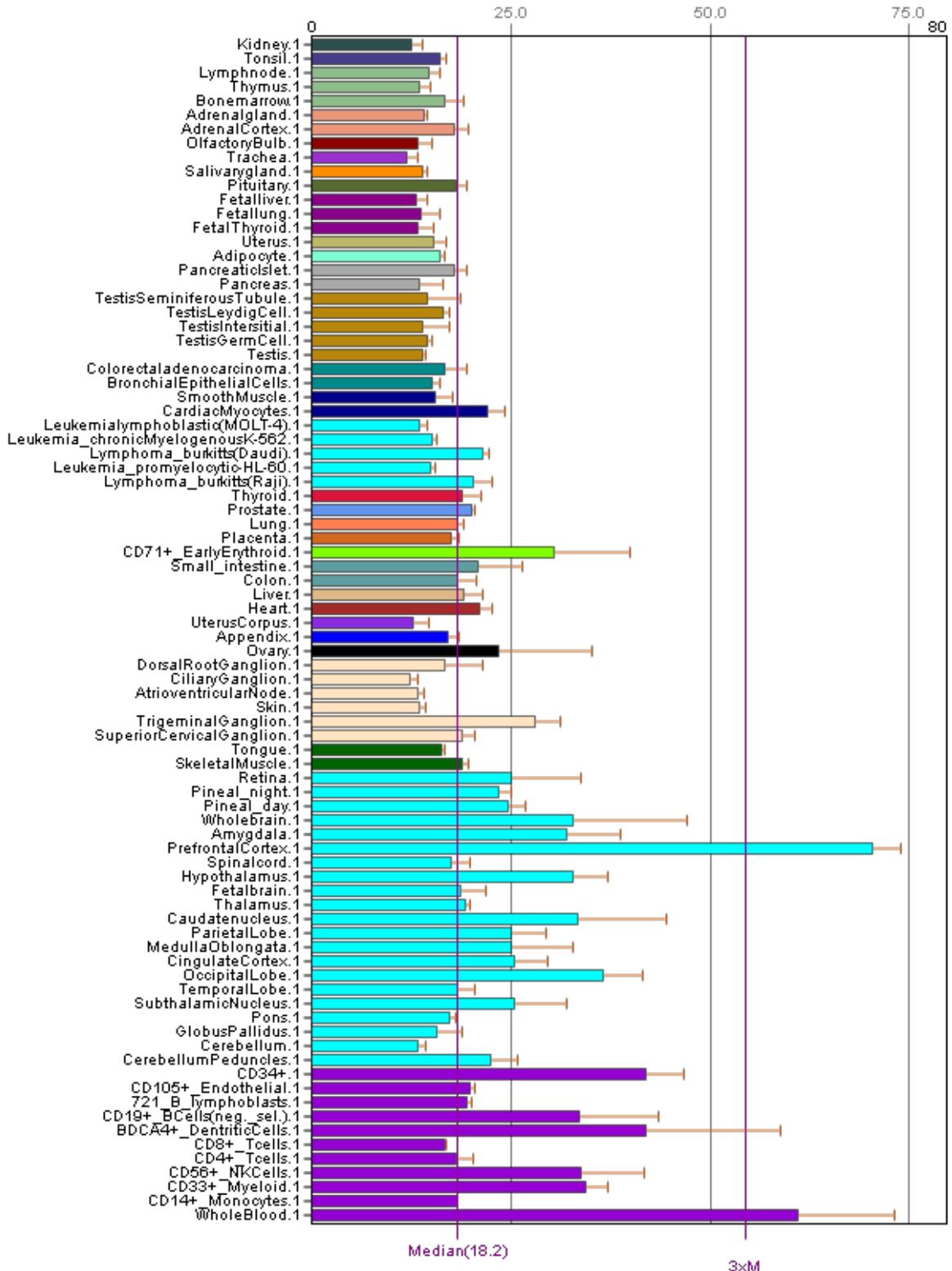


Abb. 16: mRNA-Expressionsmuster human Calcineurin B Isoform 1. (PPP3R1)

Beispiel des Gewebe-spezifischen mRNA-Expressionsmusters der humanen Calcineurin B Isoform 1, basierend auf dem Dataset: GeneAtlas U133A, gcma und dem Probeset: 204507_s_at, welches mit Hilfe von biogps.org ausgewertet wurde.

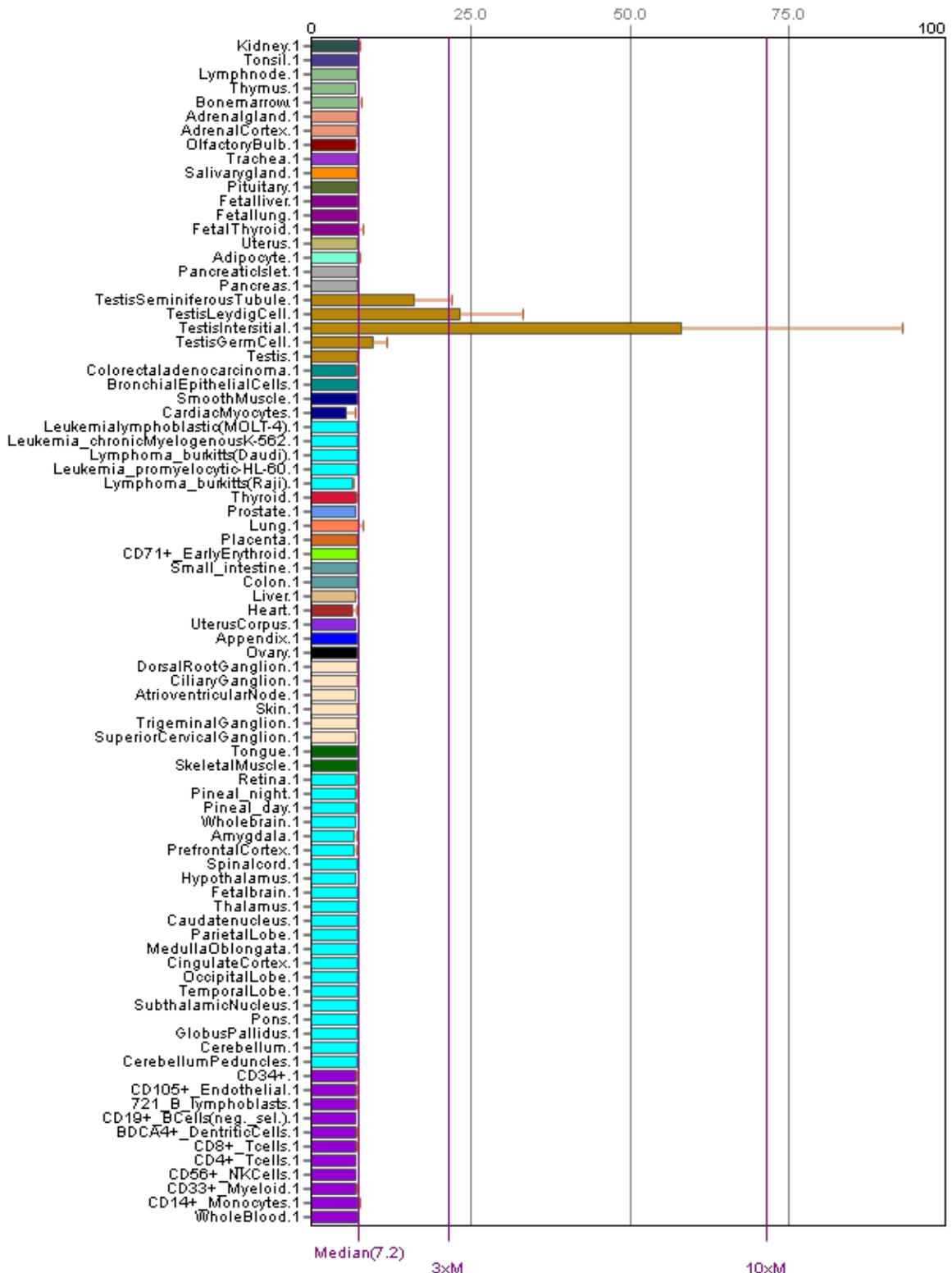


Abb. 17: mRNA-Expressionsmuster human Calcineurin B Isoform 2. (PPP3R2)

Beispiel des Gewebe-spezifischen mRNA-Expressionsmusters der humanen Calcineurin B Isoform 2 basierend auf dem Dataset: GeneAtlas U133A, gcrma und dem Probeset: gnf1h05168_s_at, welches mit Hilfe von biogps.org ausgewertet wurde.

		1	10	20	30	40	56	Section 1
human CaN A alpha	(1)	-----MSEPKAIDFKLSTTORVVKAVFFPPSHRLTAKEVFDNDGKPRVDL						
human CaN A beta	(1)	MAAPFPARAAPPAPPPPPPPPPGAGNWKAVFPPPTQRLTKEVFDNDGKPRVDL						
human CaN A gamma	(1)	-----MSERRFHLSSTTORVVKAVFFPPPTQRLTKEVFEENG-KPKVDV						
Consensus	(1)	P A P LSTTORVVKAVFFPPPTQRLTAKEVFDNDGKPRVDL						
								Section 2
human CaN A alpha	(57)	57	70	80	90	100	112	
human CaN A beta	(48)	AHLVKEGRLEESVALRIITGASFLRQEKNLDDIDAPVTVCGDHIGQFFDLMKLF						
human CaN A gamma	(57)	NHLVKEGRVDEETALRIINEGAAILRREKTMIEVDAPITVCGDHIGQFFDLMKLF						
Consensus	(44)	NHLVKEGRLEESVALRIINEGAAFLRQEKTMIEVDAPITVCGDHIGQFFDLMKLF						
								Section 3
human CaN A alpha	(113)	113	120	130	140	150	168	
human CaN A beta	(104)	VGGSPANTRYLFLGDYVDRGYFSIECVLYLWALKILYKTLFLLRGNHECRHLT						
human CaN A gamma	(113)	VGGSPANTRYLFLGDYVDRGYFSIECVLYLWVLLKILYKTLFLLRGNHECRHLT						
Consensus	(100)	VGGSPANTRYLFLGDYVDRGYFSIECVLYLWALKILYKTLFLLRGNHECRHLT						
								Section 4
human CaN A alpha	(169)	169	180	190	200	210	224	
human CaN A beta	(160)	FTFKQECKIKYSERVYDACMEAFDCLPLAALLNQQFLCVHGGISPEINFLDDIRKL						
human CaN A gamma	(169)	FTFKQECKIKYSERVYDACMEAFDCLPLAALLNQQFLCVHGGISPEIHTLDDIRKL						
Consensus	(169)	FTFKQECKIKYSERVYDACMEAFDCLPLAALLNQQFLCVHGGISPEITLDDIRKL						
								Section 5
human CaN A alpha	(225)	225	230	240	250	260	270	280
human CaN A beta	(216)	DRFKEPPAFGPMCDLLWSDPSEDVFNKETSQEHFTHNTVRGCSYFYSYPAVCEFLQ						
human CaN A gamma	(225)	DRFKEPPAFGPMCDLLWSDPSEDVFNKETSQEHFTHNTVRGCSYFYSYPAVCEFLQ						
Consensus	(212)	DRFKEPPAFGPMCDLLWSDPSEDVFNKETSLEHYTHNTVRGCSYFYSYPAVCEFLQ						
								Section 6
human CaN A alpha	(281)	281	290	300	310	320	336	
human CaN A beta	(272)	NNLLSILRAHEAQDAGYRMYRKSQTGFPPLITIFSAPNYLDVYNNKAAVLKYENN						
human CaN A gamma	(281)	NNLLSILRAHEAQDAGYRMYRKSQTGFPPLITIFSAPNYLDVYNNKAAVLKYENN						
Consensus	(281)	NNLLSILRAHEAQDAGYRMYRKSQTGFPPLITIFSAPNYLDVYNNKAAVLKYENN						
								Section 7
human CaN A alpha	(337)	337	350	360	370	380	392	
human CaN A beta	(328)	VMNIRQFNCSPPHYWLPNFMVDVFTWVSLPFVGEKVTMLVNVLSICSDDELISGEEG						
human CaN A gamma	(337)	VMNIRQFNCSPPHYWLPNFMVDVFTWVSLPFVGEKVTMLVNVLSICSDDELISGEEG						
Consensus	(324)	VMNIRQFNCSPPHYWLPNFMVDVFTWVSLPFVGEKVTMLVNVLSICSDDELIS--DD						
								Section 8
human CaN A alpha	(393)	393	400	410	420	430	448	
human CaN A beta	(384)	FDGATAAARKEVIRNKIRAIGKMARVFSVLRRESESVLTLKGLTPTGMLPSGVL						
human CaN A gamma	(393)	QFDGAAARKEVIRNKIRAIGKMARVFSVLRRESESVLTLKGLTPTGMLPSGVL						
Consensus	(378)	EADGSTTVRKEVIRNKIRAIGKMARVFSVLRRESESVLTLKGLTPTGMLPSGVL						
								Section 9
human CaN A alpha	(449)	449	460	470	480	490	504	
human CaN A beta	(449)	RKDTLQASLTVETRAERLALGPRDQKLTSEERRKGLDRINERMPDPRDMLPSD						
								Section 10
human CaN A alpha	(505)	505	510	520	530			
human CaN A beta	(496)	LNSENKALISETNGTDSNGSNSSNIQ						
human CaN A gamma	(504)	LNSENKALISETNGTDSNGSNSSNIQ						

Abb. 18: Alignment der Aminosäure-Sequenz der humanen Calcineurin A Untereinheit.

Die Aminosäure-Sequenzen der drei humanen Isoformen der Calcineurin A Untereinheit wurden *in silico* miteinander verglichen (Legende: **identisch**, **konserviert**, **ähnlich**).

		Section 1							
		1	10	20	30	40	59		
human CaN B isoform 2	(1)	GNEASYE	AEMCSHF	ND EIKRLG	RFKKLDLD	KSGLSVVEE	FMSLP	ELRH NPLVRRVID	
human CaN B isoform 1	(1)	GNEASTL	EMCSHF	AD EIKRLG	RFKKLDLD	KSGLSVVEE	FMSLP	ELQQNPLVQRVID	
Consensus	(1)	GNEASYP	EMCSHF	DEIKRLG	KRFKKLDLD	SGSLSVVEE	FMSLP	EL NPLV RVID	
		Section 2							
		60	70	80	90	100	118		
human CaN B isoform 2	(60)	VFDTDG	DGEVDFKEFI	LGT SQFSV	KGD E EQKLR	FAF S IYDM	KDGYIS	NGELFQV	LKMM
human CaN B isoform 1	(60)	IFDIDG	NGEVDFKEFI	EGV SQFSV	KGD K EQKLR	FAF R IYDM	KDGYIS	NGELFQV	LKMM
Consensus	(60)	IFDTDG	GEVDFKEFI	G SQFSV	KGD EQKLR	FAF IYDM	KDGYIS	NGELFQV	LKMM
		Section 3							
		119	130	140	150	160			

Abb. 19: Alignment der Aminosäuresequenz der humanen Calcineurin B Untereinheit.

Die Aminosäure-Sequenzen der drei humanen Isoformen der Calcineurin B Untereinheit wurden *in silico* miteinander verglichen (Legende: **identisch**, **konserviert**, **ähnlich**).

Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt meinem ehemaligen Chef und Leiter der Max-Planck-Forschungsstelle für Enzymologie der Proteinfaltung in Halle, Prof. em. Gunther Fischer. Er gewährte mir über viele Jahre den erforderlichen Freiraum, um meine Vorstellungen und Ideen zu verwirklichen und überließ mir das spannende Forschungsfeld rund um die Proteinphosphatase Calcineurin.

Gleichzeitig bedanke ich mich bei allen ehemaligen Mitarbeitern der Forschungsstelle für die angenehme und produktive Zeit. Dabei möchte ich besonders Frau Martina Heidler für ihre hervorragende technische Assistenz und Dr. Matthias Weiwad für die regen Diskussionen über enzymologische Fragestellungen erwähnen.

Zu Dr. Yxin Zhang (*Bcube*, TU Dresden) hat sich über viele Jahre hinweg aus einer intensiven wissenschaftlichen Zusammenarbeit eine kollegiale Freundschaft entwickelt. Er war und ist für mich der Meister der Cyclosporin-Chemie. So entwickelte er im Laufe der Zeit viele knifflige Synthesestrategien bzw. präparierte zahlreiche Derivate für mich. Viele Projekte wären ohne ihn nicht möglich gewesen.

Prof. Jun O. Liu (Harvard Medical School, Boston) hat bei mir das Interesse an Calcineurin geweckt und mich ideell und materiell unterstützt.

Prof. Andreas Radbruch hat mir ermöglicht, am Deutschen Rheuma Forschungszentrum in Berlin mehrere Forschungsaufenthalte zu verbringen. Speziell in der Arbeitsgruppe Signaltransduktion von Prof. Ria Baumgraß konnte ich einige besondere Techniken kennenlernen. Dafür möchte ich mich bei beiden bedanken.

Der Arbeitsgruppe von Prof. Jürgen Liebscher und Dr. Matthias Pätzelt (Humboldt-Universität Berlin) danke ich für die im Rahmen eines gemeinsamen Projektes zur Verfügung gestellten umfangreichen Substanzbibliotheken.

Dr. Charlott Platzer unterstützte mich mit der Durchführung des *Molecular modeling/docking* und den Computer-gestützten Simulationen.

Auch allen von mir betreuten Diplomanden und Doktoranden möchte ich auf diesem Wege für ihre Unterstützung meinen Dank aussprechen.

Bei den Mitarbeiter des Instituts für Pharmazie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg bedanke ich mich für die überaus freundliche und kollegiale Aufnahme und die fortwährende Unterstützung bei der Weiterführung meiner Arbeiten bzw. der Eröffnung neuer gemeinsamer Forschungsfelder. Dabei möchte ich speziell die Arbeitsgruppen von Prof. Wolfgang Sippl und PD Dr. Matthias Schmidt hervorheben.

Selbstverständlich erhebt diese kleine Danksagung keinen Anspruch auf Vollständigkeit. Es gibt viele Personen, denen ich zu Dank verpflichtet bin, die direkt oder indirekt zum Gelingen der Arbeiten und zu meiner wissenschaftlichen Entwicklung beigetragen haben, hier aber nicht explizit genannt wurden.

Am meisten möchte ich mich jedoch bei meiner Familie bedanken, die mich über die Jahre fortwährend mental und emotional unterstützt hat. Auch in schwierigen Zeiten gab sie mir stets die Kraft, Herausforderungen zu meistern und Lösungen zu finden.

Lebenslauf

Name: Dr. rer. nat. Frank Erdmann
geboren am: 30.08.1971 in Merseburg

akademische Bildung:

09/1993 bis 07/1998 Studium der Biochemie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

07/1997 bis 07/1998 Anfertigung einer Diplomarbeit mit dem Thema:
„Identifizierung endogener Liganden von humanen Cyclophilinen mit Hilfe affinitätschromatographischer und massenspektrometrischer Techniken“
in der Max-Planck-Forschungsstelle für Enzymologie der Proteinfaltung (PD Dr. Gerd Küllertz)

09/1998 bis 03/2003 Anfertigung einer Dissertation mit dem Thema:
„Identifizierung und biochemische Charakterisierung neuer Calcineurin-Inhibitoren“ in der Forschungsstelle für Enzymologie der Proteinfaltung der Max-Planck-Gesellschaft in Halle (Prof. Dr. Gunther Fischer)

09/2006 bis 08/2009 Studium der Pharmazie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

12/2010 Approbation als Apotheker

berufliche Tätigkeit:

- 09/1998 bis 02/2003 Wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Max-Planck-Forschungsstelle für Enzymologie der Proteinfaltung in Halle
- 08/2000 bis 03/2002 Hospitant am Deutschen Rheuma Forschungszentrum Berlin (Arbeitsgruppe Signaltransduktion von Prof. Ria Baumgraß)
- 03/2003 bis 04/2011 Arbeitsgruppenleiter der Abt. Zellbiologie in der Forschungsstelle für Enzymologie der Proteinfaltung der Max-Planck-Gesellschaft in Halle
- 05/2011 bis 08/2012 Filialleiter in einer öffentlichen Apotheke
- 09/2012 bis 08/2015 Vertretungsprofessor für Experimentelle Pharmakologie am Institut für Pharmazie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- seit 09/2015 Arbeitsgruppenleiter in der Abt. Pharmakologie und Toxikologie für Naturwissenschaftler am Institut für Pharmazie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Mitgliedschaften:

- Deutsche Gesellschaft für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie (DGP)
- Deutsche Pharmazeutische Gesellschaft (DPhG)

Mitglied im Editorial Board von *Amino Acids*

Reviewer-Tätigkeit für:

- *Amino Acids*
- *Molecular Biosystems*
- *Proteomics*
- *Biomolecular Concepts*
- *Biochemical Pharmacology*
- *Medical Science Monitor*

Eigenständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Arbeit von mir selbstständig und ohne fremde Hilfe angefertigt wurde. Es wurden keine anderen als die aufgeführten Quellen und Hilfsmittel benutzt bzw. die den verwendeten fremden Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen auch als solche kenntlich gemacht.

Zusätzlich erkläre ich, dass ich mich mit der vorliegenden Habilitation erstmals um die Erlangung dieses Titels bewerbe. Die vorliegende Arbeit ist weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Habilitation oder eines anderen gleichwertigen Prüfungsverfahrens vorgelegt worden.

Halle (Saale),

Dr. Frank Erdmann