

Deutsches Rheumaforschungszentrum Berlin  
Arbeitsgruppe Signaltransduktion

---

## **Modulatoren des Calcineurin-NFATc-Signalweges in humanen T<sub>H</sub>-Zellen**

Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades  
"doctor rerum naturalium"  
(Dr. rer. nat.)  
in der Wissenschaftsdisziplin Molekularbiologie

eingereicht an der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Universität Potsdam

von  
Matthias Sieber

Potsdam, den 17.02.2010

Online veröffentlicht auf dem  
Publikationsserver der Universität Potsdam:  
URL <http://opus.kobv.de/ubp/volltexte/2010/4467/>  
URN <urn:nbn:de:kobv:517-opus-44676>  
<http://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:kobv:517-opus-44676>

Any sufficiently advanced technology is indistinguishable from magic.

*– Arthur C. Clarke*

Any sufficiently analyzed magic is indistinguishable from science!

*– Agatha Heterodyne*



## Abstract

The  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin dependent serine/threonine phosphatase calcineurin is a key molecule in the T cell receptor dependent signalling network. Calcineurin dephosphorylates and thereby activates the transcription factors of the NFATc family that, among others, control the expression of important cytokines and cell surface molecules. The activity of Calcineurin is modulated by several endogenous proteins and is inhibited by the immunosuppressants cyclosporine A and FK506.

Here, the novel low molecular weight inhibitor NCI3 was characterized in respect to its effects on T cell receptor dependent signalling. The results of this work show, that the pyrazolopyrimidine derivate NCI3 is nontoxic and permeates the cell membrane. Upon TCR stimulation NCI3 suppresses T cell proliferation and IL-2 production of primary human  $T_H$  cells with  $\text{IC}_{50}$  values of  $\sim 4 \mu\text{M}$  by blocking the dephosphorylation and subsequent nuclear translocation of NFATc. NCI3 consequently inhibits calcineurin dependent NFAT- and NF- $\kappa$ B-, but not AP-1-controlled reporter gene expression, in micromolar concentrations ( $\text{IC}_{50}$  values 2 and 7  $\mu\text{M}$ , respectively). In opposite to cyclosporine A and FK506, NCI3 does not interfere with the phosphatase activity of calcineurin but rather disturbs the calcineurin-NFATc interaction.

A major endogenous modulator of calcineurin is the protein RCAN1, which is supposed to regulate calcineurin-NFATc signalling in a negative feedback loop.

The presented data show that RCAN1 is expressed in human  $T_H$  cells. The splice variant RCAN1-1 is basally expressed in resting T cells, and its expression levels are not changed by T cell receptor stimulation. Expression of RCAN1-4, on the other hand, is nearly undetectable in resting  $T_H$  cells and is induced upon cell stimulation. By using calcineurin-NFATc specific inhibitors such as NCI3 it could be shown that RCAN1-4 induction is limited by this pathway.

This work provides a comprehensive characterization of the novel inhibitor NCI3 and insights into the regulation of calcineurin by RCAN1 in human  $T_H$  cells.

## Zusammenfassung

Die  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-aktivierte Serin/Threonin-Phosphatase Calcineurin ist ein Schlüsselmolekül des T-Zell-Rezeptorabhängigen Signalnetzwerkes. Calcineurin aktiviert die Transkriptionsfaktoren der NFATc-Familie durch Dephosphorylierung und reguliert darüber die Expression wichtiger Zytokine und Oberflächenproteine. Die Aktivität von Calcineurin wird durch zahlreiche endogene Proteine moduliert und ist Angriffspunkt der immunsuppressiven Substanzen Cyclosporin A und FK506.

In dieser Arbeit wurde der alternative niedermolekulare Calcineurin-NFATc-Inhibitor NCI3 hinsichtlich seiner Effekte auf T-Zell-Rezeptor-abhängige Signalwege charakterisiert. Die Ergebnisse zeigen, daß das Pyrazolopyrimidinderivat NCI3 nichttoxisch und zellmembranpermeabel ist. In T-Zell-Rezeptor-stimulierten primären humanen  $\text{T}_\text{H}$ -Zellen unterdrückt NCI3 die Proliferation und IL-2-Produktion ( $\text{IC}_{50}$ -Wert  $\sim 4 \mu\text{M}$ ), da die Dephosphorylierung von NFATc und die anschließende nukleäre Translokation gehemmt wird. NCI3 inhibiert die calcineurinabhängige NFAT- und NF- $\kappa\text{B}$ -, aber nicht die AP-1-kontrollierte Reprtergenexpression, in mikromolaren Konzentrationen ( $\text{IC}_{50}$ -Werte 2 bzw.  $7 \mu\text{M}$ ). Im Gegensatz zu Cyclosporin A stört NCI3 nicht die Phosphataseaktivität von Calcineurin, sondern interferiert mit der Calcineurin-NFATc-Bindung.

Ein wichtiges endogenes Modulatorprotein für die Calcineurinaktivität ist RCAN1, das vermutlich den Calcineurin-NFATc-Signalweg über einen negativen Rückkopplungsmechanismus reguliert.

Hier wurde gezeigt, daß RCAN1 in humanen  $\text{T}_\text{H}$ -Zellen exprimiert wird. Die Spleißvariante RCAN1-1 ist in ruhenden T-Zellen basal exprimiert und wird nicht durch T-Zell-Rezeptor-Stimulierung in seiner Expression verändert. RCAN1-4 dagegen ist in ruhenden Zellen kaum zu detektieren und wird stimulationsabhängig induziert. Durch die Verwendung Calcineurin-NFATc-spezifischer Inhibitoren wie NCI3 wurde gezeigt, daß die RCAN1-4-Induktion durch diesen Signalweg limitiert ist.

Die in dieser Arbeit gewonnenen Daten und Erkenntnisse tragen dazu bei, das Verständnis der Funktion und Regulation von Calcineurin in T-Zellen zu vertiefen.

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Die Rolle der T<sub>H</sub>-Zellen im Immunsystem des Menschen.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2</b>	<b>Calcineurin und T-Zellrezeptor-vermittelte Signalwege.....</b>	<b>2</b>
1.2.1	T-Zell-Rezeptor-vermittelte Signalwege	2
1.2.2	Calcineurin	4
1.2.3	Der Transkriptionsfaktor NFATc	6
1.2.4	Der Transkriptionsfaktor NF-κB	9
1.2.5	Der Transkriptionsfaktor AP-1	10
<b>1.3</b>	<b>CsA und FK506 – die „klassischen“ Calcineurin-Inhibitoren.....</b>	<b>11</b>
1.3.1	Die Immunsuppressiva CsA und FK506	11
1.3.2	Die Immunophiline	12
1.3.3	Die inhibitorische Wirkung von CsA und FK506	13
<b>1.4</b>	<b>RCAN1 – ein endogener Modulator des Calcineurin-NFATc-Signalweges.....</b>	<b>15</b>
1.4.1	Die Calcipressine	15
1.4.2	Das Calcipressin RCAN1	16
1.4.3	Andere Calcipressine	18
<b>2</b>	<b>ZIELSTELLUNG .....</b>	<b>19</b>
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>20</b>
<b>3.1</b>	<b>Charakterisierung des niedermolekularen Calcineurin-NFATc-Inhibitors NCI3....</b>	<b>20</b>
3.1.1	NCI3 inhibiert die Zytokinproduktion und Proliferation primärer T <sub>H</sub> -Zellen	20
3.1.2	NCI3 inhibiert die NFATc- und NF-κB-abhängige Reportergenexpression in transfizierten Jurkat-T-Zellen	22
3.1.3	NCI3 inhibiert die Dephosphorylierung von NFATc2 in stimulierten T-Zellen, aber nicht in Zellextrakten	24
3.1.4	NCI3 wirkt nicht über verstärkte Aktivierung von Kinasen	25
3.1.5	Die Überexpression von Calcineurin verringert den inhibitorischen Effekt von NCI3	27
<b>3.2</b>	<b>Untersuchungen zur Expression der endogenen Calcineurin-Inhibitoren RCAN1 und Carabin in T<sub>H</sub>-Zellen.....</b>	<b>29</b>
3.2.1	RCAN1 wird in T-Zellen exprimiert, die RNA-Expressionsmenge ist stimulierungsabhängig	29

3.2.2	Die Spleißvariante RCAN1-1 wird stimulierungsunabhängig exprimiert	30
3.2.3	Die Expression der Spleißvariante RCAN1-4 wird durch Stimulierung induziert	31
3.2.4	Die Expression der Spleißvariante RCAN1-4 ist Calcineurin/NFATc-abhängig	33
3.2.5	Die Expression des endogenen Calcineurininhibitors Carabin in T <sub>H</sub> -Zellen ist stimulierungsunabhängig	37
<b>4</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>39</b>
<b>4.1</b>	<b>Der niedermolekulare Calcineurin-NFATc-Inhibitor NCI3 .....</b>	<b>39</b>
4.1.1	Wirkt NCI3 über Calcineurin?	39
4.1.2	Ist NCI3 eine mögliche Alternative zu CsA?	45
<b>4.2</b>	<b>Die Regulation der RCAN1-Expression in humanen T<sub>H</sub>-Zellen.....</b>	<b>48</b>
<b>4.3</b>	<b>Schlußfolgerung .....</b>	<b>54</b>
<b>5</b>	<b>MATERIAL &amp; METHODEN .....</b>	<b>55</b>
<b>5.1</b>	<b>Zellbiologische Methoden .....</b>	<b>55</b>
5.1.1	Zellen, Zelllinien und Medien	55
5.1.2	Kultivierung der Zellen	55
5.1.3	Gewinnung von PBMC	56
5.1.4	Magnetische Zellsortierung (MACS)	56
5.1.5	Durchflußzytometrie und Fluoreszenzaktivierte Zellsortierung (FACS)	57
5.1.6	Zellstimulierung	58
5.1.7	Bestimmung der Zellproliferation	58
5.1.8	Bestimmung der IL-2-Expression von CD4 <sup>+</sup> T-Zellen	59
5.1.9	Plasmidtransfektion von Jurkat-T-Zellen und Reportergenassay	59
5.1.10	Inhibitoren	60
<b>5.2</b>	<b>Molekularbiologische Methoden .....</b>	<b>60</b>
5.2.1	Bakterientransfektion, Bakterienkultur und Plasmidpräparation	60
5.2.2	Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen	61
5.2.3	SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (PAGE) und Western blot	62
5.2.4	Dephosphorylierungsassay	62
5.2.5	Phosphorylierungsassay	63
5.2.6	Oligo-Nukleotide	63
5.2.7	PCR	64
5.2.8	Expressionsplasmide	65
5.2.9	Genexpressionsanalyse mittels quantitativer real-time-PCR	65



<b>6</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>67</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>69</b>
<b>8</b>	<b>PUBLIKATIONSLISTE .....</b>	<b>79</b>



## 1 Einleitung

Die calciumabhängige Serin/Threonin-Proteinphosphatase Calcineurin ist ein Schlüsselfaktor einer Vielzahl zellulärer Signalprozesse, insbesondere in Immun-, Nerven- und Muskelzellen. Die am besten studierte Funktion von Calcineurin ist seine entscheidende Rolle in der Signaltransduktion der T-Zell-Aktivierung. Calcineurin ist Angriffspunkt wichtiger immunsuppressiver Substanzen, deren Anwendung die Transplantationsmedizin revolutionierte. Wegen seiner zentralen Funktion unterliegt die Aktivität von Calcineurin einer strengen zellulären Kontrolle, nicht nur durch den zytosolischen Calciumspiegel, sondern auch durch eine Vielzahl von interagierenden Proteinen. Diese modulieren die enzymatische Aktivität und die Lokalisierung von Calcineurin und regulieren damit calcineurinabhängige Prozesse.

### 1.1 Die Rolle der T<sub>H</sub>-Zellen im Immunsystem des Menschen

Das Immunsystem des Menschen ist ein Netzwerk spezialisierter Moleküle, Zellen und Organe, das Fremdstoffe und Krankheitserreger erkennt und bekämpft sowie infizierte und abnormale Zellen beseitigen kann. Die Zellen des Immunsystems kommunizieren über rezeptorvermittelte Zell-Zell-Kontakte und über kleine sekretierte Proteine, die Zytokine, miteinander und ihrer Umgebung. Zu den Immunzellen (Leukozyten) gehören Makrophagen und dendritische Zellen (DCs), B-Zellen und T-Zellen. Makrophagen und DCs nehmen Pathogene und körperfremde Moleküle auf, prozessieren und präsentieren sie (gebunden an spezielle Membranproteinkomplexe, die MHC II) als Antigene auf ihrer Zelloberfläche, weshalb sie zu den professionellen antigenpräsentierenden Zellen (APC) gezählt werden. T-Zellen binden mit ihrem antigenspezifischen T-Zell-Rezeptor (TCR) den Antigen-MHC-Komplex, gehen weitere Zell-Zell-Kontakte mit kostimulatorischen Molekülen auf den APCs ein und werden dadurch aktiviert. Die aktivierten T-Zellen proliferieren und produzieren spezielle Oberflächenproteine und Zytokine. Zu den T-Zellen gehören zytotoxische T-Zellen (T<sub>C</sub>), die das Oberflächenprotein CD8 exprimieren, und T-Helfer-(T<sub>H</sub>)-Zellen, die CD4 exprimieren. Aktivierte T<sub>C</sub>-Zellen können Zellen, die auf ihrem MHC I-Molekül abnormale Antigene präsentieren und damit als infiziert,

körperfremd oder entartet erkannt werden, abtöten. Die Hauptfunktion der T<sub>H</sub>-Zellen dagegen ist die Aktivierung von B-Zellen, die daraufhin mit der Zellteilung beginnen und spezifische Antikörper gegen das jeweilige Antigen erzeugen. Außerdem aktivieren sie die Makrophagen, die daraufhin aufgenommene Pathogene zerstören und ihre APC-Funktion intensivieren. T<sub>H</sub>-Zellen unterteilen sich in verschiedene Subpopulationen mit spezialisierten Funktionen. Das System aus T- und B-Zellen trägt eine antigenspezifische Immunantwort und hat eine immunologische Gedächtnisfunktion. Es wird daher das adaptive Immunsystem genannt.

Durch die zentrale Rolle der T-Zellen im adaptiven Immunsystem stellt die Aktivität dieser Zellen einen guten Angriffspunkt dar, diesen Teil des Immunsystems zu modulieren. Vor allem bei Transplantationen, also dem Einbringen körperfremden Gewebes in den Organismus, und bei Autoimmunkrankheiten, wenn sich das Immunsystem fälschlicherweise gegen gesunde, körpereigene Zellen wendet, kann eine Inhibierung der T-Zellen und damit des adaptiven Immunsystems nötig sein [1].

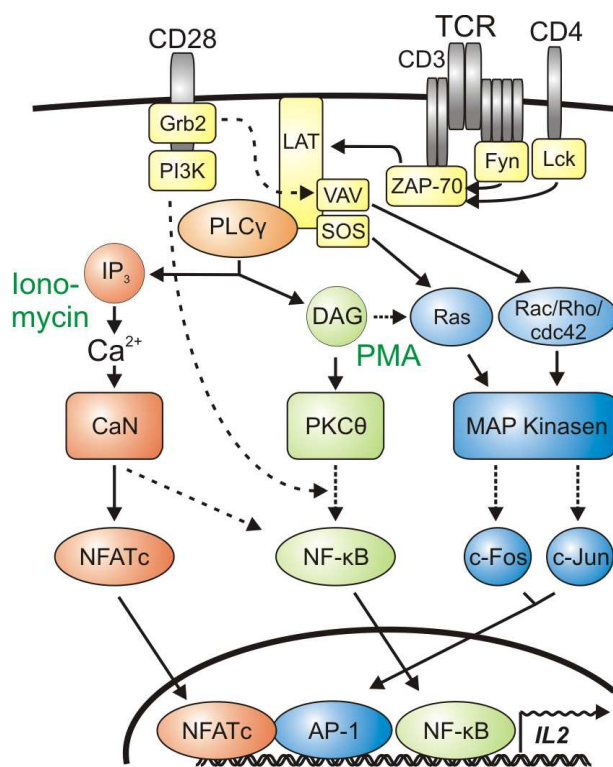
## **1.2 Calcineurin und T-Zellrezeptor-vermittelte Signalwege**

### **1.2.1 T-Zell-Rezeptor-vermittelte Signalwege**

Der T-Zell-Rezeptor (TCR) besteht in den meisten T-Zellen aus einem transmembranen  $\alpha/\beta$ -Heterodimer, das den variablen und damit antigenspezifischen Teil des Rezeptors darstellt. Das TCR-Dimer komplexiert mit weiteren Transmembranproteinen, den CD3-Ketten-Heterodimeren  $\gamma\epsilon$  und  $\delta\epsilon$  und einem  $\zeta\zeta$ -Homodimer [1]. Die kostimulatorischen Moleküle CD4 (T<sub>H</sub>-Zellen) oder CD8 (T<sub>C</sub>-Zellen) sind mit dem TCR-Komplex assoziiert und bestimmen, ob dieser entweder MHC II- oder MHC I-gebundene Peptide erkennt, die von den APCs präsentiert werden. Gleichzeitig verstärkt die Bindung von kostimulatorischen Proteinen an den MHC-Komplex das TCR-Signal.

Weitere kostimulatorische Rezeptoren der T-Zelle können durch Bindung an die Liganden CD80 und CD86 auf der APC-Zellmembran aktiviert werden. Der prominenteste kostimulatorische Rezeptor ist CD28, seine Aktivierung synergisiert mit den TCR-Signalen und verstärkt die Proliferation und Zytokinproduktion der T-Zelle [2, 3].

Die intrazellulären Domänen des TCR sind reich an ITAMs (*immunoreceptor tyrosine based activation motifs*), deren Tyrosinreste in ruhenden Zellen dephosphoryliert vorliegen. Die Kreuzvernetzung mehrerer TCRs, die durch Bindung an die passenden Peptid-MHC-Komplexe verursacht wird, führt zur Rekrutierung der Tyrosinphosphatase CD45 an den TCR-Komplex. CD45 entfernt die inhibitorischen Phosphatreste von den Protein-Tyrosin-Kinasen (PTK) Lck und Fyn, die daraufhin die ITAMs des TCR phosphorylieren können. Dies führt zur Rekrutierung der PTK Zap-70 an die Phospho-ITAMs, wo sie mittels anschließender Phosphorylierung durch Lck aktiviert wird. Die Aktivierung von Zap-70 löst eine weitere Signalkette aus, die über das Transmembranprotein *linker of activated T-cells* (LAT) verläuft und durch kostimulatorische Signale verstärkt wird. Zusammen mit anderen Signalproteinen aktiviert LAT die Phospholipase C gamma (PLC $\gamma$ ). Diese hydrolysiert das Zellmembranlipid Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP $_2$ ) zu Diacylglycerol (DAG) und Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP $_3$ ). Diese sekundären Botenstoffe lösen wichtige Signalkaskaden aus, die in der Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NFATc und NF- $\kappa$ B sowie der Expression des Transkriptionsfaktorkomplexes AP-1 resultieren (Abb. 1.1). Die Kooperation dieser Transkriptionsfaktoren ist kri-



**Abb 1.1: Vereinfachtes Schema der TCR-abhängigen Signalwege.** Die Ligation des T-Zell Rezeptors (TCR) und der kostimulatorischen Rezeptoren CD4 und CD28 (grau) löst die Aktivierung eines Kinase-Strukturproteine-Komplexes (gelb) aus, wodurch unter anderem PLC $\gamma$  (orange) aktiviert wird. Spezifische Signalwege münden in die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NFATc (rot), NF- $\kappa$ B (grün) und AP-1 (blau). Diese Transkriptionsfaktoren kooperieren für die Regulation der Expression verschiedener Gene miteinander, z. B. des Zytokins IL-2 [7].

In Experimentalmodellen kann die Wirkung von DAG und IP $_3$  und damit die Aktivierung der PLC $\gamma$  durch die Zugabe der Substanzen PMA (Phorbolmyristylacetat) und Ionomycin simuliert werden. Während PMA die DAG-Bindestelle der entsprechenden Proteinkinase besetzt und diese vergleichbar mit DAG aktiviert [8], simuliert Ionomycin den durch IP $_3$  ausgelösten Ca $^{2+}$ -Influx in die Zelle, da es als Ionophor wirkt und divalente Metallkationen durch biologische Membranen transportiert [9].

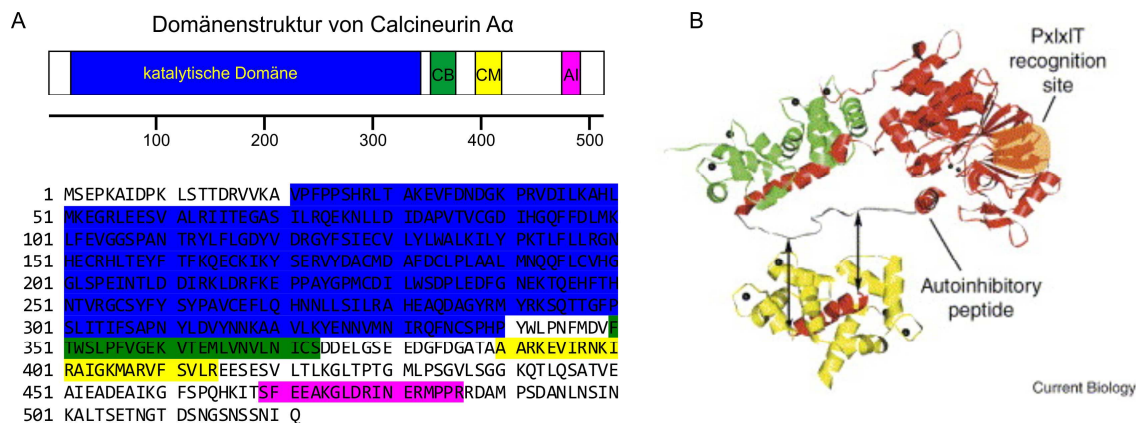
tisch für die T-Zell-Proliferation, -Differenzierung und -Zytokinproduktion, z. B. für die Expression des zellteilungsfördernden Zytokins IL-2 [4-6].

Ein Schlüsselmolekül bei der Aktivierung dieser Transkriptionsfaktoren ist die Proteinphosphatase Calcineurin (CaN, siehe Abb. 1.1).

### 1.2.2 Calcineurin

Calcineurin ist eine ubiquitär exprimierte cytosolische Serin/Threonin(Ser/Thr)-Proteinphosphatase (PP) [10]. Der systematische Name ist PPP3, in der Literatur wird jedoch auch die ältere Bezeichnung PP2B benutzt. Calcineurin gehört zur Familie der PPP-Ser/Thr-Proteinphosphatasen, zusammen mit PP1, 2A, 4, 5 und 6. Enzyme der PPP-Familie ähneln sich sehr in der Struktur ihrer katalytischen Zentren. Die Ser/Thr-Phosphatase PP2C gehört dagegen zur nicht verwandten PPM-Familie und weist mit den anderen genannten Phosphatasen keinerlei Homologien auf [11]. Calcineurin ist in Tieren, Pilzen und Schleimpilzen hochkonserviert [12]. Die Expression von Calcineurin in Pflanzen wird diskutiert: Auch wenn bisher kein Calcineurin A-Homolog in Pflanzen-Genomen identifiziert werden konnte, wurde kürzlich in *N. tabacum* ein Protein mit vergleichbaren Eigenschaften gefunden [13].

Calcineurin besteht aus zwei Untereinheiten – der katalytisch aktiven Untereinheit A (PPP3C, ca. 60 kDa) und der regulatorischen Untereinheit B (PPP3R, ca. 19 kDa). Von der Untereinheit A existieren in Säugern drei Isoformen, von denen in T-Zellen hauptsächlich die Isoform  $\beta$  exprimiert wird [14]. Die drei Isoformen haben das gleiche Substratspektrum, variieren aber in ihren Präferenzen für die einzelnen Substrate [15]. Die Untereinheit A besitzt eine Bindestelle für Calmodulin und eine autoinhibitorische Domäne, die das katalytische Zentrum des Enzyms blockiert (Abb. 1.2). Die regulatorische Untereinheit B ist ein Homolog zu Calmodulin und kann wie dieses Calciumionen über vier EF-Hand-Motive binden. Von der Untereinheit B sind zwei Isoformen bekannt, von denen die Variante 1 ubiquitär exprimiert wird, die Variante 2 nur in Testikeln [16].



**Abb. 1.2: Die Struktur von Calcineurin.** (A) Die Calcineurin-Untereinheit A besitzt neben der katalytischen Domäne (blau) eine Calcineurin B-bindende Domäne (CB, grün), eine Calmodulin-bindende Domäne (CM, gelb) und die autoinhibitorische Domäne (magenta), die im inaktiven Zustand das aktive Zentrum blockiert. Auch die *linker*-Regionen zwischen den Domänen enthalten funktionell wichtige Elemente. Dargestellt ist beispielhaft die Primärsequenz von humanem Calcineurin A $\alpha$ . (B) Aktives Calcineurin ist ein Calcineurin A (rot)/Calcineurin B (grün)/Calmodulin (gelb)-Trimer. Das aktive Zentrum von Calcineurin A enthält Mg<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup> oder Ni<sup>2+</sup>-Ionen (kleine schwarze Punkte). Die Bindung von Ca<sup>2+</sup>-Ionen an Calcineurin B und Calmodulin (im Bild als große schwarze Punkte dargestellt) aktiviert Calcineurin. Die PxlIT-Erkennungsstelle bindet ein konserviertes Motiv vieler Calcineurin-interagierender Proteine (siehe unten). Abbildung nach Hogan & Li 2005 [17].

Die Bindung von Calmodulin und Ca<sup>2+</sup>-Ionen an Calcineurin führt zu einer Konformationsänderung der Untereinheit A, wodurch das aktive Zentrum und Bindestellen für Substratproteine demaskiert werden [18, 19]. Dadurch ist die Calcineurinaktivität an das zytosolische Calciumniveau gekoppelt, was einzigartig unter den Ser/Thr-Proteinphosphatasen ist [20].

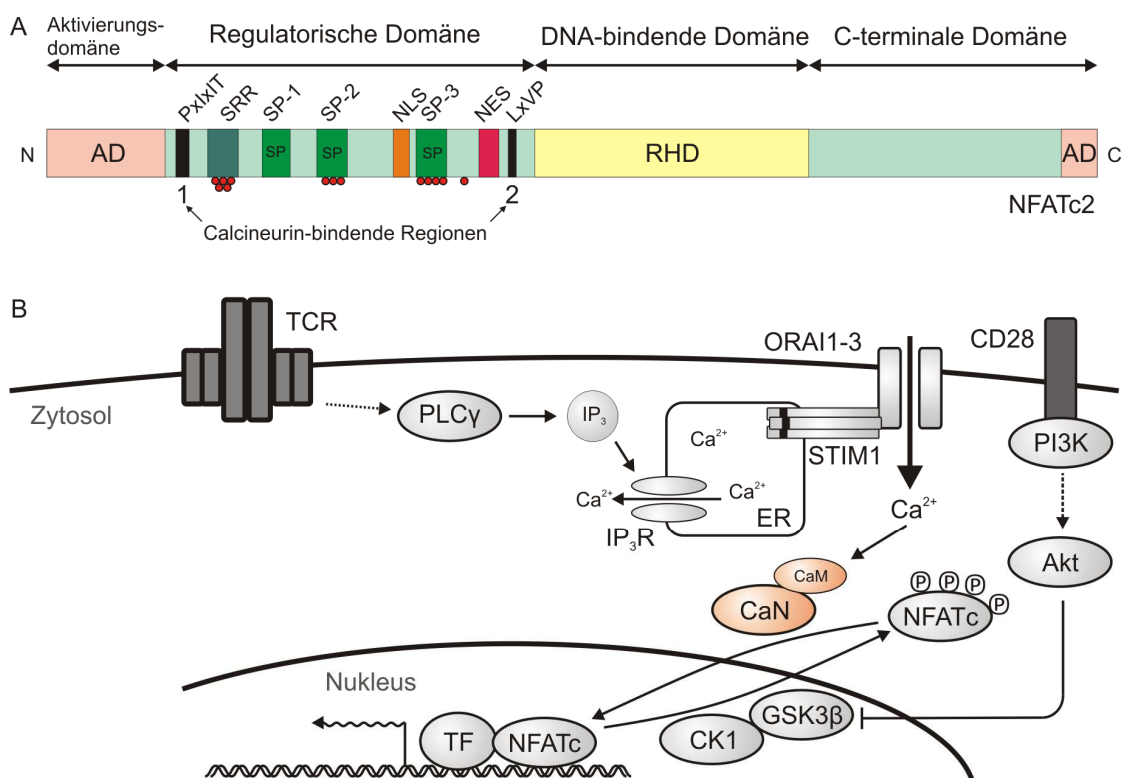
Calcineurin wird in vielen Geweben und Zelltypen exprimiert und hat dort ein breites Funktionsspektrum [21, 22]. Besonders stark ist Calcineurin in Hirngewebe angereichert und stellt dort ca. 1% der Gesamtproteinmasse; dadurch erhielt das Enzym seinen Namen [23, 24]. In Neuronen kontrolliert Calcineurin unter anderem das Nervenwachstum [25], die Gedächtnisbildung [26] und die Freisetzung bestimmter Neurotransmitter [27]. In der Muskulatur steuert es die Umwandlung von schnell zuckenden Fasern zu langsam zuckenden Fasern [28-30]. Calcineurin ist an Prozessen der mitochondrienabhängigen Zellschädigung und Apoptose in vielen Geweben beteiligt, zum Beispiel nach Herzinfarkten oder Schlaganfällen [31].

Eine Schlüsselrolle hat Calcineurin in der antigenspezifischen Aktivierung und Differenzierung von T-Zellen; eine Inhibierung des Enzyms blockiert die komplette

adaptive Immunantwort. Calcineurin kann daher als eine „Achillesferse des Immunsystems“ bezeichnet werden [32].

### 1.2.3 Der Transkriptionsfaktor NFATc

Die Transkriptionsfaktoren der NFATc (*nuclear factor of activated T cells*)-Familie NFATc1 bis NFATc4 [33] werden mittels koordinierter Dephosphorylierung bestimmter Phosphoserine durch Calcineurin aktiviert. Calcineurin-*knockout*-Mausmodelle lassen nach aktuellem Kenntnisstand den Schluß zu, daß Calcineurin die einzige physiologische Proteinphosphatase ist, die NFATc als Substrat hat [34-36]. Die vier Isoformen, die jeweils in verschiedenen Spleißvarianten vorkommen, unterscheiden sich in ihrer gewebespezifischen Expression und teilweise auch in ihren Aufgaben, obwohl funktionell hohe Redundanz besteht [37]. Als Besonderheit unter den Isoformen wird die Spleißvariante A von NFATc1 stimulierungsab-



**Abb. 1.3 Der Transkriptionsfaktor NFATc.** (A) Der Aufbau von NFATc und der regulatorischen Domäne am Beispiel von NFATc2. Die N-terminale regulatorische Domäne von NFATc enthält neben zwei calcineurinbindenden Regionen (CNBR1 und 2) eine serinreiche Region (SRR) und mehrere Serin-Prolin-Wiederholungen (SP1-3). Diese sind sowohl Ziel von Calcineurin als auch von Kinasen wie GSK3 $\beta$ , PKA, CK1 oder DYRK1 [42]. Die von Calcineurin dephosphorylierten Reste sind als rote Kreise dargestellt. Der Phosphorylierungszustand dieser Motive entscheidet über die Zugänglichkeit der NLS und NES und damit über die Lokalisierung von NFATc. AD – aktivierende Domäne. (B) Vereinfachtes Schema des Calcineurin-NFATc-Signalweges. Erläuterungen im Text. CaN – Calcineurin; CaM – Calmodulin; TF – anderer Transkriptionsfaktor



hängig exprimiert [38]. Hier werden NFATc1–c4 aufgrund des gleichen Aktivierungsmechanismus vereinfacht als „NFATc“ betrachtet. NFATc kontrolliert in T-Zellen die Expression einer Vielzahl von Genen und ist damit entscheidend für deren Funktionalität. Darunter sind Zytokine wie IL-2, IL-4 und IFN $\gamma$  oder Oberflächenproteine wie CD40L und CD95L [39-41]. Auch in vielen anderen Zelltypen werden Mitglieder der NFATc-Familie exprimiert und spielen dort zusammen mit Calcineurin wichtige Rollen in der Zellfunktion, Zelldifferenzierung und Organentwicklung [32, 42]. Die NFATc-Familie gehört zur Gruppe der rel-Homologiedomänen (RHD)-Proteine und ist exklusiv in Vertebraten exprimiert [43]. Neben der DNA-bindenden RHD besitzt NFATc eine N-terminale regulatorische Domäne, die einzigartig unter den RHD-Proteinen ist. Diese enthält neben calcineurinbindenden Motiven mehrere serinreiche Wiederholungen und außerdem nukleäre Lokalisierungssequenzen (NLS) sowie eine nukleäre Exportsequenz (NES; Abb. 1.3A). Durch diese Domäne und die Steuerung ihres Phosphorylierungszustandes kann die Zelle über NFATc sehr schnell auf Aktivierung reagieren.

#### 1.2.3.1 Der NFATc-aktivierende Signalweg

In T-Zellen, wie in vielen anderen Zelltypen auch, wird der Calcineurin-NFATc-Signalweg durch die Entstehung des sekundären Botenstoffes IP $_3$  ausgelöst. IP $_3$  bindet an seinen Rezeptor (IP $_3$ R) in der Membran des Endoplasmatischen Retikulums (ER), der ein ligandenaktivierter Kationenkanal ist. Das ER fungiert als Speicher für Ca $^{2+}$ -Ionen; der durch die Öffnung des IP $_3$ R geleert wird. Es kommt zu einem Einstrom von Ca $^{2+}$  in das Zytosol. Die Depletierung der ER-Ca $^{2+}$ -Speicher wird von den STIM-Proteinen der ER-Membran in direkter mechanischer Kopplung an die *calcium release activated calcium* (CRAC)-Kanäle in der Zellmembran weitergeleitet [44, 45]. Durch die geöffneten CRAC-Kanäle, deren molekulare Identität von Feske *et al.* 2006 [46] als ORAI1-3 bestimmt wurde, strömen Ca $^{2+}$ -Ionen ins Zytosol und aktivieren eine große Reihe calmodulinabhängiger Enzyme, darunter Calcineurin [47].

In ruhenden T-Zellen ist NFATc stark phosphoryliert und im Zytosol lokalisiert, in diesem Zustand hat dieser Transkriptionsfaktor nur eine geringe basale transkriptionelle Aktivität. Nach Stimulierung der T-Zelle und nachfolgender Calciummobilisierung wird NFATc von aktiviertem Calcineurin an 13 Serinresten in der regulato-

rischen Domäne dephosphoryliert [48]. Dadurch wird die NLS von NFATc exponiert und der aktivierte Transkriptionsfaktor in den Zellkern transloziert [28, 49]. Dort kann NFATc als Homodimer oder im Komplex mit anderen Transkriptionsfaktoren an entsprechende Sequenzen der DNA binden und die Transkription seiner Zielgene regulieren (Abb. 1.3B). Die konzertierte Rephosphorylierung der NFATc-Serinreste durch bestimmte Kinasen (z. B. Caseinkinase CK1, Proteinkinase PKA, Glykogensynthasekinase GSK3, p38 MAP-Kinase oder Dual-spezifische Tyrosinphosphorylierungsregulierte Kinase DYRK1A) führt zu einem Rücktransport von NFATc in das Zytosol und damit der Terminierung der Signalkette [48, 50]. Die genannten Kinasen sorgen auch für die basale Phosphorylierung von NFATc in ruhenden Zellen und können selbst durch Phosphorylierungen in ihrer Aktivität moduliert werden. So wird die NFATc-Kinase GSK3 durch Phosphorylierung durch die CD28-abhängige Kinase Akt deaktiviert, was die NFATc-Retranslokation verringert [50].

### 1.2.3.2 Calcineurin-interagierende Motive in NFATc

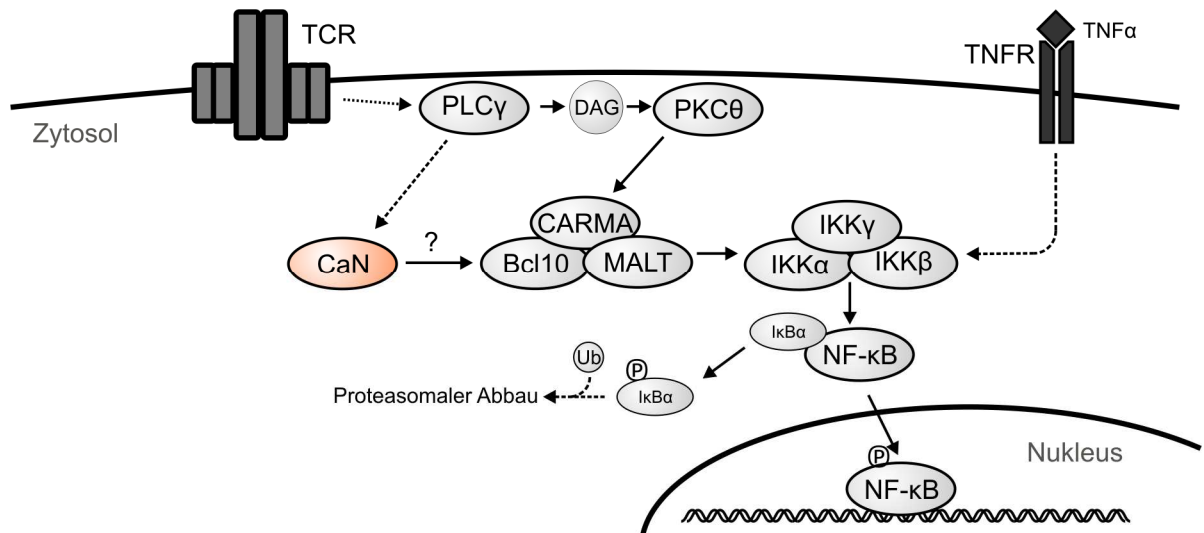
NFATc interagiert mit Calcineurin nicht nur über die Phosphogruppen, sondern zusätzlich über zwei Motive in der regulatorischen Domäne, die an Calcineurinregionen abseits des aktiven Zentrums binden. Diese Motive werden calcineurinbindende Regionen (CNBR)1 und 2, oder PxIxIT bzw. LxVP nach ihren Aminosäure-Konsensussequenzen, genannt [51]. Die PxIxIT-Region von NFATc bindet an ruhendes Calcineurin und ist für die basale Calcineurin-NFATc-Interaktion zuständig [52, 53]. Das LxVP-Motiv kann nur an aktiviertes Calcineurin binden, da dessen Bindestelle sonst von der autoinhibitorischen Domäne maskiert wird [54, 55]. Die Interaktion dieser beiden Motive mit Calcineurin dirigiert die regulatorische NFATc-Region in die unmittelbare Nähe des katalytischen Zentrums der Phosphatase und ermöglicht die gezielte Dephosphorylierung der spezifischen Phosphoserinreste. Beide Motive sind in den Proteinen der NFATc-Familie hochkonserviert, weisen aber je nach Isoform unterschiedliche Affinitäten zu Calcineurin auf [54]. Das PxIxIT-Motiv ist darüber hinaus in einer Anzahl weiterer calcineurininteragierender Proteine zu finden und stellt möglicherweise ein allgemeines Calcineurinbindungsmotiv dar [56-58].

#### 1.2.4 Der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B

Die Transkriptionsfaktoren der NF- $\kappa$ B (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*)-Familie gehören wie NFATc zu den RHD-Proteinen. Zu dieser Familie zählen die Proteine RelA (auch p65 genannt), RelB und c-Rel sowie NF- $\kappa$ B1 (p50 und sein Vorläuferprotein p105) und NF- $\kappa$ B2 (p52 und sein Vorläuferprotein p100). Nur die Rel-Proteine besitzen eine Transaktivierungsdomäne in ihrem C-Terminus. NF- $\kappa$ B-Proteine bilden Homo- und Heterodimere, von denen RelA/RelA (p65/p65) und RelA/NF- $\kappa$ B1 (p65/p50) die bestcharakterisierten sind [59]. In ruhenden Zellen liegt das NF- $\kappa$ B-Dimer im Komplex mit dem inhibitorischen Protein I $\kappa$ B $\alpha$  im Zytosol vor, das die NLS von RelA maskiert. NF- $\kappa$ B kann über mehrere, TCR-abhängige oder zytokinrezeptorabhängige, Signalwege aktiviert werden (Abb. 1.4).

Die TCR-abhängige Aktivierung von NF- $\kappa$ B verläuft über DAG, das an die Proteinkinase C theta (PKC $\theta$ ) bindet und diese aktiviert. PKC $\theta$  phosphoryliert daraufhin das Protein CARMA1, das dann mit den Proteinen Bcl10 und MALT1 den CBM-Adapterkomplex bildet. Bcl10 stellt möglicherweise den Verbindungspunkt von Calcineurin und NF- $\kappa$ B-Aktivierung dar (S. Frischbutter, DRFZ, persönliche Kommunikation), über den Calcineurin und PKC $\theta$  synergistisch den NF- $\kappa$ B-Weg aktivieren [60]. Bcl10 weist ein PxIxIT-Motiv auf, das als Calcineurinbindestelle fungieren könnte. Die Dephosphorylierung von Bcl10-Serinresten durch Calcineurin stabilisiert dann den CBM-Komplex, wodurch die Signalweiterleitung ermöglicht wird. Der CBM-Komplex aktiviert mittels eines bisher weitgehend unbekanntem Mechanismus den trimeren I $\kappa$ B-Kinase (IKK)-Komplex, bestehend aus den enzymatischen Untereinheiten IKK $\alpha$  (IKK1) und IKK $\beta$  (IKK2) sowie der regulatorischen Untereinheit IKK $\gamma$  (NEMO). Der aktivierte IKK-Komplex phosphoryliert RelA und den Inhibitor I $\kappa$ B $\alpha$ , der daraufhin ubiquitiniert und proteasomal degradiert wird. Der jetzt freie phosphorylierte NF- $\kappa$ B kann nun in den Kern translozieren und als Transkriptionsfaktor wirken [61-63].

Alternativ kann NF- $\kappa$ B in T-Zellen über den TNF $\alpha$ -Rezeptor (TNFR) oder beispielsweise über den IL-1-Rezeptor aktiviert werden. Dabei wird der IKK-Komplex unabhängig vom CBM-Komplex über das Adapterprotein RIP aktiviert; dieser Signalweg ist daher auch calcineurinunabhängig [64].



**Abb. 1.4: NF-κB kann TCR-abhängig und TNFR-abhängig aktiviert werden.** Der dimere Transkriptionsfaktor NF-κB ist im inaktiven Zustand an das inhibitorische Protein IκBα gebunden. Nach Aktivierung der PLCγ über den TCR und einen Kinasen-Strukturproteine-Komplex wird über die DAG-abhängige PKCθ und den CARMA1-Bcl10-Malt1 (CBM)-Komplex der trimere IκB-Kinase-Komplex (IKK) aktiviert, der IκBα und NF-κB phosphoryliert. Phospho-IκBα wird daraufhin ubiquitiniert und vom Proteasom degradiert. Der nun freie NF-κB transloziert in den Zellkern und bindet dort an spezifische DNA-Sequenzen. Aktiviertes Calcineurin moduliert den NF-κB-Signalweg möglicherweise über die Stabilität des CBM-Komplexes. Der IKK-Komplex kann auch unabhängig vom TCR über den TNF-Rezeptor aktiviert werden.

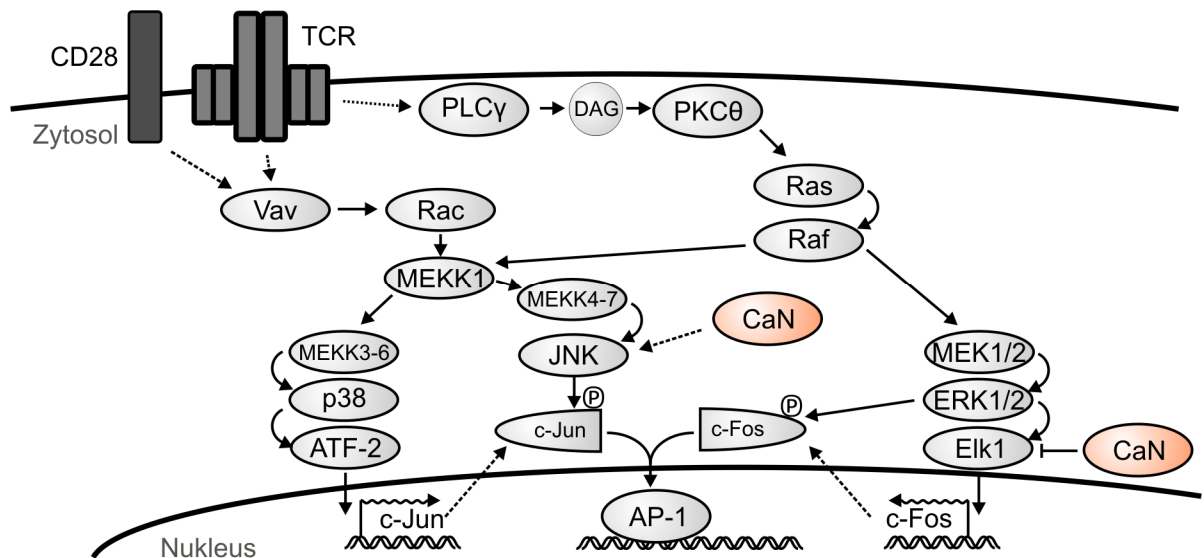
### 1.2.5 Der Transkriptionsfaktor AP-1

Der Transkriptionsfaktor AP-1 (*activator protein 1*) ist ein Heterodimer aus Proteinen der Fos- und Jun-Familien. In T-Zellen sind dies hauptsächlich c-Fos und c-Jun. Während c-Jun basal auf niedrigem Niveau vorliegt, muß c-Fos nach Zellaktivierung erst exprimiert werden [65]. Die Expression der beiden Untereinheiten wird über verschiedene MAPK (*mitogen activated protein kinase*)-Signalwege kontrolliert (Abb.1.5) [66].

PKCθ phosphoryliert und aktiviert zusammen mit DAG die GTPase Ras [6], die daraufhin die Raf/MAPK/Erk-Signalkaskade auslöst. Phosphoryliertes Erk2 aktiviert den Transkriptionsfaktor Elk1, der die Expression der AP-1-Untereinheit c-Fos kontrolliert [67]. Über weitere MAPK-Kaskaden, die schließlich die Kinasen p38 MAPK und JNK (c-Jun N-terminale Kinase) aktivieren, wird die Expression und Phosphorylierung der AP-1-Untereinheit c-Jun reguliert. Diese MAPK-Kaskaden werden TCR-abhängig über LAT, den Guanodin-Austauschfaktor Vav-1 und das GTP-bindende Protein Rac initiiert.

Calcineurin kann die AP-1-Aktivierung beeinflussen. Der Transkriptionsfaktor Elk-1 kann von Calcineurin dephosphoryliert werden, womit es als Gegenspieler

zur Kinase Erk2 wirkt [68, 69]. Über die Kinase SEK wirkt Calcineurin aktivierend auf JNK [70]. Außerdem bildet AP-1 oft Transkriptionsfaktorkomplexe mit NFATc, wodurch diese beiden Signalwege integriert werden [71].



**Abb. 1.5: Vereinfachtes Schema des AP-1-Signalweges.** Die Expression der beiden AP-1-Untereinheiten c-Jun und c-Fos wird durch verschiedene MAP/Erk-Kinase-Kaskaden kontrolliert, die die Transkriptionsfaktoren ATF-2 bzw. Elk1 phosphorylieren und damit aktivieren. c-Jun und c-Fos bilden dann das AP-1-Dimer, das nach Phosphorylierung durch JNK und Erk1/2 in den Zellkern transloziert. Calcineurin moduliert diesen Signalweg an verschiedenen Stellen. Phosphoryliertes Elk1 kann als Calcineurinsubstrat dienen [69], und Calcineurin ist synergistisch an der JNK-Aktivierung beteiligt [72].

### 1.3 CsA und FK506 – die „klassischen“ Calcineurin-Inhibitoren

Durch seine zentrale Rolle im T-Zell-Rezeptor-abhängigen Signalübertragungssystem stellt Calcineurin einen effektiven Angriffspunkt dar, um die Aktivität von T-Zellen zu modulieren. Ein Hinweis darauf ist, daß die beiden wichtigsten Immunsuppressiva Calcineurin als Zielmolekül besitzen.

#### 1.3.1 Die Immunsuppressiva CsA und FK506

Cyclosporin A (CsA) und FK506 (Tacrolimus) werden als effektive Immunsuppressiva in der Klinik eingesetzt; hauptsächlich für Organtransplantationen zur Unterdrückung der Abstoßungsreaktion und in der Dermatologie zur Behandlung von Autoimmun- und allergischen Erkrankungen [73-75]. Die Anwendung dieser Sub-

stanzen in der Grundlagenforschung hat wesentlich zur Aufklärung der calcineurinabhängigen Signalprozesse beigetragen [21, 76].

Cyclosporin A ist ein zyklisches Undecapeptid, das aus Pilzen isoliert wurde [77]. Das Molekül enthält eine D-Aminosäure (D-Alanin) und wird von einer 1,6 MDa großen nichtribosomalen Peptidsynthetase erzeugt [78]. FK506 gehört dagegen zur Klasse der bakteriellen Makrolide [79]. Obwohl beide Substanzen völlig verschiedenen Stoffklassen angehören (Abb. 1.6A), ist ihr Wirkmechanismus erstaunlich ähnlich.

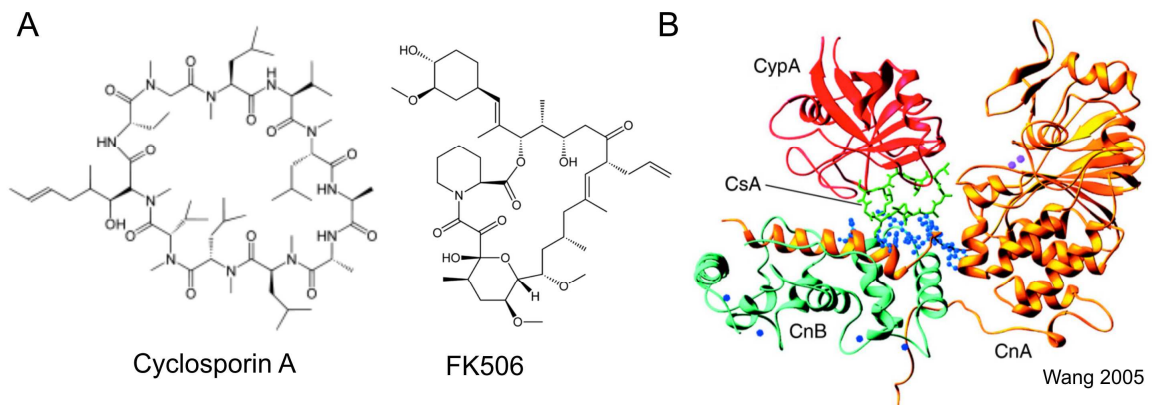
Die immunsuppressive Wirkung von CsA wurde 1976 in Tiermodellen entdeckt [77]. Seit 1979 wird CsA in der humanen Transplantationsmedizin angewandt und ist unverzichtbar geworden [80, 81]. FK506 wurde 1987 als Alternative zu CsA beschrieben [79] und zuerst 1989 in der Klinik benutzt [82]. Trotz ihrer verbreiteten Anwendung blieb der molekulare Mechanismus der CsA- und FK506-Wirkung bis 1991 unbekannt. Es wurde zwar herausgefunden, daß CsA und FK506 an endogene Rezeptorproteine, die Immunophiline, binden [83-85], aber der immunsuppressive Effekt konnte damit nicht erklärt werden. Dann identifizierten Liu *et al.* Calcineurin als das gemeinsame Ziel beider Substanzen. Sie zeigten ebenfalls, daß CsA und FK506 nur im Komplex mit den Immunophilinen an Calcineurin binden und die Phosphatase inhibieren, nicht aber die isolierten Immunsuppressiva noch die Immunophiline allein. Diese Experimente demonstrierten deutlich, daß CsA und FK506 an sich keine aktiven Calcineurininhibitoren sind, sondern erst an ihre endogenen Partner binden müssen, um ihre Funktionalität zu erlangen (Abb. 1.6B) [86, 87].

### 1.3.2 Die Immunophiline

Immunophiline gehören zur Klasse der Prolyl-Peptidyl-*cis-trans*-Isomerasen (PPIasen) [89]; viele Immunophiline sind als Chaperone an der *de novo*-Faltung und Renaturierung von Proteinen beteiligt. Außerdem sind sie in viele weitere zelluläre Prozesse involviert, z. B. die Modulierung der Aktivität von Rezeptoren, Calciumkanälen oder Transkriptionsfaktoren [90-92]. Es existieren mehrere Familien von Immunophilinen, darunter die Cyclophiline und die FK506-bindenden Proteine (FKBPs). Alle Pro- und Eukaryoten exprimieren multiple Cyclophilin- und FKBP-Paraloge [88].

Die bestuntersuchten Immunophiline in T-Zellen sind das CsA-bindende Cyclophilin A (CypA, auch nach seinem Proteingewicht Cyp18 genannt) und FKBP12.

Die Komplexierung der Inhibitoren mit ihren Immunophilinen erzeugt Bindungsareale für Calcineurin, zu denen sowohl Atomgruppen der Inhibitoren als auch Seitenketten der Immunophiline beitragen. Dabei inhibiert die Bindung von CsA und FK506 an ihre jeweiligen Immunophiline deren PPIase-Aktivität [92].



**Abb. 1.6: CsA und FK506 gehören unterschiedlichen Stoffklassen an.** (A) Strukturformeln von CsA (rechts) und FK506 (links). Beide Substanzen weisen eine Ringstruktur auf. (B) Modell des CsA·Cyclophilin A/Calcineurin-Komplexes. Nur das Immunsuppressivum·Immunophilin-Dimer ist in der Lage, an Calcineurin zu binden. Durch die Größe dieses Komplexes wird der Zugang von Peptid- und Proteinsubstraten zum aktiven Zentrum von Calcineurin behindert. Abbildung nach Wang *et al.* 2005 [88]

### 1.3.3 Die inhibitorische Wirkung von CsA und FK506

Der Komplex aus Immunophilin und Immunsuppressivum bindet an Calcineurin, unabhängig von dessen Assoziation mit Calmodulin. Die Aktivierung von Calcineurin durch  $\text{Ca}^{2+}$  und Calmodulin verstärkt aber die Interaktion mit dem Komplex, vermutlich durch besseren Zugang zu den Bindungsarealen. [86]. Die eigentliche Bindung erfolgt dabei an die Calcineurin-Untereinheit A (Abb. 1.6B). Die Bindung von CsA·CypA verdrängt dabei die autoinhibitorische Domäne von Calcineurin A vom aktiven Zentrum, stört jedoch nicht die Bindung von Calcineurin B oder Calmodulin [93].

Durch die Größe des Komplexes limitieren CsA·CypA und FK506·FKBP12 den Zugang von Peptid- und Proteinsubstraten zum aktiven Zentrum von Calcineurin [94-97]. Zusätzlich wird die Bindestelle für das NFATc LxVP-Motiv maskiert [55]. Es erfolgt dabei aber keine Bindung an Aminosäurereste des katalytischen Zentrums, daher wird das niedermolekulare Substrat p-Nitrophenylphosphat (pNPP) auch

bei Anwesenheit von CsA·CypA bzw. FK506·FKBP12 dephosphoryliert [98, 99]. FK506- und CsA-PPIase-Komplexe sind durch ihren Wirkmechanismus nichtkompetitive Inhibitoren von Calcineurin. Die Aktivität anderer Ser/Thr-Proteinphosphatasen wie PP1, PP2A und PP2C wird durch diese Komplexe nicht beeinflusst.

Die Applikation von CsA und FK506 inhibiert die TCR-abhängige Aktivierung, Proliferation und Differenzierung von T-Zellen. Beide Substanzen inhibieren die Aktivierung von NFATc und p65/NF- $\kappa$ B [100, 101]. Allerdings ist die NF- $\kappa$ B-regulierte Genexpression nicht vollständig durch diese Substanzen inhibierbar, da weitere calcineurinunabhängige Aktivierungsmechanismen für diesen Transkriptionsfaktor existieren [102]. Zusätzlich moduliert die CsA- oder FK506-Behandlung andere zelluläre Prozesse wie die transkriptionelle Aktivität von CREB [103] oder die proteasomale Degradation von Proteinen [104, 105].

Bis heute sind CsA und FK506 unverzichtbare Medikamente in der Transplantationsmedizin. Jedoch bewirkt die Behandlung mit CsA oder FK506 schwere Nieren- und Nervenschäden, wodurch ihre Anwendung stark limitiert wird [106, 107]. Verursacht werden diese Nebenwirkungen wahrscheinlich durch pleiotropische Effekte, die CsA und FK506 durch die Bindung an die Immunophiline und die Inhibition von Calcineurin oder der PPIase-Aktivität der Immunophiline in Zellen außerhalb des Immunsystems bewirken. Es ist jedoch bis heute weitgehend unklar, ob dafür die Störung von calcineurin- oder aber immunophilinabhängigen Mechanismen verantwortlich ist. Weiterhin ist wenig darüber bekannt, ob die Modulation des NFATc-Signalwegs oder aber die anderer Signalwege und Transkriptionsfaktoren zu diesen Effekten führt.

Um die verschiedenen Wirkungen von CsA oder FK506 in ihre Komponenten zu zerlegen, werden alternative Inhibitoren gesucht. Diese sollten idealerweise nicht nur, wie CsA und FK506, spezifisch für Calcineurin unter den Ser/Thr-Proteinphosphatasen sein. Zusätzlich sollten sie zwischen der Inhibierung von Calcineurin und den PPIasen diskriminieren und außerdem zwischen der Dephosphorylierung von NFATc und anderen Calcineurinsubstraten unterscheiden. Substanzen, die diese Eigenschaften aufweisen, wären spezifischer als CsA und FK506 und würden in medizinischen Anwendungen möglicherweise weniger Nebeneffekte haben. In



der Grundlagenforschung könnten diese Substanzen dazu beitragen, weitere Interaktionspartner und Substrate von Calcineurin zu identifizieren und zu charakterisieren [108].

## 1.4 RCAN1 – ein endogener Modulator des Calcineurin-NFATc-Signalweges

Der Calcineurin-NFATc-Signalweg ist nicht nur Angriffspunkt „exogener“ niedermolekularer Inhibitoren, sondern wird von der Zelle selbst auch streng kontrolliert. Neben der Regulation der Calcineurin-Aktivität durch den intrazellulären Calciumgehalt einerseits und der Phosphorylierung von NFATc durch entsprechende Kinasen andererseits, existieren weitere zelluläre Mechanismen, die die transkriptionelle Aktivität von NFATc modulieren. So können endogene calcineurinbindende Proteine die Lokalisierung und Aktivität der Phosphatase regulieren [109].

### 1.4.1 Die Calcipressine

Die bekannteste Gruppe der endogenen modulatorischen Proteine sind die Calcipressine, die in Pilzen und Metazoen hochkonserviert sind [110, 111]. Der systematische Name dieser Genfamilie lautet *regulators of calcineurin* (RCANs, in Pilzen RCNs) [112].

Calcipressine interagieren direkt mit Calcineurin. Diese Interaktion geschieht, ähnlich wie bei NFATc, über mehrere in den Calcipressinen konservierte Regionen. Dazu gehören eine Ser/Pro-reiche Region (*SP-Repeat*), ein PxIxIT-Motiv [58, 113] und ein der CNBR2/LxVP-Sequenz ähnliches LxxP-Motiv [111] (Abb. 1.8). Calcipressine wirken dadurch als kompetitive Inhibitoren der Interaktion von Calcineurin mit NFATc und anderen Proteinen. Der SP-Repeat der Calcipressine kann durch GSK3, p42/44 MAPK oder TAK1 phosphoryliert werden und als Substrat für Calcineurin dienen. Die Phosphorylierung dieser und anderer Reste verringert die Halbwertszeit der Calcipressine, da sie möglicherweise als Signal für deren Ubiquitinierung und anschließenden proteasomalen Abbau wirkt [114-117]. Die Phosphorylierung von RCAN1 durch die *NF- $\kappa$ B inducing kinase* NIK dagegen blockiert den Abbau des Calcipressins [118]. Auch das neuronale Protein CREB (*cyclic*

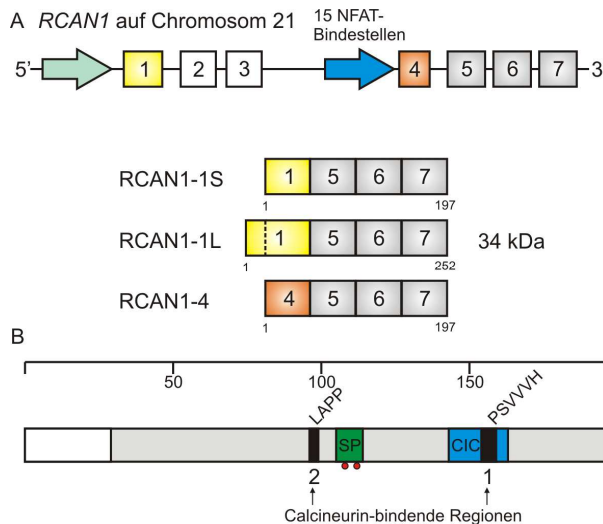
*AMP response element-binding protein*) aktiviert den proteasomalen Abbau von RCAN1 [119]. Zusätzlich zum proteasomalen Weg kann RCAN1 auch über chaperonvermittelte lysosomale Autophagie kontrolliert abgebaut werden [120]. Die Phosphorylierung und Degradierung der RCANs stellt also einen Punkt dar, an dem verschiedene andere Signalwege die Aktivität von Calcineurin modulieren können [121, 122].

Calcipressine scheinen jedoch nicht nur als Inhibitoren, sondern auch als Aktivatoren von Calcineurin zu wirken. Das Ausschalten von RCANs führt in mehreren Modellen zu einer Verringerung der Calcineurin-Signalwege. In Hefe zeigen *rcn1*-Null-Mutanten verringerte Calcineurinaktivität, vergleichbar mit einer Überexpression von *RCN1* [123]. Embryonale Fibroblasten aus *RCAN1*<sup>-/-</sup> und *RCAN2*<sup>-/-</sup>-Mäusen zeigen eine signifikante Reduktion der transkriptionellen Aktivität von NFATc nach Thapsigargin-Stimulierung, und Doppel-*knockout*-Tiere zeigen in vielen Zelltypen einen ähnlichen Phänotyp wie Tiere, denen Calcineurin A $\beta$  fehlt [124].

Über die Mechanismen der Aktivatorfunktion besteht bisher weitgehend Unklarheit. Der Repressormechanismus der Calcipressine kann dagegen gut erklärt werden.

#### **1.4.2 Das Calcipressin RCAN1**

RCAN1 ist das vermutlich bestcharakterisierte Calcipressin. Weitere Namen von RCAN1 sind MCIP1 (*modulatory calcineurin interacting protein 1*) [125], Adapt78 [126], Csp1, Clp1 und schließlich DSCR1 (*Down syndrome critical region gene 1*). *RCAN1* ist beim Menschen auf dem Chromosom 21 lokalisiert, in der Region q22.12, die beim Down-Syndrom besonders oft von Chromosomenbruch und anschließender partieller Trisomie 21 betroffen ist [127] und steht daher besonders im Fokus der Forschung. RCAN1 wird hauptsächlich in Neuronen sowie in Herz- und Skelettmuskelzellen exprimiert und spielt dort eine wichtige Rolle in der korrekten Organentwicklung während der Embryogenese. Die Expression von RCAN1 konnte auch in Zellen des Immunsystems, der Plazenta und in Nieren nachgewiesen werden [128].



**Abb. 1.8: Struktur und Spleißvarianten des Calcipressins RCAN1.** A: *RCAN1* besitzt sieben Exons, von denen die ersten vier als alternative Startexons benutzt werden, während die Exons 5, 6 und 7 in allen Spleißvarianten vorhanden sind. Vor den Exons 1 und 4 befinden sich alternative Promotoren; der Promotor vor Exon 4 weist *in silico* 15 NFAT-Bindestellen auf. *RCAN1-1* besitzt zwei alternative Startcodons. B: *RCAN1* besitzt Calcineurin-bindende Motive, die denen von NFATc ähnlich sind. Dazu gehören der SP-Repeat (grün), das LxVP (hier LAPP)-Motiv und das PxIxIT (hier PSVVVH)-Motiv, das sich in der CIC-Region (blau) [113] befindet (Zählung der Aminosäuren nach hRCAN1-4). Grau ist der in allen Spleißvarianten konservierte Teil von *RCAN1*, rot die phosphorylierten Serine im SP-Repeat.

*RCAN1* beinhaltet sieben Exons. Die ersten vier Exons sind theoretisch alternative Startexons für vier verschiedene Spleißvarianten (*RCAN1-1* bis *-4*), während die Exons 5, 6 und 7 in allen Spleißvarianten vorhanden sind und die konservierten calcineurininteragierenden Elemente beinhalten (Abb. 1.8). *In vivo* sind *RCAN1-1* und *RCAN1-4* die hauptsächlich nachgewiesenen Formen, *RCAN1-2* ist nur in fötaler Leber und Gehirn detektiert worden [129]. *RCAN1-1* wird anscheinend konstitutiv exprimiert; seine Expression kann durch Glucocorticoide verstärkt [130, 131] und durch die Aktivierung des Notch-Signalweges verringert werden [132]. Durch alternative Startcodons existieren zwei Translationsvarianten von *RCAN1-1*, eine „lange“ Variante *RCAN1-1L* von 252 Aminosäuren (AS) und eine „kurze“ Variante *RCAN1-1S* von 197 AS. Diese beiden Translationsvarianten scheinen unterschiedliche Funktionalität aufzuweisen, da nur *RCAN1-1S* die Expression der Kinase GSK-3 $\beta$  hochreguliert [133].

Die Expression von *RCAN1-4* ist dagegen induktionsabhängig, basal wird *RCAN1-4* nur schwach exprimiert. Induzierende Ereignisse umfassen Redoxstreß durch Wasserstoffperoxid [126], Calciumstreß [134, 135] oder direkte mechanische Belastung [136], die alle in die Aktivierung von Calcineurin münden. Der postulierte alternative Promotor vor dem Exon 4 beinhaltet nach *in silico*-Analysen eine Anhäufung von 15 Bindestellen für NFAT. Dadurch ist die Expression von *RCAN1-4* NFATc- und calcineurinabhängig. Es wird angenommen, daß *RCAN1-4* so einen negativen Rückkopplungsmechanismus für den Calcineurin-NFATc-Signalweg darstellt [134]. Dieser Mechanismus verhindert das „Überschießen“ der NFATc-

Aktivierung und damit unphysiologische Zellreaktionen, während das auch in nichtaktivierten Zellen vorhandene RCAN1-1 die basale Calcineurin-Aktivität moduliert und somit die unterschwellige Aktivierung der Zelle, wie beispielsweise durch oxidativen Stress, nivelliert.

Neben Calcineurin und den RCAN-Kinasen sind für RCAN1 weitere Interaktionspartner nachgewiesen worden. So kann phosphoryliertes RCAN1 von Calcineurin dissoziieren und an das multifunktionelle Protein 14-3-3 binden. [121]. RCAN1 interagiert mit dem Adapterprotein Tollip und moduliert so die Signalwirkung des IL-1-Rezeptors [137]. Ein *knockdown* von RCAN1-4 verringert die Expression des Translationsinitiationsfaktors eIF4E und somit die globale Proteinexpression; interessanterweise ist dieser Effekt calcineurinunabhängig [138].

### 1.4.3 Andere Calcipressine

Neben RCAN1/RCN1 existieren weitere in verschiedenen Organismen konservierte Calcipressine: RCAN2 und RCAN3.

RCAN2 besitzt die weiteren Bezeichnungen ZAKI-1, MCIP2 und DSCR1L1, das *D. melanogaster*-Homolog heißt *sarah*. RCAN2 besitzt 62% Aminosäureidentität zu RCAN1 [129]. Das Gen ist beim Menschen auf dem Chromosom 6 lokalisiert und die Expression von RCAN2 wird durch Thyroid-Hormon hochreguliert [134, 139]. RCAN2 wird wie RCAN1 in Hirn- und Muskelzellen exprimiert [128].

RCAN3, auch DSCR1L2 genannt und auf dem Chromosom 1 kodiert, wird im Gegensatz zu RCAN1 und 2 in allen Geweben nahezu uniform exprimiert. RCAN3 kann an das Herzmuskelprotein Troponin I binden [140].

## 2 Zielstellung

Das Thema dieser Arbeit ist die Modulation der Calcineurin-Aktivität in T<sub>H</sub>-Zellen durch Manipulation mit niedermolekularen Inhibitoren und durch endogene calcineurinbindende Proteine.

Bei der Durchmusterung einer Substanzbibliothek ist das Pyrazolopyrimidinderivat NCI3 als neuer potentieller niedermolekularer Calcineurininhibitor identifiziert worden. Zur Charakterisierung dieser Substanz als Immunsuppressivum sollten folgende Aspekte untersucht werden:

- Der Einfluß von NCI3 auf Proliferation und Zytokinproduktion stimulierter T-Zellen.
- Identifizierung der inhibierten Signalwege mittels Reporterassays und Dephosphorylierungsstudien der Transkriptionsfaktoren.
- Aufklärung des Wirkmechanismus durch Überexpression ausgewählter Signalwegskomponenten.

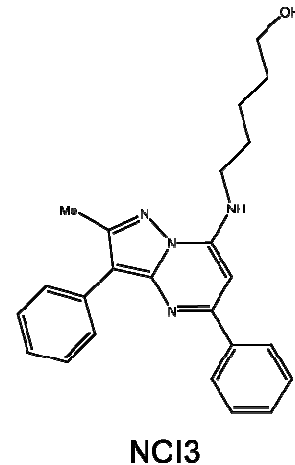
Weiterhin sollte der endogene Calcineurininhibitor RCAN1 untersucht werden. RCAN1 ist biochemisch bereits gut charakterisiert, und für einige Zelltypen liegen Befunde zur Regulation und Funktion dieses Proteins vor. Informationen zu RCAN1 in T-Zellen sind dagegen bisher kaum vorhanden. Zur Gewinnung von neuen Erkenntnissen über RCAN1 wurden diese Ansätze verfolgt:

- Expressionsanalyse der RCAN1-Spleißvarianten in ruhenden und stimulierten primären humanen T<sub>H</sub>-Zellen und bestimmten T<sub>H</sub>-Zell-Subpopulationen.
- Untersuchung der NFAT-Abhängigkeit der RCAN1-4-Regulation, mittels niedermolekularer Calcineurin-NFATc-Inhibitoren wie NCI3.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Charakterisierung des niedermolekularen Calcineurin-NFATc-Inhibitors NCI3

Für die Suche nach alternativen Calcineurininhibitoren wurde eine Bibliothek natürlicher und synthetischer heterozyklischer Substanzen des Hans-Knöll-Institutes (Jena) durchmustert. Dabei wurde das Pyrazolopyrimidinderivat NCI1 als Inhibitor der Dephosphorylierung eines 19-Reste-Phosphopeptides der regulatorischen Untereinheit der Typ II-cAMP-abhängigen Proteinkinase (R<sub>II</sub>-Phosphopeptid) [98] durch Calcineurin identifiziert. Dieser Effekt ist unabhängig von der Anwesenheit von Immunophilinen. Zur weiteren Struktur-Funktions-Bestimmung wurden die Derivate NCI2 und 3 synthetisiert und ebenfalls untersucht. NCI2 und 3 zeigten dabei nur eine geringe Inhibierung der R<sub>II</sub>-Peptid-Dephosphorylierung. Außerdem inhibieren NCI1 und 2 die Dephosphorylierung des Calcineurinsubstrates Phosphocasein im zellfreien Assay, im Gegensatz zu NCI3. Da NCI3 als einzige der drei Substanzen nicht den Zelltod stimulierter und unstimulierter T-Zellen auslöst, wurde NCI3 (Abb. 3.1) als potentieller Calcineurin-NFATc-Inhibitor und Immunsuppressivum näher charakterisiert [141].



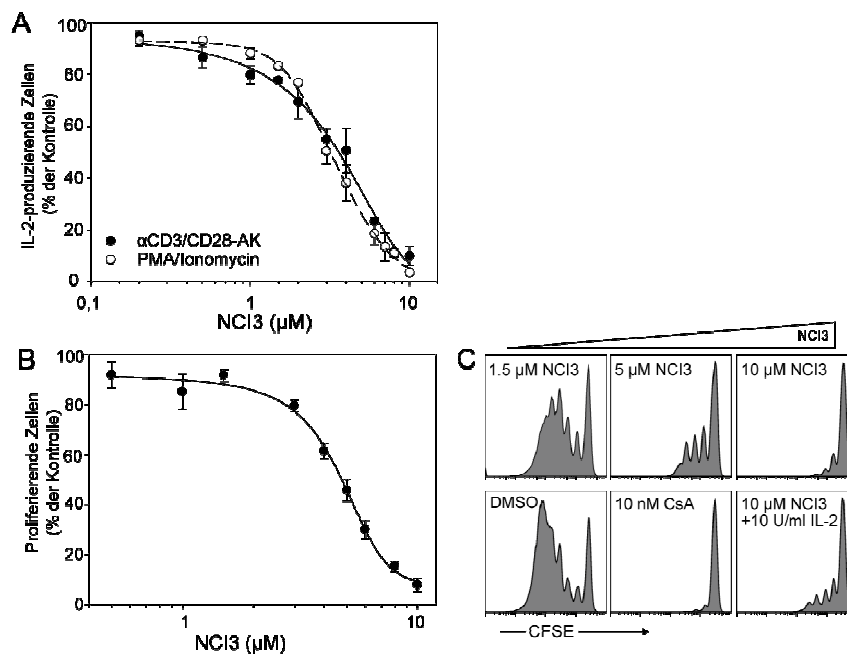
**Abb. 3.1:** Das Pyrazolopyrimidinderivat NCI3

##### 3.1.1 NCI3 inhibiert die Zytokinproduktion und Proliferation primärer T<sub>H</sub>-Zellen

Calcineurin spielt eine Schlüsselrolle in der stimulationsabhängigen Aktivierung und Proliferation von T<sub>H</sub>-Zellen. Aktivierte T<sub>H</sub>-Zellen produzieren Zytokine wie IL-2, die auto- und parakrin die Zellteilung anregen. Die Expression von IL-2 wird durch die Transkriptionsfaktoren NFATc, NF-κB und AP-1 kontrolliert [5]. Die IL-2-Produktion kann somit durch Inhibitoren des Calcineurin-NFATc-Signalweges wie CsA gehemmt werden. Damit wird auch die Stimulation der Zellteilung durch die autokrine IL-2-Wirkung verhindert.

NCI3 zeigt keine Effekte auf die Proteinphosphatase-Aktivität rekombinanten Calcineurins gegen das R<sub>II</sub>-Phosphopeptid oder Phosphocasein, im Gegensatz zu den verwandten Substanzen NCI1 und 2. In PMA/Ionomycin-aktivierten primären menschlichen T<sub>H</sub>-Zellen inhibiert NCI3 dennoch die Expression von IL-2, mit einer Konzentration der halbmaximalen Inhibition (IC<sub>50</sub>) von 3  $\mu$ M (Abb. 3.2A). PMA und Ionomycin sind jedoch unphysiologische und sehr starke Stimuli, die unabhängig von einer Aktivierung des TCR wirken. Es wurde daher untersucht, ob NCI3 auch die IL-2-Produktion und Proliferation TCR-stimulierter primärer T<sub>H</sub>-Zellen beeinflusst.

Beide Parameter wurden durchflußzytometrisch auf Einzelzellebene an aufgereinigten CD4<sup>+</sup> Zellen gemessen, die mit  $\alpha$ CD3/CD28-Antikörpern stimuliert wurden.



**Abb.3.2: NCI3 wirkt als Immunsuppressivum.** NCI3 inhibiert die intrazelluläre IL-2-Produktion (A) und Proliferation (B+C) TCR-stimulierter T<sub>H</sub>-Zellen. (A) Die intrazelluläre IL-2-Produktion humaner CD4<sup>+</sup> T-Zellen, für 8 h mit  $\alpha$ CD3/CD28-Antikörpern (gefüllte Kreise, durchgehende Linie) bzw. für 5 h mit PMA/Ionomycin (leere Kreise, gestrichelte Linie) in Anwesenheit von NCI3 oder DMSO stimuliert, wurde durchflußzytometrisch bestimmt. Der Prozentsatz IL-2-produzierender Zellen relativ zur DMSO-Kontrolle wurde gegen die verwendeten NCI3-Konzentrationen aufgetragen. Werte sind Mittelwerte von Triplikaten  $\pm$  SD. (B) CFSE-gefärbte humane CD4<sup>+</sup>-Zellen wurden mit  $\alpha$ CD3/CD28-Antikörpern in Anwesenheit von NCI3 oder DMSO stimuliert. Nach fünf Tagen wurde die Proliferation durchflußzytometrisch bestimmt. Der Prozentsatz proliferierender Zellen von den Gesamtzellen wurde gegen die verwendeten NCI-3-Konzentrationen aufgetragen. Werte sind Mittelwerte von Triplikaten  $\pm$  SD. (C) Histogramme CFSE-gefärbter Zellen zeigen die Proliferation ausgewählter Proben.

NCI3 inhibiert die TCR-abhängige IL-2-Produktion und Zellproliferation konzentrationsabhängig, die  $IC_{50}$ -Werte dafür liegen bei 4 bzw. 4,5  $\mu$ M (Abb. 3.2A und B). Auch bei höheren NCI3-Konzentrationen führte NCI3 nicht zu einem vermehrten Zelltod, sondern nur zu einer verringerten Proliferation.

IL-2 stimuliert die Zellproliferation durch den IL-2-Rezeptor-mTOR-Signalweg, der letztendlich den Zellzyklusfortschritt initiiert. Das Immunsuppressivum Rapamycin inhibiert im Komplex mit FKBP12 diesen Signalweg durch Bindung an mTOR und unterdrückt dadurch die Vermehrung der aktivierten T-Zellen [86, 142, 143]. Um zu untersuchen, ob der antiproliferativen Effekt von NCI3 nur auf die Inhibierung der IL-2-Expression oder aber auch die Inhibierung der IL-2-abhängigen Signaltransduktion zurückzuführen ist, wurde dem Medium IL-2 hinzugegeben und die Proliferation der stimulierten Zellen unter Inhibitoreinfluß beobachtet. Es konnte gezeigt werden, daß der inhibitorische Effekt durch die Zugabe von IL-2 teilweise aufgehoben wird (Abb. 3.2C). NCI3 verursacht also keine Defekte der IL-2-abhängigen Signaltransduktion.

### **3.1.2 NCI3 inhibiert die NFATc- und NF- $\kappa$ B-abhängige Reporterexpression in transfizierten Jurkat-T-Zellen**

Die IL-2-Transkription hängt von der Aktivierung verschiedener induzierbarer Transkriptionsfaktoren ab, darunter NFATc, NF- $\kappa$ B und AP-1. *In vivo* ist ihre Aktivierung das Ergebnis der Ligation von TCR-Komplexen und kostimulatorischen Signalen über Rezeptoren wie CD28. PMA und Ionomycin imitieren diese Signalergebnisse unterhalb der Rezeptoren, indem sie direkt calcium- und PKC-abhängige Signalkaskaden aktivieren. Ein weiterer Vorteil dieser Stimulierung ist, daß alle Zellen gleichzeitig und gleichmäßig aktiviert werden.

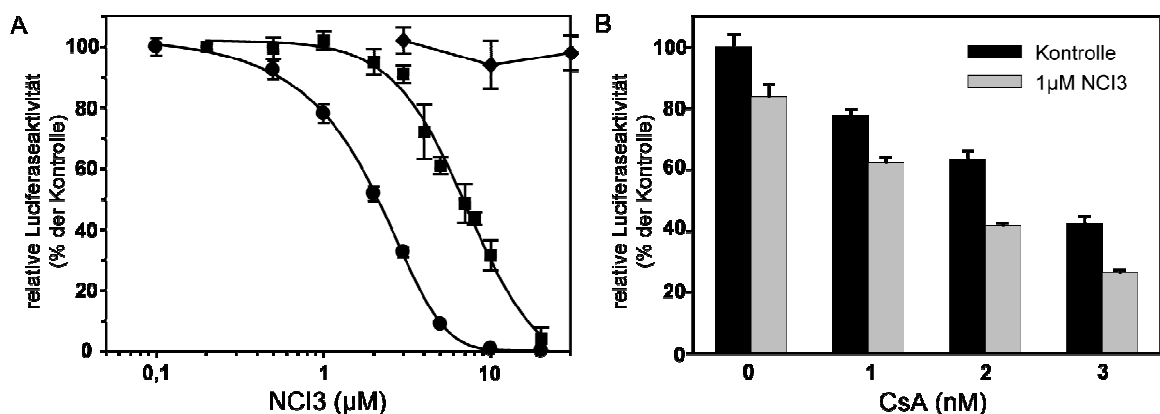
Mit Luciferase-Reporterstudien wurden die Effekte von NCI3 auf die transkriptionelle Aktivität von NFATc, NF- $\kappa$ B und AP-1 untersucht. Anstelle der IL-2-Expression, die von der Aktivierung aller drei Transkriptionsfaktoren abhängig ist, kann so die transkriptionsfaktorspezifische Wirkung von NCI3 erfaßt und damit Rückschlüsse auf den Wirkmechanismus gewonnen werden. Dafür wurden Jurkat-T-Zellen transient mit den Reporterplasmiden transfiziert, mit DMSO oder ver-



schiedenen Konzentrationen von NCI3 behandelt und mit PMA/Ionomycin stimuliert.

Die PMA/Ionomycininduzierte NFAT- und NF- $\kappa$ B-kontrollierte Reporterexpression wurde dosisabhängig durch NCI3-Präinkubation der Zellen inhibiert. Dabei wurde die jeweilige IC<sub>50</sub> bestimmt. Diese liegt für NFAT bei 2±0,1  $\mu$ M, für NF- $\kappa$ B bei 7±1  $\mu$ M. Die AP-1-abhängige Luciferaseexpression wurde dagegen im getesteten Konzentrationsbereich nicht von NCI3 beeinflusst (Abb. 3.3A). Werden die Zellen mit 100 ng/ml TNF $\alpha$  statt mit PMA/Ionomycin stimuliert, wird NF- $\kappa$ B calcineurinunabhängig aktiviert (siehe Abb. 1.4). NCI3 hat keinen Einfluß auf die durch TNF $\alpha$  induzierte NF- $\kappa$ B-kontrollierte Reporterexpression [141] und inhibiert also nur den calcineurinabhängigen NF- $\kappa$ B-Signalweg.

Koapplikation von niedrigdosiertem NCI3 (1  $\mu$ M) und verschiedenen Konzentrationen von CsA (1–3 nM) zum NFAT-Reporterassay zeigte, daß beide Inhibitoren im getesteten Konzentrationsbereich nicht kompetitiv, sondern eher additiv wirken (Abb. 3.3B). Daher ist es wahrscheinlich, daß sich die Angriffsstellen von NCI3 und CsA·CypA nicht überlappen.



**Abb. 3.3: NCI3 inhibiert die transkriptionelle Aktivität von NFATc und NF- $\kappa$ B.** (A) Jurkat-T-Zellen wurden mit Luciferase-Reporterplasmiden für NFAT- (●), NF- $\kappa$ B- (■) bzw. AP-1 (◆)-Aktivierung transfiziert, mit NCI3 oder DMSO präinkubiert und dann für 5 h mit PMA/Ionomycin stimuliert. (B) Die Ko-Behandlung mit NCI3 und CsA hat einen additiven Effekt auf die transkriptionelle Aktivität von NFATc. Mit NFAT-Reporterplasmid transfizierte Jurkat-T-Zellen wurden mit 1  $\mu$ M NCI3 oder DMSO und verschiedenen Konzentrationen CsA präinkubiert und dann für 5 h mit PMA/Ionomycin stimuliert. Werte sind prozentuale Lumineszenz, bezogen auf eine inhibitorfreie stimulierte Kontrolle; Werte sind Mittelwerte von Triplikaten  $\pm$  SD.

Die Expression von Luciferase unter Kontrolle eines konstitutiv aktiven Promotors in unstimulierten transfizierten Jurkat-T-Zellen wurde im getesteten Konzentrationsbereich im Vergleich zu DMSO nicht vermindert. Die generellen transkriptio-

nellen und translationellen Mechanismen werden demnach nicht von NCI3 beeinflusst.

### **3.1.3 NCI3 inhibiert die Dephosphorylierung von NFATc2 in stimulierten T-Zellen, aber nicht in Zellextrakten**

NCI3 verursacht im Reporterassay vergleichbare Effekte wie CsA, so daß ein ähnlicher Wirkmechanismus möglich ist. CsA inhibiert die Dephosphorylierung von NFATc durch aktiviertes Calcineurin und damit dessen anschließende nukleäre Translokation. Andere Inhibitoren wie Gossypol [144] oder Dipyridamol [58] greifen ebenfalls an dieser Stelle an, um die NFATc-abhängige Genexpression zu modulieren. Diese Substanzen haben verschiedene Wirkmechanismen, die aber alle eine verminderte NFATc-abhängige Genexpression verursachen [145].

NCI3 inhibiert auch die nukleäre Translokation von NFATc2 nach Stimulierung der Zellen (M. Podtschaske, in Sieber *et al.* 2007). Die verwandten Substanzen NCI1 und 2 haben Calcineurin als Zielmolekül und inhibieren dessen Phosphataseaktivität. Daher wurde untersucht, ob NCI3 die stimulationsabhängige Dephosphorylierung von NFATc2 beeinflusst, da diese Voraussetzung für die Translokation ist und von der Proteinphosphatase Calcineurin verursacht wird.

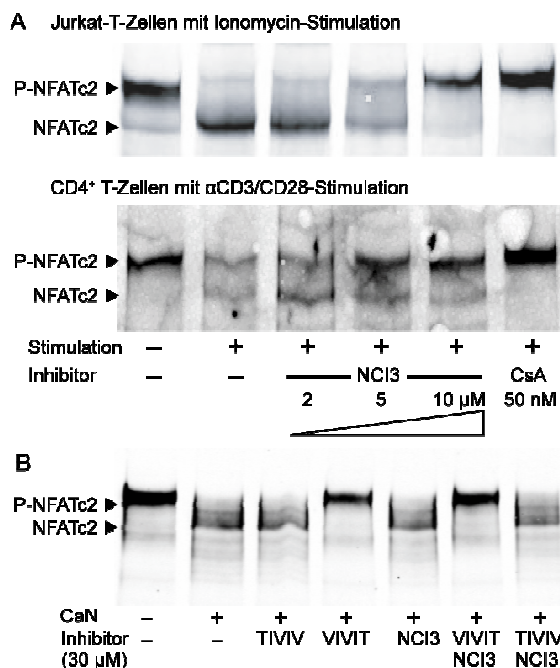
Dafür wurden Jurkat-T-Zellen und primäre CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit NCI3 oder zur Kontrolle mit CsA präinkubiert, mit PMA/Ionomycin bzw.  $\alpha$ CD3/CD28-Antikörpern stimuliert und anschließend lysiert. Der Phosphorylierungsstatus von NFATc2 in den Lysaten kann mittels SDS-PAGE, Western blot und Immunfärbung erfaßt werden, da die 14 relevanten Phosphogruppen, die von Calcineurin koordiniert entfernt werden, dem Protein eine verringerte Elektromobilität verleihen.

Sowohl in Jurkat-T-Zellen als auch in primären Zellen reduziert NCI3 dosisabhängig den Gehalt an dephosphoryliertem NFATc2 (Abb. 3.4A). Folglich kann weniger NFATc2 in den Kern translozieren und dort die Transkription von IL-2 oder dem Reporter gen aktivieren.

Zur weiteren Aufklärung des molekularen Wirkmechanismus' sollte untersucht werden, ob NCI3 direkt die Dephosphorylierung von NFATc2 durch Calcineurin hemmt. In Vorversuchen wurde gezeigt, daß die Dephosphorylierung von Phosphocasein und des R<sub>II</sub>-Phosphopeptides durch NCI3 nicht beeinflusst wird. Der

in Zellen beobachtete inhibitorische Effekt auf die NFATc-Dephosphorylierung könnte jedoch auf einer Störung der Calcineurin-NFATc-Interaktion beruhen, wie sie beispielsweise auch durch ein inhibitorisches Peptid, das VIVIT-Peptid, verursacht wird. Das VIVIT-Peptid bindet an Calcineurin und blockiert dabei die Bindestelle für das PxIxIT-Motiv von NFATc, da es dieses Motiv imitiert, aber eine 25× höhere Affinität als das originale NFATc2-Motiv hat [146].

Phosphoryliertes NFATc2 aus HEK293-Lysaten wurde mit rekombinantem Calcineurin und NCI3 inkubiert und der Phosphorylierungsstatus von NFATc2 erfasst. Erstaunlicherweise inhibiert NCI3 nicht die Dephosphorylierung von NFATc2 im zellfreien System (Abb. 3.4B). NCI3 behindert auch nicht die inhibitorische Wirkung des VIVIT-Peptides, wenn der Dephosphorylierungsassay mit beiden Substanzen koinkubiert wird. NCI3 und das VIVIT-Peptid kompetitieren also vermutlich nicht direkt um die Bindung an Calcineurin. Als Kontrolle zum VIVIT-Peptid wurde das TIVIV-Peptid benutzt, das die reverse Aminosäuresequenz zum VIVIT-Peptid besitzt und nicht an Calcineurin bindet.



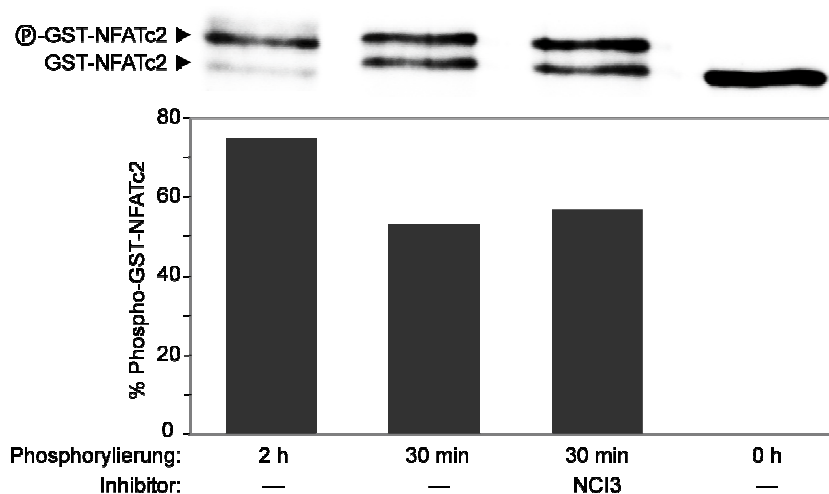
**Abb. 3.4: NCI3 inhibiert die Dephosphorylierung von NFATc2 in Zellen, aber nicht in Zellextrakten.** (A) NCI3 unterdrückt die Dephosphorylierung von NFATc2 nach Stimulation von Jurkat-T-Zellen und primären CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Die Zellen wurden für 1 h mit NCI3, CsA oder DMSO vorbehandelt. Jurkat-T-Zellen wurden dann mit Ionomycin für 1 h in Anwesenheit der Inhibitoren stimuliert, die T<sub>H</sub>-Zellen für 2 h mit αCD3/CD28-Antikörpern. (B) NCI3 inhibiert nicht die Dephosphorylierung von NFATc2 in zellfreien Assays. Überexprimiertes phosphoryliertes NFATc2 aus HEK-Zelllysaten wurde mit rekombinantem Calcineurin in An- oder Abwesenheit der Inhibitoren (30 μM) NCI3 und VIVIT-Peptid inkubiert, als Kontrollen dienten DMSO und TIVIV-Peptid. Zellsate wurden mit SDS-PAGE aufgetrennt, NFATc2 im Western blot immunangefärbt.

### 3.1.4 NCI3 wirkt nicht über verstärkte Aktivierung von Kinasen

NFATc wird von bestimmten Kinasen phosphoryliert, z. B. GSK3β und PKA. Durch die Rephosphorylierung wird NFATc aus dem Kern transloziert bzw. im Cytosol

gehalten. Die Kinasen wirken daher als Gegenspieler zu Calcineurin [50]. Beispielsweise wirken NFATc-Inhibitoren wie Roc-1 [147] oder ST1959 [148], indem sie die Rephosphorylierung verstärken und damit die Kernlokation von NFATc verringern. Diese Substanzen haben zwar einen anderen Wirkmechanismus als Inhibitoren der NFATc-Dephosphorylierung wie CsA·CypA, aber der Effekt auf die NFATc-abhängige Genexpression ist der gleiche. Somit könnte NCI3, da es kein Inhibitor der Phosphataseaktivität von Calcineurin ist, möglicherweise über die NFATc-Kinasen wirken.

Daher wurde der Einfluß von NCI3 auf die Aktivität wichtiger NFATc-Kinasen untersucht. Phosphogruppenfreies rekombinantes NFATc2 wurde mit GSK3 $\beta$  und PKA phosphoryliert und der Phospho-Status von NFATc2 anschließend via SDS-PAGE und Western blot gemessen. Dabei wurde die Reaktionsdauer so gewählt, daß die Phosphorylierung unvollständig war, um Abweichungen in beide Richtungen erkennen zu können. Das Verhältnis von NFATc2 zu Phospho-NFATc2 blieb auch bei Zusatz von 30  $\mu$ M NCI3 zur Phosphorylierungsreaktion gleich (Abb. 3.5). Zumindest GSK3 $\beta$  und PKA werden also durch NCI3 nicht in ihrer *in vitro*-Aktivität angeregt. Zusätzlich wurde gezeigt, daß der Phosphorylierungszustand von GSK3 $\beta$ , der *in vivo* die Aktivität der Kinase reguliert, in Zellen nicht durch NCI3 verändert



**Abb. 3.5: Der inhibitorische Effekt von NCI3 beruht nicht auf der Aktivierung von PKA und GSK3 $\beta$ .** Rekombinantes GST-NFATc2 wurde mit rekombinanter PKA und GSK3 $\beta$  in Anwesenheit von 30  $\mu$ M NCI3 oder DMSO für 30 min phosphoryliert, als Kontrollen dienten GST-NFATc2 ohne Zusatz der Kinasen und vollständig phosphoryliertes NFATc2 nach 2 h Phosphorylierung mit PKA und GSK3 $\beta$ . NFATc2 wurde im Western blot immunangefärbt, der Phosphorylierungszustand wurde über die Änderung der Elektromobilität erfaßt. Unten die densitometrische Auswertung des Western blots. Angegeben ist die prozentuale Stärke der Phospho-NFATc2-Bande bezogen auf die Summe der beiden Banden.

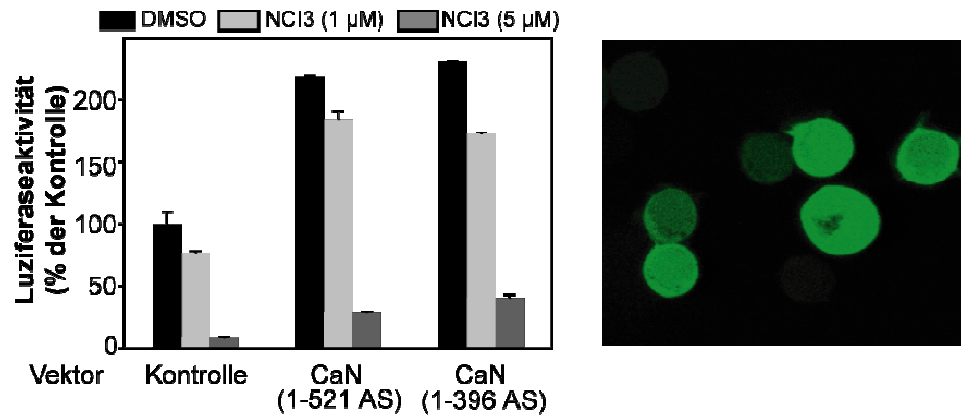
wird (U. Benary in Sieber *et al.* 2007). Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, daß NCI3 einen Effekt auf andere NFATc-Kinasen hat. Die Kinase CK1, die ebenfalls NFATc als Substrat hat, verursachte in diesem Assay keinen beobachtbaren Effekt auf die Elektromobilität von NFATc2, daher kann über die Wirkung von NCI3 auf dieses Enzym keine Aussage getroffen werden.

### **3.1.5 Die Überexpression von Calcineurin verringert den inhibitorischen Effekt von NCI3**

Die IC<sub>50</sub>-Werte für die Inhibierung der IL-2-Produktion von  $\alpha$ CD3/CD28- und PMA/Ionomycin-stimulierten T<sub>H</sub>-Zellen durch NCI3 sind nahezu identisch. Es kann angenommen werden, daß der molekulare Wirkmechanismus des Inhibitors unterhalb der Calciummobilisierung und PKC $\theta$ -Aktivierung ansetzt, da auf dieser Ebene beide Stimulationsmethoden konvergieren. NCI3 hemmt die Dephosphorylierung von NFATc2 in Zellen, und verursacht in Reporterassays, wie der Calcineurin-Inhibitor CsA, die Inhibierung der PMA/Ionomycin-ausgelösten NFAT- und NF- $\kappa$ B-abhängigen Genexpression. Daher kann vermutet werden, daß Calcineurin auch der Angriffspunkt von NCI3 ist. Eine Steigerung des Calcineuringehaltes der Zelle könnte daher die Wirkung des Inhibitors abschwächen.

Calcineurin A $\alpha$ -GFP (Aminosäuren 1–521) wurde in Jurkat-T-Zellen überexprimiert. Zusätzlich wurde NFAT-Reporterassay-Plasmid kotransfiziert. Die Überexpression von Calcineurin verringert den inhibitorischen Effekt von NCI3 auf die Aktivierung von NFATc bei niedriger Konzentration (1  $\mu$ M); höhere Konzentrationen von NCI3 (5  $\mu$ M) sind aber in der Lage, auch das überexprimierte Calcineurin zu inhibieren.

Der gleiche Effekt konnte beobachtet werden, wenn eine trunke (Aminosäuren 1–396, siehe Abb. 1.2), calmodulinunabhängig aktive Version von Calcineurin A [149] mit dem Reporterplasmid kotransfiziert wurde (Abb. 3.6). Diesem Konstrukt fehlen die autoinhibitorische Domäne und die Calmodulin-Bindestelle, während die Calcineurin B-Bindestelle und die *linker*-Region [150] vorhanden sind. Die Calmodulin-Bindung oder die autoinhibitorische Domäne sind also nicht molekularer Angriffspunkt von NCI3, da der Inhibitor auch auf diese Calcineurin A-Version wirkt.



**Abb. 3.6: NCI3 inhibiert die NFATc-Aktivierung sowohl durch Vollängen-Calcineurin A als auch durch eine trunkeerte, calmodulinunabhängige Variante.** Jurkat-T-Zellen wurden mit einem NFAT-Reportergenplasmid sowie einem Plasmid, welches das volle-Länge-Calcineurin  $\alpha$  (1-521 AS) oder eine trunkeerte (1-396 AS), calmodulinunabhängige Variante oder GFP als Kontrolle kodierte, kotransfiziert. Die Zellen wurden mit 1 oder 5  $\mu$ M NCI3 oder DMSO für 30 min vorinkubiert und dann für 5 h mit PMA/Ionomycin stimuliert. Werte sind prozentuale Lumineszenz, bezogen auf die inhibitorfreie, kontrollplasmidtransfizierte, stimulierte Probe. Werte sind Mittelwerte von Triplikaten  $\pm$  SD. Rechts eine fluoreszenzmikroskopische Aufnahme Calcineurin A-GFP-transfizierter Jurkat-T-Zellen.

Für weitere Untersuchungen des molekularen Wirkmechanismus von NCI3 wurde FITC-markiertes Calcineurin A mit biotinyliertem VIVIT-Peptid im Beisein des Inhibitors inkubiert und dann zu Streptavidin-beschichteten Sepharosebeads gegeben. Mittels Durchflußzytometrie wurde das dann peptidgebundene Calcineurin als partikelassoziierte Fluoreszenz gemessen. Diese Experimente ergaben, daß NCI3 mit der Bindung des VIVIT-Peptides an Calcineurin teilweise interferiert, aber sie nicht vollständig zu blockieren vermag (C. Brandt in Sieber *et al.* 2007; siehe auch Abb. 4.1).

## 3.2 Untersuchungen zur Expression der endogenen Calcineurin-Inhibitoren RCAN1 und Carabin in T<sub>H</sub>-Zellen

### 3.2.1 RCAN1 wird in T-Zellen exprimiert, die RNA-Expressionsmenge ist stimulationsabhängig

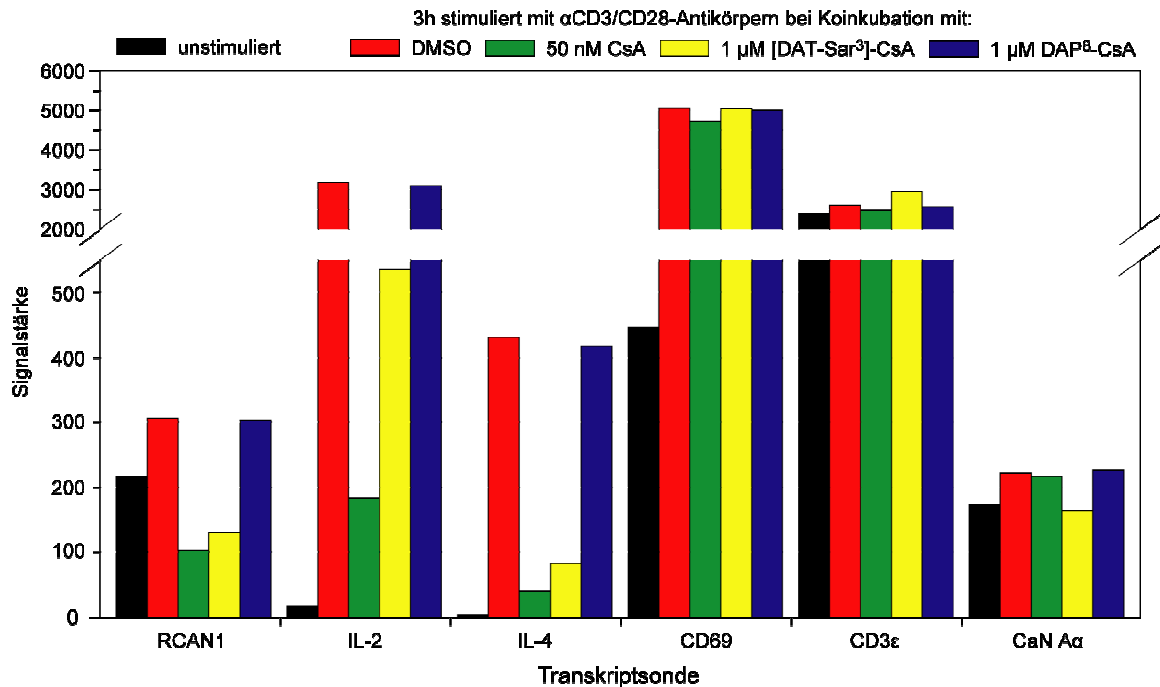
Die Expression des endogenen Calcineurin-Modulators RCAN1 ist für eine Vielzahl von Zelltypen beschrieben worden. Für die Expression und Regulation des Gens in humanen T-Zellen liegen bisher keine Daten vor.

Zur Identifizierung stimulationsabhängig regulierter Gene wurden mittels Genchip-Analysen die Transkriptome unstimulierter und mit  $\alpha$ CD3/CD28-Antikörpern stimulierter CD4<sup>+</sup> T-Zellen verglichen. Zur Identifizierung calcineurinabhängiger Genexpression wurden zusätzlich stimulierte Zellen mit verschiedenen Calcineurin-Inhibitoren behandelt, hier CsA (50 nM) und dem Derivat [DAT-Sar]<sup>3</sup>-CsA (1  $\mu$ M), das Calcineurin ohne vorherige CypA-Bindung inhibiert [151]. Außerdem wurde zur Kontrolle der monospezifische CypA-Inhibitor DAP<sup>8</sup>-CsA (1  $\mu$ M) [152] ebenfalls in die Analyse mit einbezogen. CsA blockiert durch seine Bindung an CypA dessen PPIase-Aktivität und durch diese CsA-Derivate kann zwischen Calcineurin- und PPIase-Inhibition diskriminiert werden.

Die Chipdaten zeigen, daß die Expression von *RCAN1* durch Stimulierung der T-Zellen mit PMA/Ionomycin hochreguliert wird. Dieser Anstieg der Expression ist sensitiv für CsA und [DAT-Sar<sup>3</sup>]-CsA, aber unabhängig von einer Inhibierung von CypA mit DAP<sup>8</sup>-CsA (Abb. 3.7). Das Expressionsverhalten von *RCAN1* ähnelt dem von Genen, bei deren Expression NFATc und NF- $\kappa$ B eine entscheidende Rolle spielen, wie die Zytokine IL-2 und IL-4. Allerdings weist *RCAN1* eine Basalexpression auf, während die gezeigten Zytokine in ruhenden Zellen praktisch nicht exprimiert werden. Außerdem ist die Höhe der *RCAN1*-Induktion durch TCR-Stimulation wesentlich geringer als die von IL-2 und IL-4.

Daher wird angenommen, daß die Induktion der Expression durch Calcineurin kontrolliert wird und es zusätzlich eine stimulationsunabhängige Expressionskontrolle gibt. Die Sonden auf dem verwendeten Affymetrix-Chip (Affy-ID 208370\_s\_at) unterscheiden nicht zwischen den einzelnen Spleißvarianten von RCAN1. Deren Expression wurde darum mit spezifischeren Detektionsmethoden

genauer untersucht. Da in den meisten Zellen nur die Spleißvarianten RCAN1-1 und 1-4 nachgewiesen werden konnten [129], konzentrierten sich die Untersuchungen auf diese beiden Varianten.



**Abb. 3.7: Die Expression von RCAN1 wird durch Stimulierung verstärkt und ist CsA-sensitiv.** CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurden mit DMSO (rot), 50 nM CsA (grün), 1 μM [DAT-Sar<sup>3</sup>]-CsA (gelb) oder 1 μM DAP<sup>8</sup>-CsA präinkubiert und dann 3 h mit αCD3/CD28-Antikörpern stimuliert. Die mRNA-Mengen der einzelnen Transkripte wurden mit einem Affymetrix HG\_U95A-Genchip gemessen und mit denen unstimulierter Zellen (schwarz) verglichen. Die Expression von RCAN1 wird bei Stimulierung hochreguliert und ist sensitiv für die Calcineurininhibitoren CsA und [DAT-Sar<sup>3</sup>]-CsA. Zum Vergleich Daten ausgewählter Gene, deren Expression bekanntermaßen NFATc-abhängig ist (die Zytokine IL-2 und IL-4), stimulierungsinduzierter Gene, die NFATc-unabhängig exprimiert werden (der Aktivierungsmarker CD69) und durch Stimulierung nicht induzierte Gene (die TCR-Untereinheit CD3ε und Calcineurin Aα).

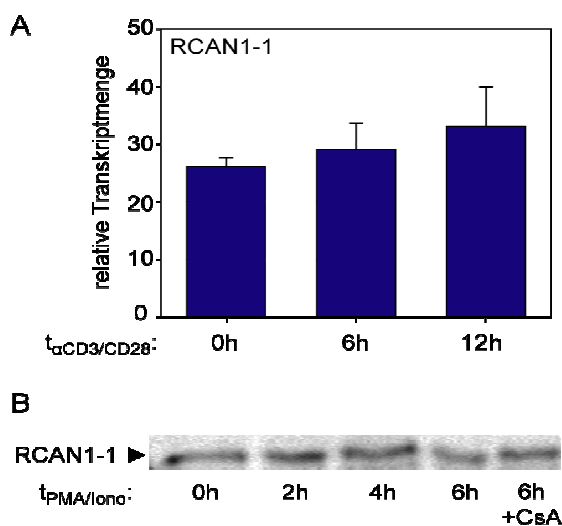
### 3.2.2 Die Spleißvariante RCAN1-1 wird stimulationsunabhängig exprimiert

Der Promotor vor dem Exon 1, der die Expression von RCAN1-1 kontrolliert, ist bisher wenig auf regulatorische Elemente untersucht worden. Bisherige Untersuchungen zeigten eine nahezu konstitutive Expression dieser Spleißvariante, die aber durch Glucokortikoide und die Aktivierung des Notch-Signalweges moduliert werden kann.

Sowohl in PMA/Ionomycin- als auch in mit αCD3/CD28-Antikörpern stimulierten primären CD4<sup>+</sup> T-Zellen konnte auf mRNA-Ebene kein Unterschied in der Expression von RCAN1-1 zwischen unstimulierten und stimulierten (6 und 12 h) Zellen



festgestellt werden (Abb. 3.8A). Die mRNA-Expression befindet sich auch im Ruhezustand auf gut detektierbarem Niveau. Die Expression von RCAN1-1 ist nicht sensitiv für CsA. Da für diese Spleißvariante Antikörper (Geschenk von D. Maldonado-Perez, Edinburgh) zur Verfügung standen, konnte die RCAN1-1 auch auf Proteinebene mittels Western blot untersucht werden. Auch hier änderte sich die Expression nicht durch Zellstimulierung. Die Größe der detektierten Bande entspricht der 252 AS „langen“ Form von RCAN1-1L. Für RCAN1-1L konnte nur eine Bande detektiert werden. Nebenbanden, die möglicherweise durch Phosphorylierungen von RCAN1-1 und damit verbundene Änderungen der Elektromobilität entstehen [115, 135], wurden nicht beobachtet (Abb. 3.8B). Mit einem murinen polyklonalen Antikörper, der in Zusammenarbeit mit Martin Listek (Universität Potsdam, AG Biotechnologie) hergestellt wurde, konnte diese Beobachtung bestätigt werden.



**Abb. 3.8. Die Expression der Spleißvariante RCAN1-1 ist stimulationsunabhängig.** RCAN1-1 wird in primären CD4<sup>+</sup> T-Zellen weder auf mRNA-Ebene (A) noch auf Proteinebene (B) hochreguliert. (A) CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurden für den angegebenen Zeitraum mit  $\alpha$ CD3/CD28-Antikörpern stimuliert und geerntet. Die relative Transkriptmenge von RCAN1-1 wurde mittels Lightcycler bestimmt. Angegebene Werte sind Quadruplikate  $\pm$  SD. (B) CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurden für den angegebenen Zeitraum mit PMA/Ionomycin in Anwesenheit von 25 nM CsA oder DMSO stimuliert, lysiert und im Western blot auf die RCAN1-1-Expression untersucht. Die gezeigte Bande liegt in der erwarteten Höhe von RCAN1-1L (34 kDa) und wurde mit einem murinen polyklonalen Antikörper detektiert.

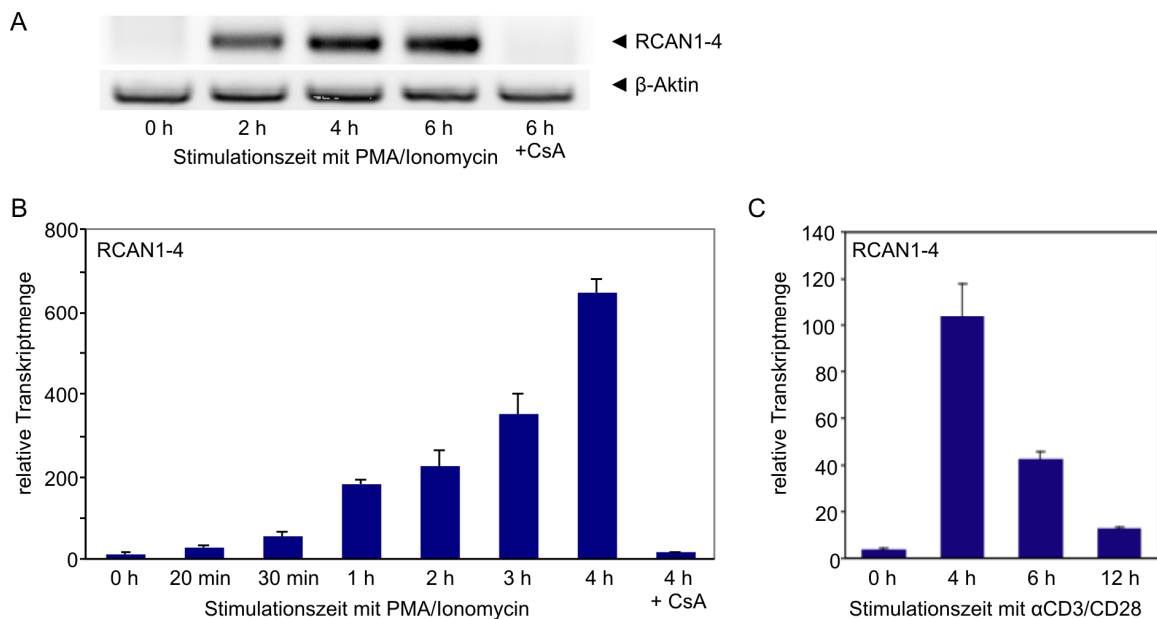
Die gesteigerte Expression von RCAN1 nach Stimulierung, die mittels Chip festgestellt wurde, ist daher auf einen Anstieg von RCAN1-4-mRNA zurückzuführen.

### 3.2.3 Die Expression der Spleißvariante RCAN1-4 wird durch Stimulierung induziert

*In silico*-Promotoranalysen der Spleißvariante RCAN1-4 zeigten, daß im Bereich von 1–800 bp vor dem Exon 4 des *RCAN1*-Genes mehrere mutmaßliche NFAT-Bindestellen lokalisiert sind. Eine vergleichbare Anhäufung von NFAT-Bindestellen

im RCAN1-1-Promotor ist dagegen nicht gefunden worden [134]. Es wird daher postuliert, daß RCAN1-4 Calcineurin-NFATc-abhängig exprimiert wird.

Durch semiquantitative und *real time*-PCR konnte gezeigt werden, daß RCAN1-4 in Jurkat-T-Zellen im Ruhezustand nur sehr schwach exprimiert wird und dessen mRNA-Menge durch Stimulierung mit PMA/Ionomycin im Laufe von 4 h stark ansteigt (Abb. 3.9A). Die Hochregulation der RCAN1-4-Expression ist sensitiv für CsA (25 nM), in Übereinstimmung mit den initialen Genchip-Beobachtungen. Dieser Befund konnte auch bei der Stimulierung von primären CD4<sup>+</sup>-T-Zellen mit PMA/Ionomycin gewonnen werden. Auch hier steigt die Expression von RCAN1-4 auf mRNA-Ebene innerhalb von 4 h stark an und kann durch CsA inhibiert werden (Abb. 3.9B). Die Expression von RCAN1-4 kann in primären T<sub>H</sub>-Zellen auch durch Stimulierung mit  $\alpha$ CD3/CD28-Antikörpern induziert werden, diese Induktion ist transient und erreicht auf mRNA-Ebene ihr Maximum bei 4 h. Danach sinkt sie wieder ab, und nach 12 h ist sie auf ein niedrigeres Niveau zurückgegangen, das aber über der basalen Expression liegt (Abb. 3.9C).



**Abb. 3.9: Die Expression von RCAN1-4 ist auf mRNA-Ebene durch Calciuminflux in T-Zellen induzierbar und CsA-sensitiv.** Jurkat-T-Zellen (A) oder primäre CD4<sup>+</sup> T-Zellen (B) wurden mit PMA/Ionomycin in Anwesenheit von 25 nM CsA oder DMSO stimuliert. Nach dem angegebenen Zeitraum wurden sie geerntet und die mRNA-Menge von RCAN1-4 semiquantitativ bestimmt. (A) cDNA wurde mit dem Primerpaar mslc3/4 25 Zyklen im Thermocycler vervielfältigt und mittels Agarosegelelektrophorese und Anfärbung durch EtBr bestimmt. Als Kontrolle wurde  $\beta$ -Aktin (20 Zyklen) vermessen. (B+C) Primäre CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurden mit PMA/Ionomycin (B) oder  $\alpha$ CD3/CD28-Antikörpern (C) stimuliert und nach den angegebenen Zeiträumen geerntet. Die Transkriptmenge von RCAN1-4 wurde im Lightcycler semiquantitativ bestimmt und auf  $\beta$ 2-Mikroglobulin normalisiert. Angegebene Werte sind Mittelwerte von Quadruplettbestimmungen  $\pm$  SD.

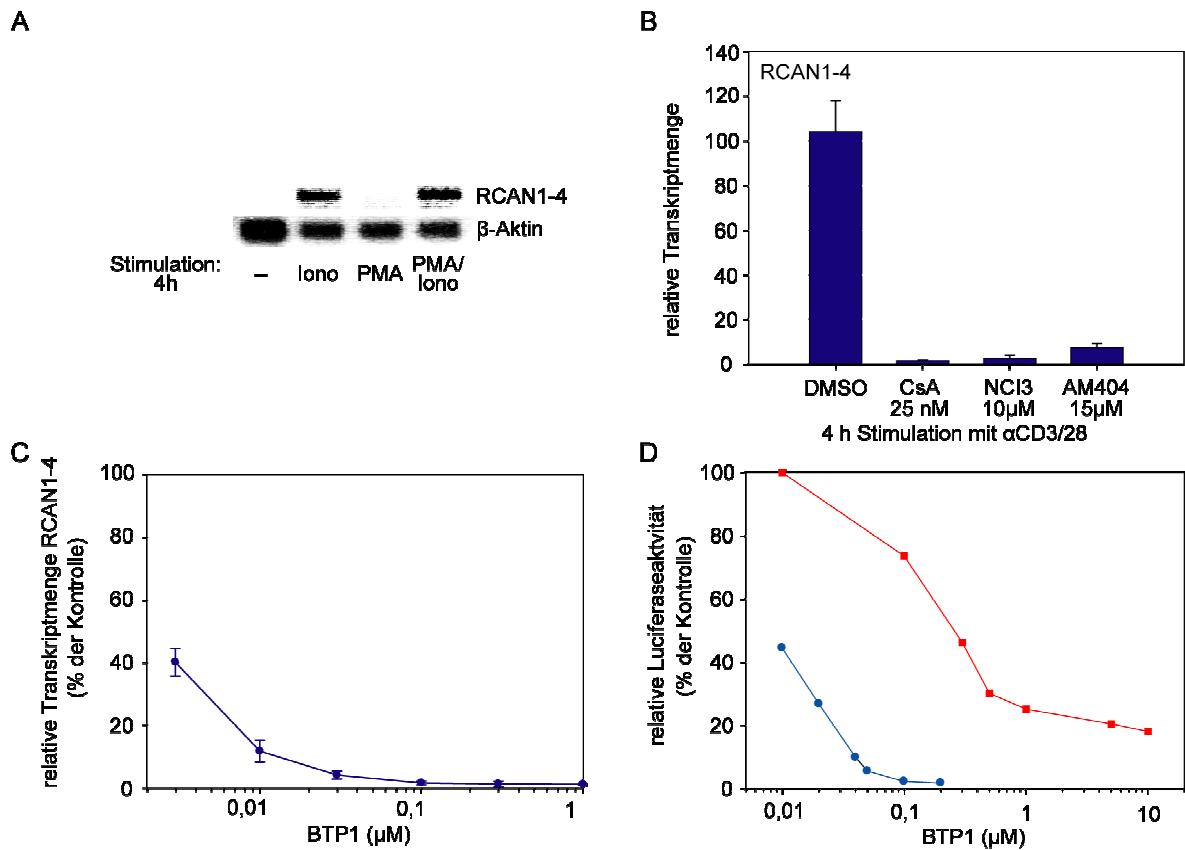
### 3.2.4 Die Expression der Spleißvariante RCAN1-4 ist Calcineurin/NFATc-abhängig

Die stimulationsbedingte Hochregulation der RCAN1-4-Expression in T<sub>H</sub>-Zellen ist durch CsA inhibierbar. Dieser Effekt von CsA beruht nicht auf der Inhibierung von CypA, da die RCAN1-Expression durch Zugabe des spezifischen Inhibitors der PPIaseaktivität von Cyclophilinen DAP<sup>8</sup>-CsA nicht geändert wird (siehe Abb. 3.7). CsA inhibiert jedoch nicht nur die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFATc, sondern moduliert zusätzlich die Aktivierung anderer Signalwege und Transkriptionsfaktoren, z. B. NF-κB. Daher ist CsA kein ideales Werkzeug zur Bestimmung der NFATc-Abhängigkeit von Genexpressionen, weshalb hier zusätzliche Methoden zur Klärung dieser Frage genutzt wurden, speziell selektive Stimulationsmethoden und spezifischere niedermolekulare Inhibitoren.

#### 3.2.4.1 Ionomycin erhöht die Expression von RCAN1-4

Die Stimulierung von Zellen mit PMA/Ionomycin aktiviert unter anderem die Transkriptionsfaktoren NFATc, NF-κB und AP-1, durch Simulation einer aktiven PLC. Dabei bewirkt PMA als Analogon zu DAG die Aktivierung der PKCθ- und Ras-abhängigen Transkriptionsfaktoren NF-κB und AP-1, während Ionomycin einen Calciumimport bewirkt, der Calcineurin und damit NFATc aktiviert. Diese Trennung ist allerdings nicht absolut, da beispielsweise Calcineurin ebenso die beiden anderen Transkriptionsfaktoren modulieren kann. Allerdings sind für die volle Aktivierung von NF-κB und AP-1 dabei trotzdem die PMA/DAG-abhängigen Signalwege notwendig.

Werden CD4<sup>+</sup> T-Zellen nun mit Ionomycin alleine stimuliert, kommt es zu einer Hochregulation der RCAN1-4-Expression. Dagegen bewirkt PMA diesen Effekt nicht. Eine Stimulierung mit PMA und Ionomycin führt wie Ionomycin allein zu einer erhöhten RCAN1-4-Expression (Abb. 3.10A).



**Abb. 3.10: Der Calcineurin-NFATc-Signalweg ist der limitierende Faktor in der RCAN1-4-Expression.** (A) RCAN1-4 kann durch Ionomycin induziert werden. Primäre CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurden mit Ionomycin, PMA oder einer Kombination stimuliert und nach 4 h geerntet. cDNA wurde mit dem Primerpaar mslc3/4 25 Zyklen im Thermocycler vervielfältigt und mittels Agarosegelelektrophorese und Anfärbung durch EtBr bestimmt. Als Kontrolle wurde β-Aktin (20 Zyklen) vermessen. (B+C) Die RCAN1-4-Expression ist sensitiv für spezifische Inhibitoren des Calcineurin-NFATc-Signalweges. Primäre CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen der Inhibitoren vorinkubiert und für 4 h mit αCD3/CD28-Antikörpern stimuliert. Die Menge an RCAN1-4-Transkript wurde mittels Lightcycler bestimmt. (C) Angegeben ist die relative Transkriptmenge, bezogen auf eine stimulierte, mit DMSO vorbehandelte Kontrolle. Werte sind Mittelwerte von Quadruplikaten ±SD. (D) BTP1 inhibiert NFATc (blau) spezifischer als NF-κB (rot). Jurkat-T-Zellen wurden mit Luciferase-Reportergenplasmiden für NFAT- oder NF-κB-Aktivierung transfiziert, mit BTP1 oder DMSO präinkubiert und dann für 5 h mit PMA/Ionomycin stimuliert.

### 3.2.4.2 Selektivere Calcineurin-NFATc-Inhibitoren verringern die Expression von RCAN1-4

CsA inhibiert die NFATc- und NF-κB-abhängige Genexpression mit vergleichbaren IC<sub>50</sub>-Werten. Mittlerweile wurden alternative Inhibitoren identifiziert oder synthetisiert, die spezifischer den Calcineurin-NFATc-Signalweg unterdrücken [145]. Dazu gehören die Substanzen NCI3, AM404, und BTP1. NCI3 inhibiert wahrscheinlich die Bindung von NFATc an Calcineurin und AM404 die nukleäre Translokation des dephosphorylierten NFATc [153, 154]; der Wirkmechanismus von BTP-1 ist bislang nicht vollständig geklärt [155]. Alle drei Inhibitoren sind unabhängig von Im-

munophilinen, im Gegensatz zu CsA. Es wurde untersucht, wie diese ausgewählten Substanzen die Expression von RCAN1-4 beeinflussen.

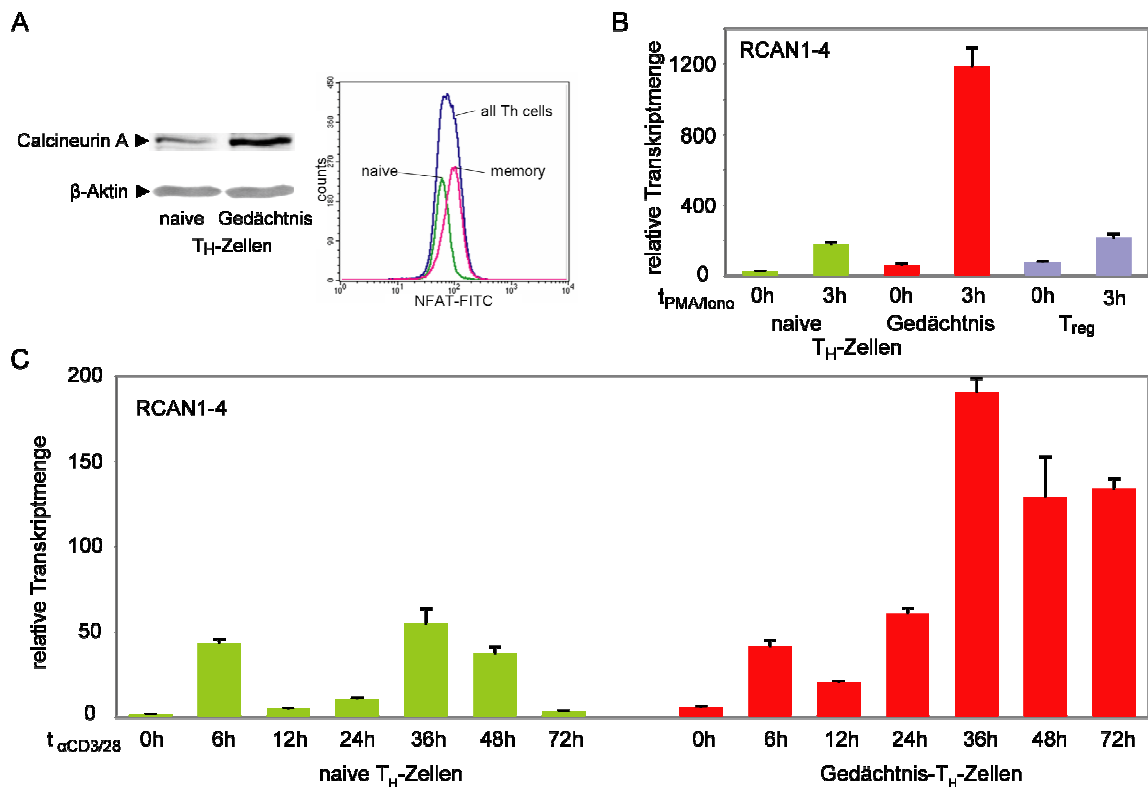
Die Expression der RCAN1-4-mRNA nach 4 h Stimulierung mit  $\alpha$ CD3/CD28-Antikörpern kann nicht nur durch die Zugabe von 25 nM CsA inhibiert werden, sondern auch durch die Vorinkubation der Zellen mit 10  $\mu$ M NCI3 oder 15  $\mu$ M AM404 (Abb. 3.10B). Bei diesen Konzentrationen wird der NFATc-Signalweg wesentlich stärker inhibiert als NF- $\kappa$ B. Dies wird besonders deutlich, wenn die Dosis-Wirkungs-Kurven von BTP1 bezüglich der PMA/Ionomycin-induzierten, NFAT- und NF- $\kappa$ B-abhängigen Reporterexpression mit der bezüglich der RCAN1-4-Expression verglichen werden (Abb. 3.10C). Diese zeigen, daß die Expression von RCAN1-4 ähnlich von BTP1 gehemmt wird wie die Expression des NFATc-kontrollierten Reportergens. NFATc scheint also der limitierende Faktor für die RCAN1-4-Expression zu sein.

#### 3.2.4.3 Die Expression von RCAN1-4 in $T_H$ -Subpopulationen korreliert mit deren Calcineurin- und NFATc-Gehalt

Die selektive Überexpression einzelner Signaltransduktionskomponenten ist ein gutes Werkzeug, den Einfluß dieser Komponenten auf bestimmte Ereignisse zu untersuchen. Zelllinien sind zwar oft gut transfizierbar, weisen möglicherweise aber Defekte in der Signaltransduktion auf. Jurkat-T-Zellen exprimieren beispielsweise kein CD28 und können trotz PMA/Ionomycin-Stimulation kein IL-2 produzieren. Primäre humane CD4<sup>+</sup>  $T_H$ -Zellen können dagegen im unstimulierten Zustand nur schlecht transfiziert werden. Präaktivierte  $T_H$ -Zellen können mit viralen und nichtviralen Transfektionsmethoden transfiziert werden, jedoch nur mit geringer Effizienz oder zytotoxischen Nebeneffekten. Zusätzlich ändert eine Präaktivierung den *status quo* der Zelle, so wird die Expression von Transkriptionsfaktoren und Zytokinen angeregt und die Zellen können möglicherweise differenzieren. Daher wurden primäre  $T_H$ -Zell-Subpopulationen genutzt, die sich von vornherein in der Expression bestimmter Signalproteine unterscheiden; gewählt wurden naive und Gedächtnis- $T_H$ -Zellen.

Naive  $T_H$ -Zellen differenzieren nach Stimulierung des TCR, also nach Kontakt mit dem Antigen, und unter IL-2-Einfluß zu Gedächtnis- $T_H$ -Zellen [156, 157]. Gedächtnis-

nis- $T_H$ -Zellen sind in der Lage, nach TCR-Stimulierung schneller und auch mehr Zytokine zu produzieren als naive  $T_H$ -Zellen [158, 159]. Diese  $T_H$ -Zell-Subpopulationen lassen sich grob vereinfacht (U. Benary, Diplomarbeit 2006) nach der Expression verschiedener Spleißvarianten des kostimulatorischen Rezeptors CD45 klassifizieren: naive  $T_H$ -Zellen exprimieren die Variante CD45RA, während Gedächtnis- $T_H$ -Zellen die Variante CD45RO auf der Zelloberfläche tragen [160]. Es existieren allerdings auch CD45RA/RO-doppeltpositive Zellen [161]. Diese doppelpositive Fraktion ist nicht genau charakterisiert und wurde daher von den Untersuchungen ausgeschlossen.



an NFATc2 aufweisen (Abb. 3.11A rechts, H. Bendfeldt, persönliche Kommunikation). Außerdem exprimieren diese Zellen mehr Calcineurin (Abb. 3.11A links). Passend zu diesem höheren Niveau der Calcineurin-NFATc-Signalwegskomponenten weisen Gedächtnis-T<sub>H</sub>-Zellen eine leicht erhöhte Basalexpression an RCAN1-4 auf, und die Hochregulation der RCAN1-4-Expression fällt nach 3 h PMA/Ionomycin-Stimulierung bei Gedächtnis-T<sub>H</sub>-Zellen wesentlich stärker aus als bei naiven. Eine dritte CD4<sup>+</sup> Subpopulation, die regulatorischen T-Zellen (T<sub>reg</sub>), deren Calcineurin- und NFATc2-Gehalt dem von naiven T<sub>H</sub>-Zellen vergleichbar ist (H. Bendfeldt, persönliche Kommunikation), weisen auch eine vergleichbare Basalexpression und Hochregulation von RCAN1-4 wie diese auf (Abb. 3.11B).

Die stärkere Hochregulation der RCAN1-4-mRNA in Gedächtnis-T<sub>H</sub>-Zellen läßt sich auch bei TCR-Stimulierung mit  $\alpha$ CD3/CD28-Antikörpern zeigen. Dieser Unterschied bleibt auch bei längerer Stimulierungsdauer (bis 72 h) erhalten (Abb. 3.11C).

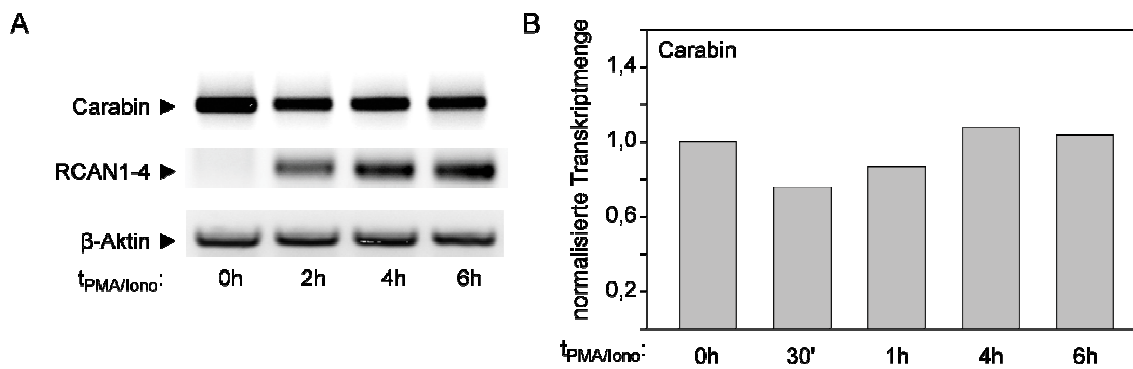
Die vorliegenden Daten lassen den Schluß zu, daß die Expression von RCAN1-4 in primären humanen CD4<sup>+</sup> T-Zellen und in Jurkat-T-Zellen Calcium-, Calcineurin- und NFATc-abhängig induzierbar ist.

### **3.2.5 Die Expression des endogenen Calcineurininhibitors Carabin in T<sub>H</sub>-Zellen ist stimulierungsunabhängig**

Der dual-wirkende endogene Inhibitor Carabin, kodiert vom Gen *TBC1D10C*, besitzt eine calcineurinbindende und -inhibierende sowie eine Ras-inhibierende Domäne. Damit kann Carabin nicht nur calcineurinabhängige Signalwege, wie die TCR-ausgelöste NFATc- und NF- $\kappa$ B-Aktivierung blockieren, sondern auch die Ras-abhängigen MAPK-Kaskaden, die zur Aktivierung von AP-1 führen (siehe Abb. 1.1 bis 1.5). Pan *et al.* zeigen, daß die Expression von Carabin in humanen naiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen durch Stimulierung mit  $\alpha$ CD3/CD28-Antikörpern induzierbar ist. Damit würde über Carabin ein negativer Rückkopplungsmechanismus realisiert werden, der mehrere Signalwege modulieren kann [162].

Dieser postulierte Rückkopplungsmechanismus stellt ein interessantes System dar, um T-Zellen vor Überstimulation zu bewahren und in ihrer Reaktion auf Stimuli zu

steuern und sollte daher genauer untersucht werden. Da in der Publikation von Pan *et al.* zu genau diesem Experiment keine Materialien angegeben sind, wurden eigene Oligonukleotide für die semiquantitative PCR erstellt. Die Hochregulation der Expression von Carabin durch PMA/Ionomycin-Stimulierung konnte aber nicht beobachtet werden, weder in Jurkat-T-Zellen noch in primären CD4<sup>+</sup> T-Zellen. In ruhenden wie in stimulierten Zellen konnte in wiederholten Experimenten eine hohe Expression von Carabin festgestellt werden (Abb. 3.12). Artefakte durch Verunreinigung mit genomischer DNA konnten durch die Verwendung von gDNA-bindenden Säulen bei der mRNA-Präparation sowie von intronüberspannenden Primern bei der Detektions-PCR ausgeschlossen werden. Die Regulation der Carabin-Expression bedarf daher weiterer Klärung.



**Abb. 3.12: Carabin ist in ruhenden T-Zellen exprimiert und wird nicht erst durch Stimulierung induziert.** Jurkat-T-Zellen (A) oder primäre humane CD4<sup>+</sup> T-Zellen (B) wurden mit PMA/Ionomycin stimuliert und nach den angegebenen Zeiten geerntet. (A) cDNA wurde mit dem Primerpaar mslc11/12 25 Zyklen im Thermocycler vervielfältigt und mittels Agarosegelelektrophorese und Anfärbung durch EtBr bestimmt. Als Kontrolle wurde RCAN1-4 (25 Zyklen) und β-Aktin (20 Zyklen) vermessen. (B) Die relative Transkriptmenge von Carabin wurde mit dem Primerpaar mslc11/12 mittels Lightcycler bestimmt und auf den Wert der unstimulierten Probe normalisiert. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment.



## 4 Diskussion

### 4.1 Der niedermolekulare Calcineurin-NFATc-Inhibitor NCI3

Bei der Suche nach alternativen Inhibitoren des Calcineurin-NFATc-Signalweges ist die Substanz NCI3 als Immunsuppressivum identifiziert worden. NCI3 ist zellmembranpermeabel, im getesteten Konzentrationsbereich (bis 30  $\mu\text{M}$ ) nicht toxisch und unterdrückt nicht die allgemeine Genexpression.

NCI3 inhibiert die Dephosphorylierung von NFATc nach T-Zellstimulierung, und NFATc transloziert daher nicht in den Zellkern. Damit kann NFATc nicht als Transkriptionsfaktor wirken. Die Expression oder Repression entsprechend kontrollierter Gene wird nicht initiiert.

#### 4.1.1 Wirkt NCI3 über Calcineurin?

NCI3 unterdrückt die IL-2-Produktion stimulierter T-Zellen und die über dieses Zytokin autokrin und parakrin angeregte Proliferation der Zellen (Abb. 3.2). Reporterexperimente zeigen, daß dies auf einer Verminderung der NFATc- und auch NF- $\kappa$ B-abhängigen transkriptionellen Aktivität beruht (Abb. 3.3). Dieser Effekt kann durch verschiedene mögliche Wirkmechanismen hervorgerufen werden, wie die jeweils angeführten Beispiele ausgewählter Inhibitoren des Calcineurin-NFATc-Signalweges zeigen (z. B. BTP2, Gossypol, ST1959 oder Dipyrindamol).

#### *NCI3 und die $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung durch proximale TCR-Signatransduktion*

Die Untersuchung der IL-2-Produktion primärer T-Zellen zeigt, daß NCI3 unabhängig von der verwendeten Stimulierungsmethode wirkt. NCI3 inhibiert sowohl die  $\alpha\text{CD3}/\text{CD28}$ - als auch die PMA/Ionomycin-induzierte IL-2-Produktion mit vergleichbaren  $\text{IC}_{50}$ -Werten (4  $\mu\text{M}$ , Abb. 3.2A). Beide Stimulierungsmethoden ahmen die antigenspezifische Stimulierung der T-Zellen nach, wenn auch auf verschiedenen Ebenen des TCR-Signalweges.  $\alpha\text{CD3}$ - und  $\alpha\text{CD28}$ -Antikörper wirken über die Quervernetzung von TCR-Molekülen bzw. die Bindung an den kostimulatorischen Rezeptor CD28 auf der Zelloberfläche. PMA und Ionomycin dagegen wirken unterhalb der TCR-aktivierten PLC $\gamma$ , indem sie direkt PKC $\theta$  und RasGRP/Ras aktivieren bzw. eine Erhöhung des cytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegels bewirken (siehe Abb. 1.1).

NCI3 wirkt also unabhängig von der Methode, mit der ein Calciuminflux erzeugt wurde. Vorversuche mit einem calciumsensitiven Fluorophor (INDO-1) zeigten zusätzlich, daß NCI3 die Calciummobilisierung in Jurkat-T-Zellen nach Ionomycinzugabe nicht störte. Der Calcineurin-NFATc-Inhibitor BTP-2 dagegen inhibiert den  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx, indem er die Zellmembran durch Aktivierung eines nichtselektiven Kationenkanals depolarisiert [163-165].

Aus den Beobachtungen kann geschlossen werden, daß NCI3 unterhalb der Ebene PKC/cytosolisches  $\text{Ca}^{2+}$ -Niveau wirkt.

#### *NCI3 und die Phosphataseaktivität von Calcineurin*

Ein Mechanismus zur Unterdrückung der NFATc-abhängigen Genexpression, der unterhalb der Calciummobilisierung ansetzt, ist die Inhibierung der Phosphatase-Aktivität von Calcineurin. Dieses Enzym ist essentiell und zentral an der Weiterleitung des TCR-Signales in den Zellkern beteiligt. Calcineurin ist die einzige physiologische Phosphatase, die den Transkriptionsfaktor NFATc dephosphoryliert und damit aktiviert. Die Inhibierung von Calcineurin kann auf verschiedenen Wegen erfolgen. Eine Möglichkeit ist die direkte Inhibierung der enzymatischen Aktivität durch Interferenz mit dem aktiven Zentrum. Nichtselektive Phosphataseinhibitoren wie Tyrphostine [166] oder Norcantharidin [167] binden im aktiven Zentrum aller PPP-Proteinphosphatasen, während Substanzen wie Dibefurin [168] oder Gossypol [144, 169] selektiv die enzymatische Aktivität von Calcineurin inhibieren. Mit Okadasäure (*okadaic acid*) oder Endothall können in nanomolaren Konzentrationsbereichen gezielt PP1 und PP2A inhibiert werden, da sie für diese Inhibitoren viel empfindlicher als Calcineurin (ca. um den Faktor 1000) sind [170]. Alternativ kann der Zugang von Substraten zum aktiven Zentrum von Calcineurin inhibiert werden, wobei die enzymatische Aktivität von Calcineurin intakt bleibt. CsA und FK506 wirken im Komplex mit ihren jeweiligen Immunophilinen auf diese Weise, das CsA-Derivat [DAT-Sar]<sup>3</sup>-CsA [151] auch unkomplexiert. Ein Peptid, das von der autoinhibitorischen Domäne (AID, siehe Abb. 1.2) von Calcineurin abgeleitet ist (AID<sub>457-482</sub>), blockiert wie diese den Zugang zum aktiven Zentrum des Enzyms, im Gegensatz zur AID aber auch bei aktiviertem Calcineurin [171].

NCI3 blockiert zwar, wie diese anderen Inhibitoren auch, die Dephosphorylierung von NFATc in Zellen, beeinflusst aber nicht das katalytische Zentrum von Calcineu-

rin an sich. In Vorversuchen inhibierte NCI3 nicht die Dephosphorylierung des R<sub>II</sub>-Phosphopeptides und Phosphocaseins durch rekombinantes Calcineurin, allerdings in geringem Maße die Dephosphorylierung des niedermolekularen synthetischen Substrates pNPP. NCI3 unterscheidet sich darin von CsA, das im Dimer mit CypA die calcineurinvermittelte Dephosphorylierung von Peptidsubstraten inhibiert, gleichzeitig aber die Phosphataseaktivität gegen pNPP verstärkt [86, 98, 99, 151].

#### *NCI3 und die NFATc-Rephosphorylierung*

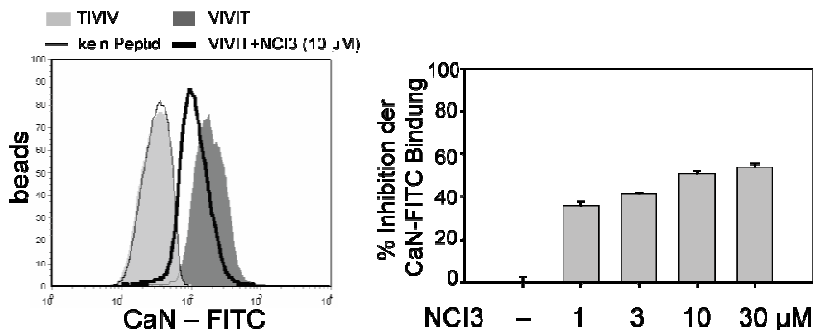
Nicht nur die Inhibierung der NFATc-Dephosphorylierung, sondern auch eine verstärkte NFATc-Rephosphorylierung durch bestimmte Kinasen kann dazu führen, daß durch den Export des phosphorylierten Transkriptionsfaktors ins Zytosol die stimulationsinduzierte NFAT-vermittelte Genexpression gehemmt wird. Der NFATc-Inhibitor Rocaglamid beispielsweise verstärkt die Aktivität der NFATc-Kinase p38 MAPK und reduziert so die Expression von IL-2 und anderen Zytokinen [147]. Für NCI3 konnte ausgeschlossen werden, daß eine Verstärkung der Aktivität der prominenten NFATc-Kinasen PKA und GSK3 $\beta$  zu den beobachteten inhibitorischen Effekten führt (Abb. 3.5). Allerdings bleibt offen, ob NCI3 die Aktivität anderer Kinasen erhöht, die ebenfalls als NFATc-Kinasen diskutiert werden. Dazu gehören CK1, p38 MAPK oder DYRK1.

#### *NCI3 und die Calcineurin-NFATc-Interaktion*

NFATc interagiert mit Calcineurin nicht nur im Bereich der Serin-Phosphorylierungsstellen, sondern auch zusätzlich über mindestens zwei andere Bindemotive, das PxIxIT- und das LxVP-Motiv. Eine Störung der Bindung dieser Motive würde die Interaktion zwischen beiden Proteinen inhibieren. NFATc2 bindet Calcineurin hauptsächlich über das PxIxIT-Motiv, und nur sehr schwach über das LxVP-Motiv, NFATc1 besitzt ein LxVP-Motiv mit höherer Calcineurinaffinität und bindet daher über beide Motive. Die Binderegion für das PxIxIT-Motiv ist im Gegensatz zu der des LxVP-Motivs nicht in unmittelbarer Nähe des aktiven Zentrums [54, 55]. Daher ist eine Störung der PxIxIT-Binderegion geeignet, die Calcineurin-NFATc-Interaktion zu inhibieren. Dabei wird die katalytische Aktivität von Calcineurin

nicht beeinflusst, und Substrate, die nicht über dieses Motiv binden, können trotzdem dephosphoryliert werden. Das VIVIT-Peptid ist durch Aminosäuresubstitution aus dem PxIxIT-Motiv von NFATc geschaffen worden [146] und kann NFATc von Calcineurin kompetitiv verdrängen. Dabei wirkt es selektiver auf verschiedene calcineurinabhängige Signalwege als CsA. Auch der Inhibitor Dipyridamol greift wahrscheinlich an der PxIxIT-Calcineurin-Wechselwirkung an [58, 172], wurde aber wegen seiner erst kürzlichen Charakterisierung in dieser Arbeit nicht als Kontrolle verwendet.

Das Calcineurin-VIVIT-Bindungsassay zeigt, daß NCI3 die Bindung zwischen beiden Komponenten teilweise stört (Abb. 4.1). Allerdings wird auch bei hohen NCI3-Konzentrationen die Bindung des VIVIT-Peptides an Calcineurin nicht komplett blockiert. Das VIVIT-Peptid bindet wesentlich stärker an Calcineurin als das in NFATc2 enthaltene SPRIEIT-Motiv, was durch die nur teilweise Störung der Calcineurin-VIVIT-Interaktion durch NCI3 nicht kompensiert wird. Die verbleibende VIVIT-Calcineurin-Bindung reicht dann wahrscheinlich aus, im NFATc2-Dephosphorylierungsassay (Abb. 3.4B) die Calcineurin-NFATc2-Bindung zu inhibieren.



**Abb. 4.1:** NCI3 inhibiert teilweise die Bindung des VIVIT-Peptides an Calcineurin. FITC-markiertes Calcineurin A wurde mit den biotinylierten Peptiden inkubiert und dann zu Streptavidin-beschichteten Sepharosebeads gegeben. Mittels Durchflußzytometrie wurde das peptidgebundene Calcineurin als partikelassoziierte Fluoreszenz gemessen. Für die Messungen mit Inhibitor wurde Calcineurin mit NCI3 oder DMSO vorinkubiert. Links die Daten eines repräsentativen Experiments, rechts die Daten von zwei Experimenten in Triplikaten. Daten sind Mittelwerte  $\pm$  SD. C. Brandt in Sieber *et al.* 2007

Die Daten des Bindungsassays legen nahe, daß NCI3 über eine Störung der Calcineurin-NFATc-Wechselwirkung am PxIxIT-Motiv wirkt. Dies erklärt auch den additiven Effekt von CsA und NCI3 auf die Inhibition der NFATc-abhängigen Reporterexpression (Abb. 3.3B). Der CsA·CypA-Komplex bindet an Calcineurin an einer Bindetasche, die durch Reste der katalytischen Domäne, der Calcineurin B-

bindenden Domäne und Calcineurin B gebildet wird [97]. Diese Bindestelle überlappt nicht mit der PxlIT-Bindestelle [56], und CsA·CypA stört nicht die Bindung von PxlIT-Peptiden an Calcineurin [58], im Gegensatz zu NCI3. Durch CsA·CypA und NCI3 werden also zwei verschiedene Substratbindungsstellen blockiert.

Trotz der Interferenz mit der Calcineurin-PxlIT-Bindung ist NCI3, im Gegensatz zum VIVIT-Peptid, kein Inhibitor der NFATc-Dephosphorylierung in Zellysaten. Die Modulierung der PxlIT-Binderegion von Calcineurin durch NCI3 scheint daher nicht die Calcineurin-NFATc-Interaktion direkt zu inhibieren.

#### *NCI3 und Calcineurin-bindende Proteine*

Möglicherweise modifiziert NCI3 die Konformation von Calcineurin dermaßen, daß die PxlIT-bindende Domäne oder andere Protein-Protein-Interaktionsstellen in ihrer Affinität zu den verschiedenen calcineurinbindenden Proteinen verändert werden. Dadurch könnte NCI3 die Interaktion zwischen Calcineurin und anderen Partnerproteinen modulieren. Diese Proteine könnten als Kofaktor oder zelluläre Ankerproteine dienen. In Zellysaten würden dann diese Proteine die Dephosphorylierung von NFATc durch Calcineurin nicht beeinflussen, weil sie unter diesen Bedingungen entweder nicht in der richtigen Konzentration oder Lokalisierung vorliegen. So ist beispielsweise für das Protein Bcl-2 gezeigt worden, daß es im Komplex mit FKBP38 Calcineurin bindet und zu den Mitochondrien und an das Endoplasmatische Retikulum transloziert. [173, 174]. In diesem Zustand steht Calcineurin dann nicht mehr für die NFATc-Dephosphorylierung zur Verfügung, obwohl seine Phosphataseaktivität intakt ist. Der Bcl-2/FKBP38-abhängige inhibitorische Mechanismus würde allerdings nur in intakten Zellen funktionieren, aber nicht in Zellysaten, da er auf einer Calcineurinrelokalisierung innerhalb der Zellstruktur beruht. Falls NCI3 die Calcineurin-Bcl-2-Bindung verstärkt, könnte in intakten T-Zellen weniger Calcineurin für die NFATc-Dephosphorylierung zur Verfügung stehen, da es an die Mitochondrien rekrutiert wird. In Zellysaten dagegen würde Calcineurin trotz Bindung an Bcl-2 mit NFATc interagieren können, da die Zellmembranen zerstört sind.

Calcineurin besitzt ein breites Spektrum an potentiellen Interaktionspartnern, die als Substrate, Inhibitoren oder Ankerproteine dienen können [109]. Einige dieser Proteine verfügen wie NFATc2 oder RCAN1 über eine PxlIT-Domäne, beispiels-

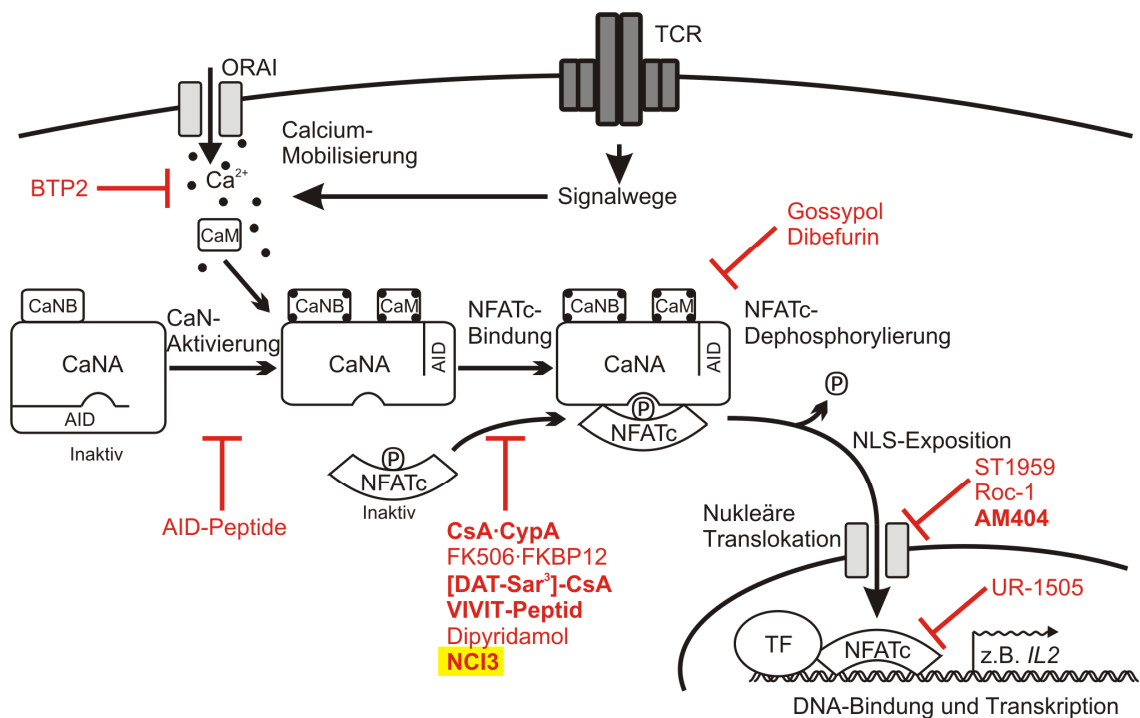
weise AKAP79 oder CABIN1. Welche dieser Proteine nun mit Calcineurin in Anwesenheit von NCI3 anders wechselwirken könnten als in dessen Abwesenheit, muß durch weitere Experimente geklärt werden. Möglich wären Ko-Immuno-präzipitationsexperimente, bei denen Calcineurin in An- oder Abwesenheit von NCI3 zusammen mit assoziierten Proteinen isoliert wird. Die Identifikation der unterschiedlichen Assoziationspartner könnte dann dazu beitragen, diese Frage zu beantworten.

#### *NCI3 und die Interaktion mit Calcineurin*

Der genaue Wirkmechanismus von NCI3 ist nicht völlig klar. Es gibt jedoch einige Hinweise auf eine direkte Calcineurin-NCI3-Interaktion. Erstens interferiert NCI3 partiell mit der Calcineurin-VIVIT-Interaktion im Bindungsassay. Zweitens inhibieren die strukturell verwandten Substanzen NCI1 und 2 Calcineurin, aber nicht die anderen Ser/Thr-Phosphatasen der PPP-Familie. Drittens inhibiert NCI3 minimal die Dephosphorylierung von pNPP durch Calcineurin. Viertens wirkt NCI3 in der Calcineurin-NFATc-Signalkette unterhalb der Calciummobilisierung und PKC-Aktivierung, aber oberhalb der NFATc-Dephosphorylierung. Calcineurin ist genau an dieser Stelle in der TCR-abhängigen Signaltransduktion lokalisiert. Außerdem ist Calcineurin einzigartig in seinen Eigenschaften als  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-abhängige und NFATc-dephosphorylierende Proteinphosphatase [36]. Fünftens inhibiert NCI3 sowohl den PMA/Ionomycin-induzierten NFATc- als auch NF- $\kappa$ B-Signalweg, die beide von Calcineurin beeinflusst werden [60]. Sechstens werden die Effekte von NCI3 partiell durch die ektopische Überexpression von Calcineurin A in Jurkat-T-Zellen kompensiert.

Direkte Bindungsstudien von NCI3 und Calcineurin sollten in Kooperation mit der Humboldt-Universität die Interaktion beider Moleküle untersuchen. Leider konnten durch die hohe Autofluoreszenz von NCI3 in den verwendeten Spektralbereichen keine Daten dazu gewonnen werden.

Nach den vorliegenden Ergebnissen kann NCI3 als Inhibitor der Calcineurin-NFATc-Interaktion eingeordnet werden (Abb. 4.2). Weitere Untersuchungen sind jedoch nötig, um den molekularen Wirkmechanismus von NCI3 vollständig aufzuklären.



**Abb. 4.2: Der Calcineurin-NFATc-Signalweg kann an verschiedenen Stellen inhibiert werden.** Nach rezeptorinduziertem  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in die Zelle binden Calmodulin (CaM) und Calcineurin B (CaNB)  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen und aktivieren Calcineurin, indem sie in der Untereinheit A (CaNA) einen Konformationswechsel induzieren. Aktiviertes Calcineurin bindet NFATc und dephosphoryliert anschließend den Transkriptionsfaktor. Dephosphoryliertes NFATc exponiert seine Kernlokalisierungssequenz (NLS) und wird dadurch in den Kern transportiert, wo es an die entsprechenden DNA-Sequenzen bindet, meist in Kombination mit anderen Transkriptionsfaktoren (TF). NFATc wird durch Rephosphorylierung und folgende Translokation ins Zytosol deaktiviert. Verschiedene Schritte in diesem Signalweg werden durch bestimmte Substanzen moduliert, wodurch eine Inhibition der NFATc-abhängigen Genexpression eintritt. Eine Auswahl an Inhibitoren wird (in rot) mit ihrem Angriffspunkt gezeigt; die in dieser Arbeit verwendeten Inhibitoren sind fett hervorgehoben. NCI3 inhibiert vermutlich die CaN-NFATc-Interaktion. AID: autoinhibitorische Domäne von Calcineurin A.

#### 4.1.2 Ist NCI3 eine mögliche Alternative zu CsA?

CsA und FK506 sind Calcineurininhibitoren, die die Transplantationsmedizin revolutioniert haben. Mit ihnen ist die Unterdrückung der adaptiven Immunantwort und damit der Transplantatabstoßung möglich geworden. Auch in der Dermatologie werden beide Substanzen erfolgreich eingesetzt. Allerdings verursacht die Applikation dieser Immunsuppressiva schwere Nebenwirkungen, die ihre Anwendung limitieren [175].

CsA und FK506 wirken inhibitorisch auf Calcineurin, indem sie an ihre Immophilinen binden und dieser Komplex nicht nur durch seine Größe den Substratzugang zum aktiven Zentrum der Phosphatase sterisch behindert, sondern außerdem

die Bindestelle für das LxVP-Motiv calcineurinbindender Proteine blockiert. CsA·CypA und FK506·FKBP wirken so als Calcineurininhibitoren unspezifisch für alle Proteinsubstrate. Zusätzlich inhibieren CsA und FK506 durch Bindung an ihre Immunophiline deren PPIase-Aktivität.

Darum wurden sowohl für die klinische Anwendung als auch für die Grundlagenforschung alternative Inhibitoren gesucht, die möglichst monospezifisch sind und daher weniger Nebenwirkungen als CsA und FK506 aufweisen bzw. selektiver nur einzelne Signalwege inhibieren sollten.

Es wurden Derivate von CsA und FK506 identifiziert, die monospezifisch die PPIasen inhibieren, ohne im Komplex mit den Immunophilinen an Calcineurin zu binden [152, 176, 177]. Mittels dieser Substanzen konnte gezeigt werden, daß die Nephrotoxizität von CsA und FK506 unabhängig von ihrer Immunophilinbindung ist [178]. Sie ist damit Resultat der Calcineurin-Inhibierung.

Eine Möglichkeit, diese Calcineurin-basierten Nebeneffekte zu minimieren, ist die Reduzierung der Dosierung. Calcineurin ist in T-Zellen, im Gegensatz zu Nerven- und Muskelzellen, relativ gering exprimiert. Damit sollte eine niedrigere CsA-Dosis die Calcineurin-Aktivität in T-Zellen und damit deren immunologische Funktion inhibieren können, während die Effekte des Inhibitors in anderen Geweben durch höheren Calcineuringehalt nicht so ausgeprägt sein sollten [47].

Dieser Weg wird zur Zeit in der klinischen Routine genommen. Zusätzlich können CsA und FK506 in Kombinationstherapie mit Immunsuppressiva mit anderen Wirkmechanismen gegeben werden, wie monoklonalen Antikörpern (z. B. Infliximab gegen TNF $\alpha$  oder Basiliximab zur Blockade des IL-2-Rezeptors) oder Rapamycin. Auch werden ähnliche Substanzen in der Dermatologie ektopisch lokal aufgetragen, statt sie systemisch zu applizieren.

Eine andere Möglichkeit wäre, Inhibitoren zu entwickeln, die selektiver einzelne calcineurinabhängige Ereignisse stören als CsA und FK506. In Vorversuchen wurde festgestellt, daß CsA im Luciferase-Reporterassay die NFAT- und NF- $\kappa$ B-abhängige Genexpression mit nahezu gleichem IC<sub>50</sub>-Wert (ca. 3 nM) inhibiert. NCI3 ist dagegen selektiver für NFAT (IC<sub>50</sub> von 2  $\mu$ M vs. 7  $\mu$ M für NF- $\kappa$ B). Dieser Unterschied liegt vermutlich im Wirkmechanismus begründet, da CsA·CypA die



Phosphataseaktivität von Calcineurin für eine Vielzahl von Proteinsubstraten inhibiert, während NCI3 die Substratbindung moduliert und kaum mit der Phosphataseaktivität interferiert. Es wird vermutet, daß Inhibitoren mit diesem Wirkmechanismus generell niedrigere Toxizität und Nebenwirkungen aufweisen [108, 146]. Es ist jedoch unklar, inwieweit diese Effekte von CsA auf die Inhibierung der NFATc-Aktivierung, der Dephosphorylierung anderer Calcineurinsubstrate oder Prozesse jenseits von Calcineurin zurückzuführen sind, wie z. B. die Inhibierung des proteasomalen Proteinabbaus.

In der klinischen Routine wird NCI3 wohl kein Ersatz für CsA und FK506 sein. NCI3 muß im mikromolaren Bereich eingesetzt werden, um in kultivierten Zellen die Aktivierung von NFATc zu inhibieren, und Effekte von NCI3 *in vivo* sind bisher nicht untersucht. Der Kenntnisstand über die Wirkungen von CsA und FK506 *in vivo* dagegen ist durch Jahrzehnte intensiver Forschung ungleich höher. In der Grundlagenforschung jedoch kann NCI3 als Inhibitor des Calcineurin-NFATc-Signalweges genutzt werden (E. Schulz *et al.* 2009 [179]; V. Pavlovic, Dissertation 2008; E. Serfling, persönliche Kommunikation). Limitierend ist hier vor allem die fehlende kommerzielle Verfügbarkeit.

Neben NCI3 gibt es mittlerweile eine Reihe weiterer alternativer Calcineurin-NFATc-Inhibitoren (Abb. 4.2). Einige dieser Substanzen sind noch spezifischer für die Inhibierung der NFAT-abhängigen Genexpression als NCI3, beispielsweise AM404, BTP1 oder das VIVIT-Peptid, haben aber verschiedene Nachteile. So wirkt AM404 auf die NFATc-DNA-Bindung, hat aber eine noch höhere  $IC_{50}$  als NCI3 (10  $\mu$ M) für die NFAT-abhängige Reporterexpression [154]. Außerdem hat AM404 neben der NFATc-Inhibierung noch eine Reihe weiterer Wirkungen, wie die Inhibierung der Cyclooxygenasen 1 und 2 [153]. BTP1 hat einen  $IC_{50}$  von nur 10 nM für die NFAT-abhängige Reporterexpression, und bei dieser Konzentration wird die transkriptionelle Aktivität von NF- $\kappa$ B kaum beeinflusst (Abb. 3.9D). Der Wirkmechanismus von BTP1 ist allerdings ungeklärt, so daß andere Effekte nicht ausgeschlossen werden können. Das VIVIT-Peptid kompetitiert mit der Calcineurin-PxIxIT-Wechselwirkung und ist so ein selektiver Inhibitor der NFATc-Aktivierung. Wahrscheinlich inhibiert das VIVIT-Peptid aber nicht nur die Bindung

von NFATc, sondern auch anderer Proteine mit PxIxIT-Motiv, z. B. RCAN1 [58]. Limitierend ist außerdem die schlechte Membranpermeabilität des Peptides, so daß es entweder nur in zellfreien Assays eingesetzt werden kann oder als Fusionsprotein (z. B. an GFP [146]) überexprimiert werden muß. Eine Variante, die N-terminal zusätzlich 11 Arginin-Reste besitzt (11R-VIVIT), wird aber in einer Reihe von Experimenten als zellpermeabel beschrieben und als Calcineurin-NFATc-Inhibitor zu wirken [180]. Auch wenn diese Beobachtungen nicht unumstritten sind, wird für diese Version des VIVIT-Peptides großes therapeutisches Potential prognostiziert [181].

Insgesamt gibt es zusätzlich zu NCI3 für die Grundlagenforschung mittlerweile einige andere Alternativen zu CsA und FK506. NCI3 könnte aber als Leitsubstanz dienen, weitere neue Substanzen zu synthetisieren und zu charakterisieren, da es einen neuartigen molekularen Wirkmechanismus aufweist.

## **4.2 Die Regulation der RCAN1-Expression in humanen T<sub>H</sub>-Zellen**

Calcineurin ist nicht nur Angriffspunkt niedermolekularer „exogener“ Inhibitoren, die Zelle selbst nutzt endogene modulatorische Proteine, um eine Feinregulation der Calcineurin-Aktivität zu ermöglichen.

Das endogene calcineurinbindende Protein RCAN1 wurde bisher in verschiedenen Zelltypen beschrieben: in Muskelzellen des Skeletts [125] und der Gefäßwände [182], in Neuronen [183, 184] und Gliazellen [185], Megakaryozyten [186] und Endocardzellen [187]. Für T-Zellen sind bisher wenige Daten zu RCAN1 publiziert worden. Daten von RCAN1<sup>-/-</sup>-Mäusen lassen den Schluß zu, daß RCAN1 in T-Zellen NFATc-abhängige Signalwege dämpft [188]. RCAN1 ist als Inhibitor des Calcineurin-NFATc-Signalweges beschrieben worden, allerdings wurden diese Daten mit Proteinfragmenten und in Überexpressionsversuchen erhalten. RCAN1 bindet an Calcineurin über die SP-reiche Region, das PSVVVH-Motif und das LAPP-Motiv. Dadurch werden sowohl das aktive Zentrum von Calcineurin als auch die LxVP- und PxIxIT-bindenden Regionen der Phosphatase von RCAN1 blockiert. Es kann daher angenommen werden, daß RCAN1 nicht nur selektiv die Aktivierung von NFATc inhibiert, sondern mit einer großen Bandbreite von Calcineurinsubstraten

kompetitiert. *Knockout*-Experimente deuten zusätzlich auf eine zweite, calcineurin-stimulierende Rolle von RCAN1 hin, da der Verlust von funktionellem RCAN1 in Hefezellen zu einer erhöhten Calcineurinaktivität führt [123, 124].

RCAN1 wird in mehreren Spleißvarianten exprimiert, von denen RCAN1-1 und RCAN1-4 anscheinend die einzigen in adulten Zellen vorkommenden Varianten sind. Bemerkenswert ist die unterschiedliche Expression der beiden Spleißvarianten: Während RCAN1-1 in den untersuchten Zelltypen basal exprimiert ist und durch die Zugabe von Glucokortikoiden hochreguliert wird, ist RCAN1-4 basal kaum exprimiert und wird bei Zellstress induziert.

Hier konnte gezeigt werden, daß die Spleißvariante RCAN1-1 auch in humanen primären CD4<sup>+</sup> T-Zellen exprimiert wird. Die Expression ist nicht durch Stimulierung der Zellen induzierbar; weder durch Kreuzvernetzung des T-Zellrezeptors und des kostimulatorischen Rezeptors CD28 mit  $\alpha$ CD3/ $\alpha$ CD28-Antikörpern noch mit dem unphysiologischeren und stärkeren Stimulus PMA/Ionomycin. Die Expression von RCAN1-1 wird demnach weder über NFATc, NF- $\kappa$ B und AP-1 moduliert, noch über andere, TCR- oder CD28-kontrollierte Signalwege und ist unabhängig vom zytosolischen Ca<sup>2+</sup>-Gehalt. Auch auf Proteinebene zeigte sich ein konstantes Niveau an RCAN1-1, die detektierte Bande entspricht der Translationsvariante RCAN1-1L (Abb. 3.11). Die Translationsvariante RCAN1-1S konnte nicht oder nur sehr schwach detektiert werden. Dies steht in Übereinstimmung mit Befunden aus murinen Herz- und Muskelzellen. Es wird postuliert, daß RCAN1-1S nur eine sehr kurze Halbwertszeit hat und damit nur ein geringes Proteinniveau erreicht [115]. Unbekannt ist, ob die Translation von RCAN1-1L und -1S von derselben mRNA unterschiedlich reguliert ist.

RCAN1-4 wird im Gegensatz zu RCAN1-1 stimulationsabhängig induziert. Im Promotor von RCAN1-4 (bis -800 bp) wurden bei *in silico*-Analysen über 10 Bindestellen für NFAT gefunden [134], bei eigener Suche mittels ConTra (Universität Gent, Belgien [189]) wurden in diesem Bereich 11 putative NFAT-Bindestellen prognostiziert. Mehrere dieser Stellen liegen sehr nahe beieinander (8-10 Basenpaare voneinander entfernt), so daß dort auch NFATc-Dimere binden könnten. Die Expression von RCAN1-4 wird nicht nur durch Calciuminflux, sondern auch bei Überex-

pression von Calcineurin in Muskelzellen induziert [134] und ist in Endocardzellen NFATc1-abhängig [187]. Diese Befunde lassen darauf schließen, daß in den untersuchten Zellarten RCAN1-4 über den Calcineurin-NFATc-Signalweg reguliert wird. Die Spleißvariante RCAN1-4 hat sowohl in Jurkat- als auch in primären CD4<sup>+</sup> T-Zellen ein sehr niedriges basales Transkriptionsniveau, nahe der Detektionsgrenze. Durch Stimulierung mit Ionomycin, PMA/Ionomycin oder  $\alpha$ CD3/CD28-Antikörpern kann die Transkription von RCAN1-4 in T-Zellen induziert werden. Die Expression von RCAN1-4 ist also auch in T-Zellen calciumabhängig, die PMA-abhängige Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF- $\kappa$ B und AP-1 allein ist für die Induktion von RCAN1-4 nicht ausreichend. Durch Einsatz der Calcineurin-NFATc-spezifischen niedermolekularen Inhibitoren CsA, NCI3, AM404 oder BTP1 konnte gezeigt werden, daß die RCAN1-4-Expression für diese Substanzen empfindlich ist und daher über diesen Signalweg kontrolliert wird.

In T<sub>H</sub>-Zell-Subpopulationen korreliert die Stärke der RCAN1-4-Induktion mit der Menge an Calcineurin und NFATc2 in den Zellen. Es konnte gezeigt werden, daß Gedächtnis-T<sub>H</sub>-Zellen mehr Calcineurin A und NFATc2 exprimieren als naive T<sub>H</sub>-Zellen, und nach PMA/Ionomycin- und auch  $\alpha$ CD3/CD28-Antikörper-Stimulierung die RCAN1-4-Transkription folglich stärker induzieren. Diese höhere Induktion ist auch bei anhaltender Stimulierung zu beobachten (Abb. 3.10). Allerdings ist mittlerweile bekannt (H. Bendfeldt, persönliche Kommunikation), daß Gedächtnis-T<sub>H</sub>-Zellen auch höhere Mengen der NF- $\kappa$ B- und AP-1-Untereinheiten exprimieren, so daß diese Subpopulation kein klares Modell der Calcineurin-NFATc-Abhängigkeit der RCAN1-4-Induktion darstellt. Die erhöhte RCAN1-4-Hochregulation kann also ebenso Zeichen generell höherer transkriptioneller Aktivität sein, die sich beispielsweise auch darin äußert, daß Gedächtnis-T<sub>H</sub>-Zellen nach TCR-Stimulierung mehr und schneller IL-2 und andere Zytokine produzieren können als naive T<sub>H</sub>-Zellen [190]. Für die Funktion der Gedächtnis-T<sub>H</sub>-Zellen, auf bekannte Antigene schnell zu reagieren, ist diese gesteigerte Expression von Signalproteinen und Transkriptionsfaktoren essentiell. Daher ist aber vermutlich auch ein stärkeres negatives Feedback durch RCAN1-4 nötig, um diese höhere Aktivität abzupuffern. Insofern erscheint die erhöhte RCAN1-4-Induktion in Gedächtnis-T<sub>H</sub>-Zellen physiologisch sinnvoll.

*In silico*-Analysen des RCAN1-4-Promotorbereiches zeigen zusätzlich zu den NFAT-Bindestellen einige für den Transkriptionsfaktor AP-1 (ConTra). AP-1 und NFATc bilden einen stabilen ternären NFATc·AP1-Komplex, der synergistisch die Transkription verstärken kann [71]. In wieweit RCAN1-4 durch AP-1 reguliert werden kann, ist nicht untersucht. Die AP-1-DNA-Bindung wird durch Ca<sup>2+</sup>-Influx verstärkt [68], so daß die Ionomycin-abhängige RCAN1-4-Induktion möglicherweise zusätzlich zu NFATc auch auf erhöhte AP-1-Aktivität zurückzuführen ist. Die Sensitivität der RCAN1-4-Induktion für die Calcineurin-NFATc-Inhibitoren CsA, NCI3 und BTP-1, die alle drei keinen bzw. keinen negativen Effekt auf die AP-1-abhängige Genexpression haben, zeigt aber, daß NFATc der limitierende Transkriptionsfaktor für die Expression dieser Spleißvariante ist.

Die Expressionskinetik von RCAN1-4 ähnelt der anderer stimulierungs- und NFATc-abhängiger Gene. Die mRNA von IL-2 beispielsweise weist ebenso wie RCAN1-4 ein Maximum bei 4 h auf und geht trotz andauernder Stimulierung innerhalb der nächsten Stunden zurück. Nach 12 h ist ein Minimum erreicht, das aber über dem Basalniveau liegt [191]. Die Expression des NFATc-kontrollierten Oberflächenproteins CD40L zeigt eine ähnliche Kinetik mit einem Maximum bei 3 – 6 h [192]. Auch die Expressionskinetik der NFATc-induzierten Spleißvariante NFATc1/A ist ähnlich [193]. Hier liegt das Transkriptionsmaximum bei 9 h nach PMA/Ionomycin-Stimulierung [194]. Mathematische Modelle postulieren, daß dieser zeitliche Verlauf der NFATc-abhängigen Genexpression durch negative Rückkopplungsmechanismen verursacht wird, zu denen die RCAN1-4-Expression gehört [195].

Für die Expression von RCAN1-4 auf mRNA-Ebene konnten Daten gewonnen werden. Durch Fehlen eines Antikörpers gegen RCAN1-4 konnten diese nicht mit Proteindaten ergänzt und korreliert werden. Die käuflichen oder der zur Verfügung gestellte Antikörper waren nicht in der Lage, RCAN1-4 auf physiologischem Niveau im Western blot zu detektieren (auf überexprimiertem Niveau in HEK293T-Zellen dagegen teilweise schon). Auch selbst erzeugte Antikörper gegen den kodierenden Bereich des Exons 4 als GST-Fusion (in Kooperation mit Pineda Antikörper Service, Berlin) waren dafür nicht affin genug. Möglich ist allerdings auch, daß RCAN1-4 in

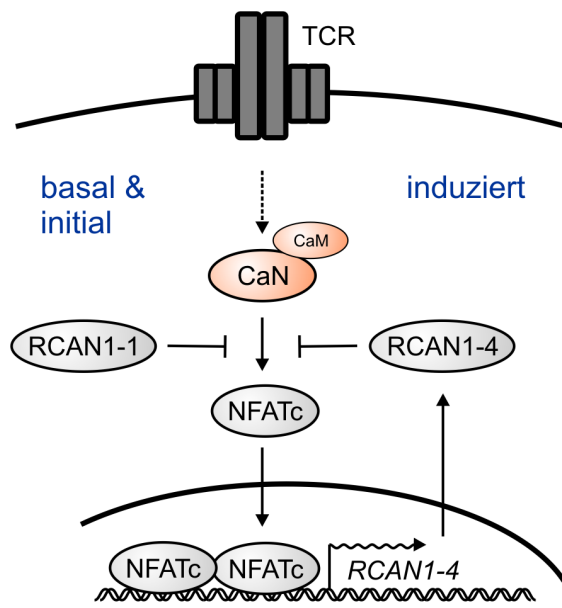
T-Zellen auf Proteinebene sehr niedrig exprimiert wird und RCAN1-1 in ihnen die prominente Spleißvariante darstellt.

Die Entwicklung eines eigenen mono- oder polyklonalen Antikörpers gegen RCAN1-4 hätte neben Western blot- auch andere Analysemethoden möglich gemacht. Damit sollte durch Einzelzellfärbungen gegen RCAN1-4-Protein durchflußzytometrisch bestimmt werden, ob RCAN1-4 wie beispielsweise IL-2 einem binären Expressionsmuster folgt, wie es von einem NFATc-kontrollierten Gen zu erwarten wäre [196]. Möglich wären Kofärbungen mit T-Zell-subpopulationsspezifischen Proteinen, um die Expression der RCAN1-Spleißvarianten mit der Funktion dieser Subpopulationen zu korrelieren, wie es auf mRNA-Ebene nur ansatzweise gelungen ist. Auch könnten durch Kofärbungen mit Transkriptionsfaktoren genauer als auf mRNA-Ebene, wo über ganze Zellpopulationen gemittelt wurde, bestimmt werden, inwieweit die Mengen und die Aktivierung der einzelnen Transkriptionsfaktoren mit der RCAN1-4-Expression zusammenhängen.

Die Phosphorylierung von RCAN1 läßt sich nur durch Bestimmung auf Proteinebene untersuchen. Es ist gezeigt worden, daß RCAN1 als Phosphoprotein vorliegen kann, jedoch ist die Regulation und Funktion des Phosphostatus' umstritten [114-118, 135]. Durch die Anwendung ausgewählter Kinase- und Phosphataseinhibitoren und die anschließende Detektion des Phosphostatus von RCAN1 über Western blot könnten möglicherweise Daten gewonnen werden, die zu dieser Diskussion beitragen. Falls die Unterschiede in der Elektromobilität zu gering ausfallen würden, um sie gut zu detektieren (siehe Abb. 3.11B), könnte über Kofärbung mit phosphoserinspezifischen Antikörpern oder über 2D-Gelelektrophoresen möglicherweise der Phosphostatus von RCAN1 besser bestimmt werden [115].

Aus der Literatur und den hier vorgestellten Daten zur RCAN1-Expression in T<sub>H</sub>-Zellen läßt sich ein grundlegendes Modell erstellen (Abb. 4.3). Die Spleißvariante RCAN1-1 ist, sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene, in ruhenden T-Zellen exprimiert (Abb. 3.11). Damit wird in diesen Zellen durch RCAN1-1 im Zusammenspiel mit anderen endogenen Calcineurininhibitoren wahrscheinlich die basale Aktivität von Calcineurin reguliert. Da RCAN1-4 erst nach mehreren Stunden maximal induziert wird, ist das Niveau von RCAN1-1 ein möglicher Modulator der

initialen TCR-abhängigen Calcineurinaktivierung. Die Inhibierung der Proliferation maligner T-Zellen durch Glucokortikoide beruht möglicherweise auf der damit einhergehenden Calcineurin-Supprimierung durch eine Erhöhung der RCAN1-1-Menge [131]. Das RCAN1-Niveau stellt also einen möglichen Angriffspunkt dar, den Calcineurin-NFATc-Signalweg und damit die Aktivierbarkeit von T- und anderen Zellen zu modulieren und feinabzustimmen.



**Abb. 4.3: Vereinfachtes Modell der postulierten RCAN1-1- und RCAN1-4-Expression während der T-Zellstimulierung.** Die verschiedenen RCAN1-Spleißvarianten haben möglicherweise unterschiedliche Funktionen im Calcineurin-NFATc-Signalweg: RCAN1-1 kann die basale und initiale Calcineurinaktivität modulieren, RCAN1-4 bildet einen negativen Rückkopplungsmechanismus für die NFATc-Aktivierung in T-Zellen.

So konnten Ryeom *et al.* mit einem RCAN1<sup>-/-</sup>-knockout-Mausmodell zeigen, daß bei Verlust von RCAN1 T<sub>H</sub>1-Zellen durch stimulationsbedingte FasL-Expression in die Apoptose gehen [188]. Die Expression von FasL bedarf eines sehr starken NFATc-Signals, das normalerweise erst durch mehrfache schnelle Stimulierung der T-Zellen erreicht wird. Diese „Überstimulierung“ führt in normalen T<sub>H</sub>-Zellen zum aktivierungsinduzierten Zelltod (AICD) über den FasL-Fas-Signalweg [197]. AICD ist ein Mechanismus der klonalen Selektion im Thymus und der klonalen Kontraktion in der Peripherie, wo überaktive T-Zellen so beseitigt werden [198]. In RCAN1<sup>-/-</sup>-T-Zellen kommt es nun schon durch milde Stimulierung zu einem Überschießen des Calcineurin-NFATc-Signalweges und damit zur Expression von FasL. In T<sub>H</sub>1-Zellen, die Fas auf ihrer Oberfläche tragen, wird durch Ligation mit FasL die Apoptose ausgelöst, während die T<sub>H</sub>2-Zellen, die Fas nicht exprimieren, überleben. Die RCAN1<sup>-/-</sup>-knockout-Mäuse besitzen daher ein verschobenes T<sub>H</sub>1/T<sub>H</sub>2-Verhältnis. Allerdings wurden in diesem Modell durch Zerstörung des Exons 6 sämtliche Spleißvarianten von RCAN1 funktionslos. Damit kann nicht bestimmt

werden, welchen Einfluß die fehlende basale Hemmung durch RCAN1-1 bzw. der defekte Rückkopplungsmechanismus durch RCAN1-4 auf den beobachteten Phänotyp haben.

Durch *knockdown* der einzelnen Spleißvarianten mittels siRNA, die sich gegen Exon 1 oder Exon 4 richtet, wäre diese Frage möglicherweise zu beantworten. Es gelang im Rahmen dieser Arbeit leider nicht, primäre humane T<sub>H</sub>-Zellen lentiviral mit entsprechenden shRNA-kodierenden Vektoren zu transfizieren. Die schlechte Transfizierbarkeit von humanen T-Zellen ist aber ein generelles Problem beim Arbeiten mit diesem Zelltyp. Somit bedarf dieser Punkt weiterhin der Klärung.

### 4.3 Schlußfolgerung

In dieser Arbeit wurden zwei Modulatoren des Calcineurin-NFATc-Signalweges in humanen T<sub>H</sub>-Zellen näher untersucht. Zum einen wurde der neuartige niedermolekulare Inhibitor NCI3 charakterisiert. NCI3 interferiert mit der Calcineurin-NFATc-Bindung, die Phosphataseaktivität von Calcineurin bleibt dabei intakt. NCI3 besitzt also einen vom klassischen Calcineurin-NFATc-Inhibitor verschiedenen neuartigen Wirkmechanismus. NCI3 kann in der Grundlagenforschung als spezifischer NFATc-Inhibitor eingesetzt werden und als Leitsubstanz für die Entwicklung weiterer Inhibitoren dienen.

Zum anderen wurde das endogene calcineurinmodulatorische Protein RCAN1 hinsichtlich seiner Expression und Regulation in T<sub>H</sub>-Zellen untersucht. Die Spleißvariante RCAN1-1 ist in humanen T<sub>H</sub>-Zellen konstitutiv exprimiert, während die Expression von RCAN1-4 calcineurin- und NFATc-abhängig nach T-Zellstimulierung induziert wird. Damit moduliert RCAN1-1 die basale und initiale, RCAN1-4 die spätere (>2h) Phase der T-Zellstimulierung.

Insgesamt tragen die in dieser Arbeit gewonnenen Daten und Erkenntnisse dazu bei, das Verständnis der Funktion und Regulation von Calcineurin in T-Zellen zu vertiefen.



## 5 Material & Methoden

### 5.1 Zellbiologische Methoden

#### 5.1.1 Zellen, Zelllinien und Medien

Vollmedien:

**RPMI 1640** + 100 U/ml Penicillin, 100 U/ml Streptomycin, 10% hitzeinaktiviertes FCS, 10 µg/ml β-Mercaptoethanol, 10 mM L-Glutamat (Invitrogen, Karlsruhe)

**DMEM** + 100 U/ml Penicillin, 100 U/ml Streptomycin, 10% hitzeinaktiviertes FCS, 10 µg/ml β-Mercaptoethanol, 10 mM L-Glutamat (Invitrogen)

Zelllinie	Zelltyp	Vollmedium	Bemerkungen
Jurkat	humane T-Zelllinie	RPMI	Klon E6-1, ATCC
HEK293T	humane adhärenzte Zelllinie	DMEM	Invitrogen
CD4 <sup>+</sup> T-Zellen	humane primäre Zellen	RPMI	

#### 5.1.2 Kultivierung der Zellen

Alle Säugerzellen wurden im Inkubator bei 37 °C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO<sub>2</sub>-Gehalt kultiviert. Die Zählung der Zellen erfolgte entweder mittels einer Neubauer-Zählkammer oder mit dem CASY-Zählgerät (Schärfe System). Die lebend/tot-Unterscheidung erfolgte mittels Trypanblau (Sigma-Aldrich, Zählkammer) bzw. elektronisch über die Zelleitfähigkeit (CASY). Im CASY konnte durch die Anzeige der Zellgröße auch zwischen T-Zellen und Monozyten unterschieden werden.

Jurkat-T-Zellen wurden in 75 cm<sup>2</sup>-Flaschen kultiviert und alle 2 bis 3 Tage 1:5 bis 1:8 mit frischem Medium gesplittet, um die Zellzahl zwischen  $0,2 \times 10^5$  und  $1,5 \times 10^6$  Zellen/ml zu halten.

HEK293T-Zellen wurden in 75 cm<sup>2</sup>-Flaschen kultiviert und alle 3 bis 4 Tage trypsiniert und 1:10 gesplittet, um eine Konfluenz von maximal 80 % zu halten.

PBMC und gereinigte primäre T-Zellen wurden in RPMI-Vollmedium kultiviert.

### 5.1.3 Gewinnung von PBMC

Humane mononukleäre Zellen aus peripherem Blut (PBMC) wurden aus *buffy coats* (Blutspendedienst des DRK, Berlin-Wannsee) oder aus Leukozytenfiltern (Blutspende der Charité Berlin) isoliert. Das Vollblut wurde zu gleichen Teilen mit PBS/BSA/EDTA in 50ml Falcon-Röhrchen (BD Biosciences, Heidelberg) gemischt und durch die Zentrifugation (2000 rpm, 20 min RT ohne Bremse) über ein Saccharosekissen (Ficoll, PAA, Österreich) aufgetrennt. Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation erlaubt die Trennung von intakten Lymphozyten, Monozyten und NK-Zellen (PBMC) von Erythrozyten, Granulozyten und toten Zellen. Die PBMC-Fraktion wurde zweimal mit eiskaltem PBS/BSA/EDTA gewaschen, dabei wurden die nicht sedimentierenden Thrombozyten durch Zentrifugation (1500 rpm, 15 min, 4°C) entfernt. Die PBMC-Fraktion wurde in PBS/BSA/EDTA bei 4°C bis zum Gebrauch gelagert.

### 5.1.4 Magnetische Zellsortierung (MACS)

Magnetische Zellsortierung beruht auf der Bindung mikrobeadgekoppelter monoklonaler Antikörper an die entsprechenden Oberflächenepitope positiver Zellen. Die benutzten Mikrobeads haben einen Durchmesser von etwa 100 nm und sind paramagnetisch. Die mit entsprechenden Mikrobeads versetzte heterologe Zellsuspension wird durch eine mit Stahlwolle gefüllte Säule geschickt, die sich in einem starken Magnetfeld befindet. Zellen, die die paramagnetischen Mikrobeads gebunden haben, werden in der Säule zurückgehalten, während die anderen Zellen durch die Säule hindurchfließen. Wird die Säule aus dem Magnetfeld entfernt und gewaschen, werden die gebundenen Zellen eluiert.

Zur Gewinnung der CD4<sup>+</sup>-positiven T<sub>H</sub>-Zellen wurden die PBMC in PBS/BSA/EDTA resuspendiert und mit Beriglobin (Aventis Behring, Marburg) für 5 min bei 4 °C inkubiert. Beriglobin blockiert die Fcγ-Rezeptoren, die eine unspezifische Bindung der Mikrobeads verursachen würden. Danach wurden αCD4-Antikörperbeschichtete Mikrobeads (Miltenyi Biotech, Bergisch-Gladbach) nach Herstellerangaben zu der Zellsuspension gegeben und die Zellen weitere 20 min bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation (1200 rpm, 10 min, 4 °C) von den nichtgebundenen Mikrobeads getrennt und in 3 ml PBS/BSA/EDTA

resuspendiert. Die Zellsuspension wurde über LS-Säulen (Miltenyi Biotech) gegeben, die dreimal mit eiskaltem PBS/BSA/EDTA gewaschen wurden. Die LS-Säulen wurden aus dem Magnetfeld entnommen und die CD4-positiven Zellen mit je 5 ml eiskaltem PBS/BSA eluiert. Anschließend wurden die Zellen gezählt und die gewünschte Zellzahl wurde in RPMI-Vollmedium aufgenommen.

Die Reinheit der isolierten Zellpopulationen (MACS-Check) wurde bestimmt, indem ein Aliquot mit entsprechenden fluoreszenzmarkierten Antikörpern versetzt und diese Probe durchflußzytometrisch (siehe unten) analysiert wurde.

### 5.1.5 Durchflußzytometrie und Fluoreszenzaktivierte Zellsortierung (FACS)

Die Durchflußzytometrie ermöglicht die Messung der Größe, Granularität und Fluoreszenz lebender oder fixierter Zellen auf Einzelzellebene. Im Gerät wird eine Zellsuspension im Flüssigkeitsstrom in Einzelzellen aufgetrennt, die dann durch ein Laser/Detektor-Array fließen. Je nach Ausstattung des Gerätes können die Einzelzellen nach den gemessenen Parametern fraktioniert aufgefangen werden (FACS). Die Expression nichtfluoreszierender Proteine kann durch deren Anfärbung mit fluoreszenzgekoppelten spezifischen Antikörpern erfaßt werden. Oberflächenproteine sind bei lebenden, intakten Zellen anfärbbar, wodurch diese nach Zellfärbung und zytometrischer Messung oder Sortierung weiter kultiviert werden können. Für die Anfärbung und Messung intrazellulärer Proteine müssen die Zellen dagegen vorher fixiert und permeabilisiert werden.

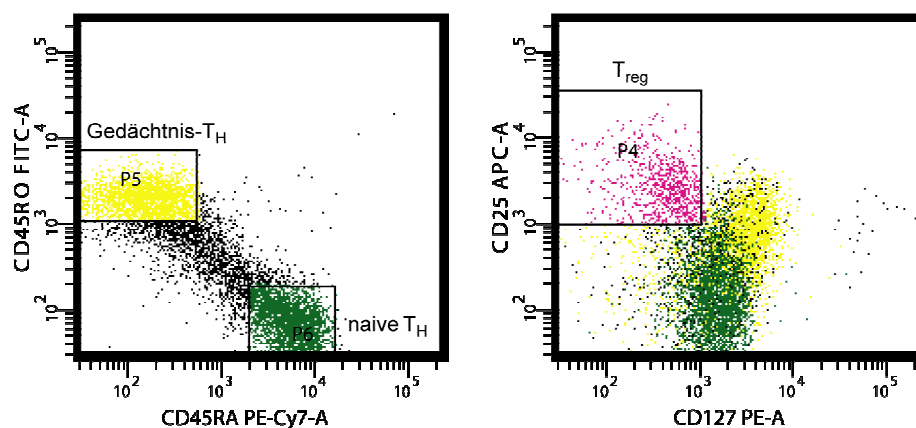


Abb. 4.1: Sortierstrategie für naive und Gedächtnis-T<sub>H</sub>-Zellen sowie regulatorische T-Zellen.

Zur Isolation von T<sub>H</sub>-Subpopulationen wurden PBMCs erst via MACS auf CD4<sup>+</sup> vorsortiert, dann angefärbt (αCD25-APC, αCD127-PE, αCD45RA-PE-Cy7, αCD45RO-

FITC, alle BD Biosciences oder DRFZ-Eigenproduktion) und im FACS Aria II (BD Biosciences) isoliert. Naive  $T_H$ -Zellen sind dabei  $CD45RA^+/CD45RO^-$ , Gedächtnis- $T_H$ -Zellen  $CD45RA^-/CD45RO^+$  und regulatorische T-Zellen  $CD25^{high}$  und  $CD127^-$  (siehe Abb. 4.1). Die Zellpopulationen wurden bei der Isolation gezählt und in PBS aufgefangen. Anschließend wurden die Zellen in PBS/BSA gewaschen und in RPMI-Vollmedium aufgenommen.

### 5.1.6 Zellstimulierung

Jukat-T-Zellen wurden, wenn nicht anders angegeben, mit 10 ng/ml Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) und 1  $\mu$ g/ml Ionomycin (beide Sigma-Aldrich, Steinheim) stimuliert.

Primäre  $CD4^+$  T-Zellen wurden entweder mit PMA/Ionomycin stimuliert oder mit oberflächengebundenen Antikörpern. Für rezeptorvermittelte Stimulierungen wurden mit murinen monoklonalen  $\alpha$ human CD3- und  $\alpha$ human CD28-Antikörpern (beide BD Biosciences) beschichtete Polystyrenbeads (Postnova Analytics, Landsberg) verwendet und im Verhältnis 1,5:1 mit MACS sortierten  $CD4^+$  T-Zellen eingesetzt. Polystyren-Plastikkügelchen ( $1 \times 10^8$ /ml) mit einem Durchmesser von 6  $\mu$ m wurden mit 20  $\mu$ g  $\alpha$ CD3- und 80  $\mu$ g  $\alpha$ CD28-Antikörpern in 1 ml PBS für zwei Stunden bei 37°C schüttelnd inkubiert. Anschließend wurden die Beads pelletiert, für eine Stunde mit RPMI-Vollmedium blockiert und in 1ml RPMI-Vollmedium resuspendiert und bei 4°C gelagert.

### 5.1.7 Bestimmung der Zellproliferation

Die Proliferation stimulierter humaner  $T_H$ -Zellen wurde mittels Carboxyfluoreszeindiazetatsuccinimidylester (CFDA-SE)-Färbung im FACS untersucht. CFDA-SE diffundiert in das Zellinnere und wird dort durch Esterasen in zellmembranimpermeablen Carboxyfluoreszeinsuccinimidylester (CFSE) umgewandelt. CFSE interferiert nicht mit zellulären Prozessen und wird bei Zellteilung gleichmäßig auf die Tochterzellen verteilt. Dadurch wird bei jeder Zellteilung die relative Fluoreszenzintensität des Farbstoffes halbiert, womit die Zellteilung gemessen werden kann [199].

Die isolierten T<sub>H</sub>-Zellen wurden vor der Stimulierung in PBS resuspendiert und eine Konzentration von  $2 \times 10^7$  Zellen/ml eingestellt. Die Zellsuspension wurde mit dem gleichen Volumen einer 2  $\mu$ M CFDA-SE-PBS-Lösung gemischt und für 3 min 30 s bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 ml RPMI-Vollmedium gestoppt. Die Zellsuspension wurde mit PBS/BSA gewaschen (1200 rpm, 10 min, 4 °C) und in RPMI-Vollmedium resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen mit oberflächengebundenen  $\alpha$ CD3/ $\alpha$ CD28-Antikörpern für 5 Tage stimuliert und anschließend im FACS analysiert. Dabei wurden mittels Propidiumiodid (PI)-Färbung die lebenden Zellen separiert und im FL1-Kanal auf ihre CFSE-Fluoreszenz untersucht.

#### **5.1.8 Bestimmung der IL-2-Expression von CD4<sup>+</sup> T-Zellen**

MACS-aufgereinigte CD4<sup>+</sup> Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen an NCI3 oder DMSO für 30 min vorinkubiert und anschließend mit  $\alpha$ CD3/ $\alpha$ CD28-beads für 8 h stimuliert. Für die letzten 3 h wurden 5  $\mu$ g/ml Brefeldin A zu den Zellen gegeben, um die Sekretion der exprimierten Zytokine zu verhindern. Die Zellen wurden geerntet, mit PBS gewaschen, mit 2% Formaldehyd-PBS (20 min, Raumtemperatur) fixiert und durch Inkubation in 0,5% Saponin-PBS/BSA permeabilisiert. Die fixierten und permeabilisierten Zellen wurden mit der Färbelösung (0,5% Saponin-PBS/BSA,  $\alpha$ IL-2-Phycoerythrin (PE; BD Biosciences)) inkubiert, mit 0,5% Saponin-PBS/BSA gewaschen und durchflußzytometrisch vermessen.

#### **5.1.9 Plasmidtransfektion von Jurkat-T-Zellen und Reporterassay**

Reporterassays ermöglichen die einfache Detektion eines zellulären Ereignisses durch die daran gekoppelte Expression eines Reportergenes. Als Reporter werden meist Enzyme (SEAP oder Luciferasen), fluoreszierende Proteine (GFP oder DsRed) oder Oberflächenproteine benutzt.

Hier wurde die transkriptionelle Aktivität der Transkriptionsfaktoren NFATc, NF- $\kappa$ B und AP-1 durch die Expression von Glühwürmchenluciferase bestimmt. Als Reportergensystem wurde das *Mercury Pathway Profiling System* (Clontech, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich) eingesetzt, dabei wird die Expression des Luciferasegens über mehrere hintereinandergesetzte NFAT-, NF- $\kappa$ B bzw. AP-1-

Bindestellen im Promotor gesteuert. Als Luciferasesubstrat wurde das *Luciferase Assay System* (Promega, Mannheim) eingesetzt. Die Chemolumineszenz wurde in einem Plattenleser über 5 s integriert. Zur Kontrolle wurde das konstitutiv aktive pGL3-basic-Plasmid (Clontech) benutzt.

Jurkat-T-Zellen wurden mit dem Amaxa Nukleofektor II (Programm C-016, Puffer V) elektroporiert, dabei wurden pro Transfektion 1,5 µg Reporterplasmid in  $4 \times 10^6$  Zellen transfiziert. Mehrere Transfektionen mit demselben Plasmid wurden anschließend gepoolt. Die transfizierten Zellen wurden über Nacht im Inkubator gelagert, am nächsten Morgen aliquotiert (in  $5 \times 10^5$  Zellen/Aliquot), mit den gewählten Inhibitoren versetzt und 30 min später mit PMA/Ionomycin für 5 h stimuliert. Anschließend wurden die Zellen geerntet, mit 50 µl Luciferase-CCLR (Promega) lysiert und die Überstände hinsichtlich ihrer Luciferaseaktivität nach Herstellerprotokoll vermessen.

Bei der Co-Überexpression von Calcineurin A bzw Calcineurin A-Fragmenten wurden 3 µg Plasmid, codierend für humanes Calcineurin A $\alpha$ , CaN- $\Delta$ AI oder GFP als Kontrolle, zusätzlich mit den 1,5 µg Reporterplasmid transfiziert. Die Kontrolle der Überexpression erfolgte optisch über die GFP-Fluoreszenz (TCS SL, Leica, Heidelberg)

Die Proben wurden als Triplikate durchgeführt, die Auswertung erfolgte mittels Tabellenkalkulation.

### **5.1.10 Inhibitoren**

NCI3 und BTP-1 wurden von M. Karanik (HU Berlin) synthetisiert [141]. CsA wurde bei Merck, Darmstadt gekauft, AM404 bei Sigma-Aldrich. Alle Inhibitoren wurden in DMSO aufgenommen und bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert.

## **5.2 Molekularbiologische Methoden**

### **5.2.1 Bakterientransfektion, Bakterienkultur und Plasmidpräparation**

Für die Plasmidgewinnung wurden chemisch kompetente *E. coli* des Stammes TOP10 (Invitrogen) nach Herstellerangaben transformiert, für die Überexpression von rekombinanten Proteinen elektrokompente BL21-*E. coli* (Invitrogen). Die

Transformationsansätze wurden auf LB-Agarplatten [200] mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden Klone gepickt und mit Kontroll-PCR das Vorhandensein des Inserts überprüft. Ein positiver Klon wurde in LB-Medium angeimpft und über Nacht bei 37 °C schüttelnd inkubiert.

Plasmid-Präparationen wurden mit dem GeneJet Plasmid Miniprep Kit (Fermentas, St. Leon-Rot) oder dem NucleoBond Xtra Midi Plus-Kit (Macherey-Nagel, Düren) nach Herstelleranleitung durchgeführt. Die Plasmide wurden in 5 mM TrisCl pH 8,0 eluiert. Die Konzentration und Reinheit der Plasmid-DNA wurde mittels Nanodrop (Thermo Fischer Scientific, Bonn) spektroskopisch gemessen.

### 5.2.2 Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen

Plasmide, basierend auf pGEX-4T3 (GE Healthcare, Freiburg/B.), wurden in BL21-*E.coli* transformiert. 2xYT-Medium [200] wurde mit einer Übernachtskultur angeimpft und bei 37°C geschüttelt, bis die Bakterien eine OD<sub>600</sub> von 0,6 aufwiesen. Dann wurde die Proteinexpression mit 0,25 mM IPTG induziert und die Kultur bei 30 °C für 4 h geschüttelt. Anschließend wurden die Bakterien pelletiert und mit PBS gewaschen.

Das Bakterienpellet wurde in PBS+ (PBS, 1 mM DTT, Proteaseinhibitoren (Complete EDTA-free, Roche, Mannheim)) aufgenommen, auf Eis sonifiziert, auf 0,5 % Triton X-100 (Sigma-Aldrich) gebracht und 15 min bei 4 °C geschüttelt. Anschließend wurde das Lysat durch Zentrifugation (7000×g, 15 min, 4 °C) vorgereinigt und der Überstand auf Glutathion-Sepharose-beads (GE Healthcare) in einer Einmal-Säule (Polyprep Chromatographiesäulen, Bio-Rad, München) gegeben. Die geschlossene Säule wurde 2 h bei 4°C schüttelnd inkubiert und dann auslaufen gelassen. Die Säule wurde 2× mit PBS+T (PBS+, 0,05 % Tween-20) gewaschen und 2× mit PBS+. Das gebundene GST-Fusionsprotein wurde mit Elutionspuffer (50 mM TrisCl pH 8, 10 mM Glutathion, 1 mM DTT, Proteaseinhibitoren; 4 °C, 2h) von der Säule gewaschen. Reinheit und Konzentration des eluierten Proteins wurden mittels SDS-PAGE und anschließende Coomassie-Färbung bestimmt.

### 5.2.3 SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (PAGE) und Western blot

Zellen wurden mit eiskaltem PBS gewaschen, in PBS (5  $\mu$ l/ $1 \times 10^6$  Zellen) resuspendiert und mit der gleichen Menge 6 $\times$  Lämmli-Probenpuffer (0,35 M TrisCl, 10% SDS, 50% Glycerol, 0,6 M DTT, Bromphenolblau, pH 6,8) versetzt. Die Zellysate wurden bis zur Homogenität sonifiziert (Bandelin Sonopuls, Berlin) und anschließend bei 80°C für 5 min erhitzt. Die Lysate wurden bei -20°C gelagert.

Die Proteine wurden durch diskontinuierliche SDS-PAGE in TRIS-Glycin-Gelen bei konstanten 120 V aufgetrennt [200]. Als Größenstandards wurden SeeBlue Plus 2 (Invitrogen) und Odyssey Protein Marker (LI-COR, Bad Homburg) verwendet.

Nach der SDS-PAGE wurden die aufgetrennten Proteine mittels Tank-Blot-Transfers auf Protran-Nitrocellulosemembranen (Whatman, Dassel) übertragen. Die Membranen wurden anschließend für 30 min mit Blockierlösung (50 % Odyssey-Blockierpuffer (LI-COR)/PBS) abgesättigt. Danach wurden sie mit dem primären Antikörpern, verdünnt in 50 % Odyssey-Blockierpuffer/PBS-T, bei 4 °C über Nacht oder bei Raumtemperatur für 2 h schüttelnd inkubiert. Es folgte ein viermaliges Waschen mit PBS-T für jeweils 5 min und die Inkubation mit den sekundären, IRDye680/IRDye800-gekoppelten  $\alpha$ Maus- bzw  $\alpha$ Kaninchen-IgG-Antikörpern (LI-COR bzw. Invitrogen) für 30 min bei Raumtemperatur. Nach drei weiteren Waschschrritten mit PBS-T wurden die Membranen dann mit dem Odyssey® Infrarot Imaging System (LI-COR) eingescannt und mit der LI-COR-Software analysiert. NFATc2 wurde mit einem murinen monoklonalen  $\alpha$ NFATc2-Antikörper (4G6-G10, BD Biosciences) detektiert, Calcineurin A mit einem murinen monoklonalen Antikörper (G182-1847, BD Biosciences) und RCAN1-1 mit einem polyklonalen murinen Antikörper (Geschenk von D. Maldonado-Perez, Edinburgh, UK). Der murine monoklonale  $\alpha$ RCAN1-1-Antikörper wurde gegen die kodierende Region des RCAN1-Exons 1, exprimiert als GST-Fusionsprotein, erzeugt (in Kooperation mit M. Listek, Universität Potsdam).

### 5.2.4 Dephosphorylierungsassay

HEK293-Zellen wurden mittels Lipofektamin 2000 (Invitrogen) mit einem Plasmid transfiziert, das murines NFATc2-GFP exprimiert (E. Serfling, Würzburg). Die Zel-



len wurden 36 h nach Transfektion mit Lysepuffer (PBS, 0,1 % Nonidet P-40, Proteaseinhibitoren) lysiert, der Überstand bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Rekombinantes Calcineurin (0.05 mg/ $\mu\text{l}$ ) [201] oder isoliertes Calcineurin aus Rinderhirn wurde in Dephosphorylierungspuffer (40 mM TrisCl pH 7,5, 100 mM NaCl, 6 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.5 mM DTT, 1 mM  $\text{CaCl}_2$ , 0.1 ng/ml BSA, 15  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Calmodulin) mit Inhibitoren, EDTA oder DMSO, bei  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  für 20 min vorinkubiert. Phospho-NFATc2-Lysat wurde dazugegeben und weitere 30 min bei  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Lämmli-Probenpuffer und Erhitzen auf  $80\text{ }^{\circ}\text{C}$  gestoppt. Die Phosphorylierung/Dephosphorylierung der Substrate wurde mittels Immunoblot mit einem  $\alpha\text{NFATc2}$ -Antikörper über die Änderung der Elektromobilität überprüft.

Die verwendeten Peptide VIVIT (MAGPHPVIVITGPHEE) [146] und das reverse Peptid TIVIV (EEHPGTIVIVPHPGAM) wurden mit Fester-Phase-Peptidsynthese hergestellt (Quartett, Berlin) und in DMSO gelöst.

#### **5.2.5 Phosphorylierungsassay**

Aufgereinigtes GST-NFATc2 wurde mit rekombinanter PKA und GSK3 $\beta$  (beide New England Biolabs, Frankfurt/M.) in T4 DNA-Ligase-Puffer (Fermentas) oder mit CK1 in CK1 Puffer (NEB) in Anwesenheit von 30  $\mu\text{M}$  NCI3 oder DMSO für 30 min bei  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Die Phosphorylierung von GST-NFATc2 wurde mittels Immunoblotting mit einem  $\alpha\text{NFATc2}$ -Antikörper über die Änderung der Elektromobilität erfaßt.

#### **5.2.6 Oligo-Nukleotide**

Alle Oligonukleotide wurden mit Oligo6 (Molecular Biology Insights, Cascade, USA) oder VectorNTI 9 (Invitrogen) entworfen und von TIB Molbiol (Berlin) synthetisiert. Die angegebenen Schmelztemperaturen sind für den hybridisierenden Bereich mit den angegebenen Programmen bestimmt worden.

### 5.2.6.1 Oligonukleotide für Klonierungen

Gen	Name	Sequenz 5' > 3'	RE	T <sub>m</sub>
Calcineurin $\alpha$ 1-521	ms13 for	GCAAGCTTCGCCACCATGTCCGAGCCCAAGGCAATTG	HindIII	68°C
	ms19 rev	CAGGATCCCTGAATATTGCTGCTATTACTGCC	BamHI	53°C
Calcineurin $\alpha$ 1-396	ms13 for	GCAAGCTTCGCCACCATGTCCGAGCCCAAGGCAATTG	HindIII	68°C
	ms4 rev	CTGCGGCCGCTCATATCACCTCTTCCGGGCTGCAGC	NotI	67°C
NFATc2/A	ms28 for	TCGGATCCAACACTATGGCTATGCATCCTCCA	BamHI	57°C
	ms30 rev	ACCTGCGGCCGCTCAGATCCAGCCTGGGCTAGCAACCTC	NotI	70°C

### 5.2.6.2 Oligonukleotide für LightCycler und semiquantitative PCR

Gen	Name	Sequenz 5' > 3'	T <sub>m</sub>	[Mg <sup>2+</sup> ]
$\beta$ 2-Mikroglobulin	$\beta$ 2MG for	TGGAGAGAGAATTGAAAAAGTGGAGC	56°C	3,5 mM
	$\beta$ 2MG rev	TTAAAAAGCAAGCAAGCAGAATTTGG		
$\beta$ -Aktin	$\beta$ Akt for	GTGGGGCGCCCCAGGCACCA	61°C	3 mM
	$\beta$ Akt rev	CTCCTTAATGTCACGCACGATTTTC		
RCAN1-1	mSlc1 for	TTGACTGCGAGATGGAGGAGGTGGAC	64°C	3 mM
	mSlc2 rev	GCTGCGGAGAAGGGGTTGCTGAA		
RCAN1-4	mSlc3 for	AGGGGCTTGACTGCGTGGGTCTGTAG	66°C	3 mM
	mSlc4 rev	TGCTGCGGAGAAGGGGTTGCTG		
Carabin	mSlc11 for	CCGACCGCTATGGATTCATT	53°C	3 mM
	mSlc12 rev	AGGTGCCAGGGCTGTTCTT		

### 5.2.7 PCR

PCR mit Weiterverwendung zum Klonieren wurde mit Phusion DNA Polymerase (NEB) nach Protokoll durchgeführt, Kontroll-PCRs mit Taq DNA Polymerase (Rapidzym, Berlin). Für die verwendeten Primerpaare siehe Tabelle „Oligonukleotide für Klonierungen“.

PCR-Produkte wurden anschließend mittels Agarose-Gelelektrophorese und Ethidiumbromidanfärbung hinsichtlich Größe, Reinheit und Menge analysiert. PCR-Produkte, die weiterverwendet werden sollten, wurden unter Beleuchtung bei 300 nm ausgeschnitten und mit dem MinElute Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden) nach Anleitung aufgereinigt. Die Quantifizierung erfolgte mittels Nanodrop.

### **5.2.8 Expressionsplasmide**

Für die bakterielle Überexpression und anschließende Aufreinigung rekombinanten NFATc2 wurde das Gen aus humaner cDNA mit dem Oligo-Paar ms28/30 in das bakterielle Expressionsplasmid pGEX-4T3 (GE Healthcare) kloniert, um ein GST-Fusionsprotein zu erhalten.

Zur Überexpression in Jurkat-T-Zellen wurde Calcineurin aus humaner cDNA mit den Primerpaaren ms13/19 (Vollängen-Calcineurin  $\text{A}\alpha$ ) bzw. ms13/4 (trunkiertes Calcineurin  $\text{A}\alpha$ ) in das Plasmid pEGFP-N3 (Clontech) kloniert, wobei ein EGFP-Fusionsprotein entstand.

### **5.2.9 Genexpressionsanalyse mittels quantitativer real-time-PCR**

Aus behandelten Zellen wurde totale RNA mittels des RNeasy Mini plus Kits (Qiagen) isoliert, diese wurde mit RNasefreiem Wasser eluiert. Genomische DNA wurde durch eine DNA-bindende Säule entfernt. mRNA wurde mit Superscript II-reverser Transkriptase und oligo-dT-Primern (Invitrogen) in cDNA umgeschrieben.

Quantitative real-time-PCR wurde mit dem LightCycler 2.0-System und dem LightCycler DNA Master SYBR Green I-Kit (Roche) durchgeführt. Bei diesem System wird die DNA-Menge über die Interkalation des Farbstoffes SYBR Green I und die daraus resultierende Fluoreszenz bei 521 nm bestimmt.

Das benutzte System erlaubt eine relative Quantifizierung von cDNA-Mengen. Hierzu wird die Probe erst hinsichtlich des Referenzgens  $\beta$ 2-Mikroglobulin vermessen und anschließend hinsichtlich des Zielgens. Die Effizienz, d.h. die Vervielfältigungsrate pro Zyklus, wurde vorher für jedes spezifische Primerpaar unter den benutzten Bedingungen mittels einer Eichkurve bestimmt (für die benutzten Pri-

merpaare siehe Tabelle „Oligonukleotide für Lightcycler“). Abweichend vom Standardprotokoll wurden 10 µl Gesamtvolumen statt 20 µl benutzt. Jede Probe wurde als Duplikat vermessen; bei jedem Lauf wurde eine Negativkontrolle, die keine *template*-cDNA enthielt, mitgeführt. Die Auswertung erfolgte mittels LightCycler3 Data Analysis-Programm (Roche) und Tabellenkalkulation. Zur besseren Visualisierung wurden die normalisierten Expressionsdaten mit dem konstanten Faktor  $1 \times 10^8$  multipliziert. Eine Relativierung auf z. B. das Expressionsniveau in unstimulierten Zellen war vor allem bei RCAN1-4 unpraktisch, da RCAN1-4 in unstimulierten Zellen kaum zu detektieren ist.

## 6 Abkürzungsverzeichnis

AID	autoinhibitorische Domäne von Calcineurin A
AK	Antikörper
AP-1	activator protein 1
APC	antigen-präsentierende Zelle
AS	Aminosäure
BSA	Bovines Serumalbumin
bp	Basenpaare
CaM	Calmodulin
CaN	Calcineurin
CD	cluster of differentiation
cDNA	komplementäre DNA
CK1	Caseinkinase 1
CNBR	calcineurinbindende Region
CsA	Cyclosporin A
CypA	Cyclophilin A
DAG	Diacylglycerol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DYRK	Dual specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtBr	Ethidiumbromid
FACS	fluoreszenzaktivierte Zellsortierung
FCS	fötales Kälberserum
FKBP	FK506-bindendes Protein
FITC	Fluoreszinoisothiocyanat
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GSK3	Glykogensynthasekinase 3
GST	Glutathion S-Transferase
HEK	human embryonic kidney cells
IL	Interleukin
Iono	Ionomycin
IP <sub>3</sub>	Inositol-1,4,5-trisphosphat
MACS	magnetisch aktivierte Zellsortierung
MAP	mitogen activated protein
MAPK	MAP-Kinase
MHC	major histocompatibility complex
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
NFAT	nuclear factor of activated T cells
NF-κB	nuclear factor κ-light-chain-enhancer of activated B cells

PBS	phosphate buffered saline
PE	Phycoerythrin
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PMA	Phorbolmyristylacetat
PPIase	Prolyl-Peptidyl- <i>cis-trans</i> -Isomerase
RCAN	regulator of calcineurin
RE	Restriktionsenzym
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
shRNA	small hairpin RNA
TCR	T-Zell-Rezeptor
T <sub>H</sub> -Zelle	T-Helfer-Zelle
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$

## 7 Literaturverzeichnis

1. Murphy KP: **Janeway's immunobiology**, 7th edn. New York: Garland Science; 2008.
2. Thompson CB, Lindsten T, Ledbetter JA, Kunkel SL, Young HA, Emerson SG, Leiden JM, June CH: **CD28 activation pathway regulates the production of multiple T-cell-derived lymphokines/cytokines**. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989, **86**(4):1333-1337.
3. Gett AV, Hodgkin PD: **A cellular calculus for signal integration by T cells**. *Nat Immunol* 2000, **1**(3):239-244.
4. Cantrell D: **T cell antigen receptor signal transduction pathways**. *Annu Rev Immunol* 1996, **14**:259-274.
5. Serfling E, Avots A, Neumann M: **The architecture of the interleukin-2 promoter: a reflection of T lymphocyte activation**. *Biochim Biophys Acta* 1995, **1263**(3):181-200.
6. Smith-Garvin JE, Koretzky GA, Jordan MS: **T cell activation**. *Annu Rev Immunol* 2009, **27**:591-619.
7. Rooney JW, Sun YL, Glimcher LH, Hoey T: **Novel NFAT sites that mediate activation of the interleukin-2 promoter in response to T-cell receptor stimulation**. *Mol Cell Biol* 1995, **15**(11):6299-6310.
8. Nishizuka Y: **The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumour promotion**. *Nature* 1984, **308**(5961):693-698.
9. Kauffman RF, Taylor RW, Pfeiffer DR: **Cation transport and specificity of ionomycin. Comparison with ionophore A23187 in rat liver mitochondria**. *J Biol Chem* 1980, **255**(7):2735-2739.
10. Klee CB, Krinks MH: **Purification of cyclic 3',5'-nucleotide phosphodiesterase inhibitory protein by affinity chromatography on activator protein coupled to Sepharose**. *Biochemistry* 1978, **17**(1):120-126.
11. Barford D, Das AK, Egloff MP: **The structure and mechanism of protein phosphatases: insights into catalysis and regulation**. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 1998, **27**:133-164.
12. Hellstern S, Dammann H, Husain Q, Mutzel R: **Overexpression, purification and characterization of Dictyostelium calcineurin A**. *Res Microbiol* 1997, **148**(4):335-343.
13. Yang C, Song H, Weng H, Wei Q: **The primary identification of a calcineurin A subunit-like protein in plants**. *Biochimie* 2009, **91**(5):646-649.
14. Jiang H, Xiong F, Kong S, Ogawa T, Kobayashi M, Liu JO: **Distinct tissue and cellular distribution of two major isoforms of calcineurin**. *Mol Immunol* 1997, **34**(8-9):663-669.
15. Kilka S, Erdmann F, Migdoll A, Fischer G, Weiwad M: **The proline-rich N-terminal sequence of calcineurin A $\beta$  determines substrate binding**. *Biochemistry* 2009, **48**(9):1900-1910.
16. Chang CD, Mukai H, Kuno T, Tanaka C: **cDNA cloning of an alternatively spliced isoform of the regulatory subunit of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein phosphatase (calcineurin B $\alpha$  2)**. *Biochim Biophys Acta* 1994, **1217**(2):174-180.
17. Hogan PG, Li H: **Calcineurin**. *Curr Biol* 2005, **15**(12):R442-443.
18. Merat DL, Hu ZY, Carter TE, Cheung WY: **Bovine brain calmodulin-dependent protein phosphatase. Regulation of subunit A activity by calmodulin and subunit B**. *J Biol Chem* 1985, **260**(20):11053-11059.
19. Shen X, Li H, Ou Y, Tao W, Dong A, Kong J, Ji C, Yu S: **The secondary structure of calcineurin regulatory region and conformational change induced by calcium/calmodulin binding**. *J Biol Chem* 2008, **283**(17):11407-11413.
20. Klee CB, Ren H, Wang X: **Regulation of the calmodulin-stimulated protein phosphatase, calcineurin**. *J Biol Chem* 1998, **273**(22):13367-13370.
21. Rusnak F, Mertz P: **Calcineurin: form and function**. *Physiol Rev* 2000, **80**(4):1483-1521.
22. Shibasaki F, Hallin U, Uchino H: **Calcineurin as a multifunctional regulator**. *J Biochem* 2002, **131**(1):1-15.

23. Wang JH, Desai R: **Modulator binding protein. Bovine brain protein exhibiting the Ca<sup>2+</sup>-dependent association with the protein modulator of cyclic nucleotide phosphodiesterase.** *J Biol Chem* 1977, **252**(12):4175-4184.
24. Klee CB, Crouch TH, Krinks MH: **Calcineurin: a calcium- and calmodulin-binding protein of the nervous system.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979, **76**(12):6270-6273.
25. Wen Z, Guirland C, Ming GL, Zheng JQ: **A CaMKII/calcineurin switch controls the direction of Ca(2+)-dependent growth cone guidance.** *Neuron* 2004, **43**(6):835-846.
26. Mansuy IM, Mayford M, Jacob B, Kandel ER, Bach ME: **Restricted and regulated overexpression reveals calcineurin as a key component in the transition from short-term to long-term memory.** *Cell* 1998, **92**(1):39-49.
27. Nichols RA, Suplick GR, Brown JM: **Calcineurin-mediated protein dephosphorylation in brain nerve terminals regulates the release of glutamate.** *J Biol Chem* 1994, **269**(38):23817-23823.
28. Chin ER, Olson EN, Richardson JA, Yang Q, Humphries C, Shelton JM, Wu H, Zhu W, Bassel-Duby R, Williams RS: **A calcineurin-dependent transcriptional pathway controls skeletal muscle fiber type.** *Genes Dev* 1998, **12**(16):2499-2509.
29. Wu H, Rothermel B, Kanatous S, Rosenberg P, Naya FJ, Shelton JM, Hutcheson KA, DiMaio JM, Olson EN, Bassel-Duby R *et al*: **Activation of MEF2 by muscle activity is mediated through a calcineurin-dependent pathway.** *Embo J* 2001, **20**(22):6414-6423.
30. Chakkalakal JV, Stocksley MA, Harrison MA, Angus LM, Deschenes-Furry J, St-Pierre S, Megeney LA, Chin ER, Michel RN, Jasmin BJ: **Expression of utrophin A mRNA correlates with the oxidative capacity of skeletal muscle fiber types and is regulated by calcineurin/NFAT signaling.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003, **100**(13):7791-7796.
31. Morioka M, Hamada J, Ushio Y, Miyamoto E: **Potential role of calcineurin for brain ischemia and traumatic injury.** *Prog Neurobiol* 1999, **58**(1):1-30.
32. Crabtree GR, Olson EN: **NFAT signaling: choreographing the social lives of cells.** *Cell* 2002, **109** Suppl:S67-79.
33. Rao A, Luo C, Hogan PG: **Transcription factors of the NFAT family: regulation and function.** *Annu Rev Immunol* 1997, **15**:707-747.
34. Batiuk TD, Halloran PF: **The downstream consequences of calcineurin inhibition.** *Transplant Proc* 1997, **29**(1-2):1239-1240.
35. Graef IA, Chen F, Chen L, Kuo A, Crabtree GR: **Signals transduced by Ca(2+)/calcineurin and NFATc3/c4 pattern the developing vasculature.** *Cell* 2001, **105**(7):863-875.
36. Bueno OF, Brandt EB, Rothenberg ME, Molkentin JD: **Defective T cell development and function in calcineurin A beta -deficient mice.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002, **99**(14):9398-9403.
37. Mancini M, Toker A: **NFAT proteins: emerging roles in cancer progression.** *Nat Rev Cancer* 2009, **9**(11):810-820.
38. Chuvpilo S, Avots A, Berberich-Siebelt F, Glockner J, Fischer C, Kerstan A, Escher C, Inashkina I, Hlubek F, Jankevics E *et al*: **Multiple NF-ATc isoforms with individual transcriptional properties are synthesized in T lymphocytes.** *J Immunol* 1999, **162**(12):7294-7301.
39. Serfling E, Berberich-Siebelt F, Chuvpilo S, Jankevics E, Klein-Hessling S, Twardzik T, Avots A: **The role of NF-AT transcription factors in T cell activation and differentiation.** *Biochim Biophys Acta* 2000, **1498**(1):1-18.
40. Hogan PG, Chen L, Nardone J, Rao A: **Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT.** *Genes Dev* 2003, **17**(18):2205-2232.
41. Macian F: **NFAT proteins: key regulators of T-cell development and function.** *Nat Rev Immunol* 2005, **5**(6):472-484.
42. Wu H, Peisley A, Graef IA, Crabtree GR: **NFAT signaling and the invention of vertebrates.** *Trends Cell Biol* 2007, **17**(6):251-260.
43. Graef IA, Gastier JM, Francke U, Crabtree GR: **Evolutionary relationships among Rel domains indicate functional diversification by recombination.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001, **98**(10):5740-5745.



44. Liou J, Kim ML, Heo WD, Jones JT, Myers JW, Ferrell JE, Jr., Meyer T: **STIM is a Ca<sup>2+</sup> sensor essential for Ca<sup>2+</sup>-store-depletion-triggered Ca<sup>2+</sup> influx.** *Curr Biol* 2005, **15**(13):1235-1241.
45. Oh-hora M, Rao A: **Calcium signaling in lymphocytes.** *Curr Opin Immunol* 2008, **20**(3):250-258.
46. Feske S, Gwack Y, Prakriya M, Srikanth S, Puppel SH, Tanasa B, Hogan PG, Lewis RS, Daly M, Rao A: **A mutation in Orai1 causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function.** *Nature* 2006, **441**(7090):179-185.
47. Liu JO: **Calmodulin-dependent phosphatase, kinases, and transcriptional corepressors involved in T-cell activation.** *Immunol Rev* 2009, **228**(1):184-198.
48. Okamura H, Aramburu J, Garcia-Rodriguez C, Viola JP, Raghavan A, Tahiliani M, Zhang X, Qin J, Hogan PG, Rao A: **Concerted dephosphorylation of the transcription factor NFAT1 induces a conformational switch that regulates transcriptional activity.** *Mol Cell* 2000, **6**(3):539-550.
49. Luo C, Shaw KT, Raghavan A, Aramburu J, Garcia-Cozar F, Perrino BA, Hogan PG, Rao A: **Interaction of calcineurin with a domain of the transcription factor NFAT1 that controls nuclear import.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996, **93**(17):8907-8912.
50. Beals CR, Sheridan CM, Turck CW, Gardner P, Crabtree GR: **Nuclear export of NF-ATc enhanced by glycogen synthase kinase-3.** *Science* 1997, **275**(5308):1930-1934.
51. Liu J, Masuda ES, Tsuruta L, Arai N, Arai K: **Two independent calcineurin-binding regions in the N-terminal domain of murine NF-ATx1 recruit calcineurin to murine NF-ATx1.** *J Immunol* 1999, **162**(8):4755-4761.
52. Aramburu J, Garcia-Cozar F, Raghavan A, Okamura H, Rao A, Hogan PG: **Selective inhibition of NFAT activation by a peptide spanning the calcineurin targeting site of NFAT.** *Mol Cell* 1998, **1**(5):627-637.
53. Garcia-Cozar FJ, Okamura H, Aramburu JF, Shaw KT, Pelletier L, Showalter R, Villafranca E, Rao A: **Two-site interaction of nuclear factor of activated T cells with activated calcineurin.** *J Biol Chem* 1998, **273**(37):23877-23883.
54. Martinez-Martinez S, Rodriguez A, Lopez-Maderuelo MD, Ortega-Perez I, Vazquez J, Redondo JM: **Blockade of NFAT activation by the second calcineurin binding site.** *J Biol Chem* 2006, **281**(10):6227-6235.
55. Rodriguez A, Roy J, Martinez-Martinez S, Lopez-Maderuelo MD, Nino-Moreno P, Orti L, Pantoja-Uceda D, Pineda-Lucena A, Cyert MS, Redondo JM: **A conserved docking surface on calcineurin mediates interaction with substrates and immunosuppressants.** *Mol Cell* 2009, **33**(5):616-626.
56. Li H, Zhang L, Rao A, Harrison SC, Hogan PG: **Structure of calcineurin in complex with PVIVIT peptide: portrait of a low-affinity signalling interaction.** *J Mol Biol* 2007, **369**(5):1296-1306.
57. Roy J, Li H, Hogan PG, Cyert MS: **A conserved docking site modulates substrate affinity for calcineurin, signaling output, and in vivo function.** *Mol Cell* 2007, **25**(6):889-901.
58. Mulero MC, Aubareda A, Orzaez M, Messeguer J, Serrano-Candelas E, Martinez-Hoyer S, Messeguer A, Perez-Paya E, Perez-Riba M: **Inhibiting the calcineurin-NFAT (nuclear factor of activated T cells) signaling pathway with a regulator of calcineurin-derived peptide without affecting general calcineurin phosphatase activity.** *J Biol Chem* 2009, **284**(14):9394-9401.
59. Hayden MS, Ghosh S: **Signaling to NF-kappaB.** *Genes Dev* 2004, **18**(18):2195-2224.
60. Trushin SA, Pennington KN, Algeciras-Schimmich A, Paya CV: **Protein kinase C and calcineurin synergize to activate IkkappaB kinase and NF-kappaB in T lymphocytes.** *J Biol Chem* 1999, **274**(33):22923-22931.
61. Thome M: **CARMA1, BCL-10 and MALT1 in lymphocyte development and activation.** *Nat Rev Immunol* 2004, **4**(5):348-359.
62. Schulze-Luehrmann J, Ghosh S: **Antigen-receptor signaling to nuclear factor kappa B.** *Immunity* 2006, **25**(5):701-715.
63. Vallabhapurapu S, Karin M: **Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the immune system.** *Annu Rev Immunol* 2009, **27**:693-733.

64. Zhang SQ, Kovalenko A, Cantarella G, Wallach D: **Recruitment of the IKK signalosome to the p55 TNF receptor: RIP and A20 bind to NEMO (IKK $\gamma$ ) upon receptor stimulation.** *Immunity* 2000, **12**(3):301-311.
65. Foletta VC: **Transcription factor AP-1, and the role of Fra-2.** *Immunol Cell Biol* 1996, **74**(2):121-133.
66. Lin J, Weiss A: **T cell receptor signalling.** *J Cell Sci* 2001, **114**(Pt 2):243-244.
67. Li W, Whaley CD, Bonnevier JL, Mondino A, Martin ME, Aagaard-Tillery KM, Mueller DL: **CD28 signaling augments Elk-1-dependent transcription at the c-fos gene during antigen stimulation.** *J Immunol* 2001, **167**(2):827-835.
68. Su Q, Eugster HP, Ryffel B, Dumont FJ: **Cyclosporin A enhances the calcium-dependent induction of AP-1 complex and c-fos mRNA in a T cell lymphoma.** *Biochem Biophys Res Commun* 1996, **229**(1):249-256.
69. Sugimoto T, Stewart S, Guan KL: **The calcium/calmodulin-dependent protein phosphatase calcineurin is the major Elk-1 phosphatase.** *J Biol Chem* 1997, **272**(47):29415-29418.
70. Su B, Jacinto E, Hibi M, Kallunki T, Karin M, Ben-Neriah Y: **JNK is involved in signal integration during costimulation of T lymphocytes.** *Cell* 1994, **77**(5):727-736.
71. Macian F, Lopez-Rodriguez C, Rao A: **Partners in transcription: NFAT and AP-1.** *Oncogene* 2001, **20**(19):2476-2489.
72. Avraham A, Jung S, Samuels Y, Seger R, Ben-Neriah Y: **Co-stimulation-dependent activation of a JNK-kinase in T lymphocytes.** *Eur J Immunol* 1998, **28**(8):2320-2330.
73. Taylor AL, Watson CJ, Bradley JA: **Immunosuppressive agents in solid organ transplantation: Mechanisms of action and therapeutic efficacy.** *Crit Rev Oncol Hematol* 2005, **56**(1):23-46.
74. El-Batawy MM, Bosseila MA, Mashaly HM, Hafez VS: **Topical calcineurin inhibitors in atopic dermatitis: a systematic review and meta-analysis.** *J Dermatol Sci* 2009, **54**(2):76-87.
75. Brandt C, Pavlovic V, Radbruch A, Worm M, Baumgrass R: **Low-dose cyclosporine A therapy increases the regulatory T cell population in patients with atopic dermatitis.** *Allergy* 2009.
76. Sugiura R, Sio SO, Shuntoh H, Kuno T: **Molecular genetic analysis of the calcineurin signaling pathways.** *Cell Mol Life Sci* 2001, **58**(2):278-288.
77. Borel JF, Feurer C, Gubler HU, Stahelin H: **Biological effects of cyclosporin A: a new antilymphocytic agent.** *Agents Actions* 1976, **6**(4):468-475.
78. Lawen A, Zocher R: **Cyclosporin synthetase. The most complex peptide synthesizing multienzyme polypeptide so far described.** *J Biol Chem* 1990, **265**(19):11355-11360.
79. Kino T, Hatanaka H, Hashimoto M, Nishiyama M, Goto T, Okuhara M, Kohsaka M, Aoki H, Imanaka H: **FK-506, a novel immunosuppressant isolated from a Streptomyces. I. Fermentation, isolation, and physico-chemical and biological characteristics.** *J Antibiot (Tokyo)* 1987, **40**(9):1249-1255.
80. Calne RY, Rolles K, White DJ, Thiru S, Evans DB, McMaster P, Dunn DC, Craddock GN, Henderson RG, Aziz S *et al*: **Cyclosporin A initially as the only immunosuppressant in 34 recipients of cadaveric organs: 32 kidneys, 2 pancreases, and 2 livers.** *Lancet* 1979, **2**(8151):1033-1036.
81. Starzl TE, Weil R, 3rd, Iwatsuki S, Klintmalm G, Schroter GP, Koep LJ, Iwaki Y, Terasaki PI, Porter KA: **The use of cyclosporin A and prednisone in cadaver kidney transplantation.** *Surg Gynecol Obstet* 1980, **151**(1):17-26.
82. Starzl TE, Todo S, Fung J, Demetris AJ, Venkataramman R, Jain A: **FK 506 for liver, kidney, and pancreas transplantation.** *Lancet* 1989, **2**(8670):1000-1004.
83. Handschumacher RE, Harding MW, Rice J, Drugge RJ, Speicher DW: **Cyclophilin: a specific cytosolic binding protein for cyclosporin A.** *Science* 1984, **226**(4674):544-547.
84. Siekierka JJ, Hung SH, Poe M, Lin CS, Sigal NH: **A cytosolic binding protein for the immunosuppressant FK506 has peptidyl-prolyl isomerase activity but is distinct from cyclophilin.** *Nature* 1989, **341**(6244):755-757.

85. Harding MW, Galat A, Uehling DE, Schreiber SL: **A receptor for the immunosuppressant FK506 is a cis-trans peptidyl-prolyl isomerase.** *Nature* 1989, **341**(6244):758-760.
86. 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**(4):807-815.
87. Schreiber SL, Crabtree GR: **The mechanism of action of cyclosporin A and FK506.** *Immunol Today* 1992, **13**(4):136-142.
88. Wang P, Heitman J: **The cyclophilins.** *Genome Biol* 2005, **6**(7):226.
89. 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**(6206):476-478.
90. Yang WM, Inouye CJ, Seto E: **Cyclophilin A and FKBP12 interact with YY1 and alter its transcriptional activity.** *J Biol Chem* 1995, **270**(25):15187-15193.
91. Schiene-Fischer C, Yu C: **Receptor accessory folding helper enzymes: the functional role of peptidyl prolyl cis/trans isomerases.** *FEBS Lett* 2001, **495**(1-2):1-6.
92. Kang CB, Hong Y, Dhe-Paganon S, Yoon HS: **FKBP family proteins: immunophilins with versatile biological functions.** *Neurosignals* 2008, **16**(4):318-325.
93. Chaudhuri B, Hammerle M, Furst P: **The interaction between the catalytic A subunit of calcineurin and its autoinhibitory domain, in the yeast two-hybrid system, is disrupted by cyclosporin A and FK506.** *FEBS Lett* 1995, **357**(2):221-226.
94. Griffith JP, Kim JL, Kim EE, Sintchak MD, Thomson JA, Fitzgibbon MJ, Fleming MA, Caron PR, Hsiao K, Navia MA: **X-ray structure of calcineurin inhibited by the immunophilin-immunosuppressant FKBP12-FK506 complex.** *Cell* 1995, **82**(3):507-522.
95. Kissinger CR, Parge HE, Knighton DR, Lewis CT, Pelletier LA, Tempczyk A, Kalish VJ, Tucker KD, Showalter RE, Moomaw EW *et al*: **Crystal structures of human calcineurin and the human FKBP12-FK506-calcineurin complex.** *Nature* 1995, **378**(6557):641-644.
96. 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.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002, **99**(19):12037-12042.
97. Jin L, Harrison SC: **Crystal structure of human calcineurin complexed with cyclosporin A and human cyclophilin.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002, **99**(21):13522-13526.
98. Swanson SK, Born T, Zydowsky LD, Cho H, Chang HY, Walsh CT, Rusnak F: **Cyclosporin-mediated inhibition of bovine calcineurin by cyclophilins A and B.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992, **89**(9):3741-3745.
99. Yin M, Ochs RS: **Mechanism for the paradoxical inhibition and stimulation of calcineurin by the immunosuppressive drug tacrolimus (FK506).** *Arch Biochem Biophys* 2003, **419**(2):207-213.
100. Kalli K, Huntoon C, Bell M, McKean DJ: **Mechanism responsible for T-cell antigen receptor- and CD28- or interleukin 1 (IL-1) receptor-initiated regulation of IL-2 gene expression by NF-kappaB.** *Mol Cell Biol* 1998, **18**(6):3140-3148.
101. Aoki Y, Kao PN: **Erythromycin inhibits transcriptional activation of NF-kappaB, but not NFAT, through calcineurin-independent signaling in T cells.** *Antimicrob Agents Chemother* 1999, **43**(11):2678-2684.
102. Steffan NM, Bren GD, Frantz B, Tocci MJ, O'Neill EA, Paya CV: **Regulation of Ikb alpha phosphorylation by PKC- and Ca(2+)-dependent signal transduction pathways.** *J Immunol* 1995, **155**(10):4685-4691.
103. Oetjen E, Thoms KM, Laufer Y, Pape D, Blume R, Li P, Knepel W: **The immunosuppressive drugs cyclosporin A and tacrolimus inhibit membrane depolarization-induced CREB transcriptional activity at the coactivator level.** *Br J Pharmacol* 2005, **144**(7):982-993.
104. Marienfeld R, Neumann M, Chuvpilo S, Escher C, Kneitz B, Avots A, Schimpl A, Serfling E: **Cyclosporin A interferes with the inducible degradation of NF-kappa B inhibitors, but not with the processing of p105/NF-kappa B1 in T cells.** *Eur J Immunol* 1997, **27**(7):1601-1609.
105. Meyer S, Kohler NG, Joly A: **Cyclosporine A is an uncompetitive inhibitor of proteasome activity and prevents NF-kappaB activation.** *FEBS Lett* 1997, **413**(2):354-358.

106. Fung JJ, Alessiani M, Abu-Elmagd K, Todo S, Shapiro R, Tzakis A, Van Thiel D, Armitage J, Jain A, McCauley J *et al*: **Adverse effects associated with the use of FK 506.** *Transplant Proc* 1991, **23**(6):3105-3108.
107. Naesens M, Kuypers DR, Sarwal M: **Calcineurin inhibitor nephrotoxicity.** *Clin J Am Soc Nephrol* 2009, **4**(2):481-508.
108. Kiani A, Rao A, Aramburu J: **Manipulating immune responses with immunosuppressive agents that target NFAT.** *Immunity* 2000, **12**(4):359-372.
109. Liu JO: **Endogenous protein inhibitors of calcineurin.** *Biochem Biophys Res Commun* 2003, **311**(4):1103-1109.
110. Mulero MC, Aubareda A, Schluter A, Perez-Riba M: **RCAN3, a novel calcineurin inhibitor that down-regulates NFAT-dependent cytokine gene expression.** *Biochim Biophys Acta* 2007, **1773**(3):330-341.
111. Mehta S, Li H, Hogan PG, Cunningham KW: **Domain architecture of the regulators of calcineurin (RCANs) and identification of a divergent RCAN in yeast.** *Mol Cell Biol* 2009, **29**(10):2777-2793.
112. Davies KJ, Ermak G, Rothermel BA, Pritchard M, Heitman J, Ahnn J, Henrique-Silva F, Crawford D, Canaider S, Strippoli P *et al*: **Renaming the DSCR1/Adapt78 gene family as RCAN: regulators of calcineurin.** *Faseb J* 2007, **21**(12):3023-3028.
113. Aubareda A, Mulero MC, Perez-Riba M: **Functional characterization of the calcipressin 1 motif that suppresses calcineurin-mediated NFAT-dependent cytokine gene expression in human T cells.** *Cell Signal* 2006.
114. Vega RB, Yang J, Rothermel BA, Bassel-Duby R, Williams RS: **Multiple domains of MCIP1 contribute to inhibition of calcineurin activity.** *J Biol Chem* 2002, **277**(33):30401-30407.
115. 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.** *Biochem J* 2003, **374**(Pt 2):567-575.
116. Hilioti Z, Gallagher DA, Low-Nam ST, Ramaswamy P, Gajer P, Kingsbury TJ, Birchwood CJ, Levchenko A, Cunningham KW: **GSK-3 kinases enhance calcineurin signaling by phosphorylation of RCNs.** *Genes Dev* 2004, **18**(1):35-47.
117. Liu Q, Busby JC, Molkentin JD: **Interaction between TAK1-TAB1-TAB2 and RCAN1-calcineurin defines a signalling nodal control point.** *Nat Cell Biol* 2009, **11**(2):154-161.
118. Lee EJ, Seo SR, Um JW, Park J, Oh Y, Chung KC: **NF-kappaB-inducing kinase phosphorylates and blocks the degradation of Down syndrome candidate region 1.** *J Biol Chem* 2008, **283**(6):3392-3400.
119. Seo SR, Chung KC: **CREB activates proteasomal degradation of DSCR1/RCAN1.** *FEBS Lett* 2008, **582**(13):1889-1893.
120. Liu H, Wang P, Song W, Sun X: **Degradation of regulator of calcineurin 1 (RCAN1) is mediated by both chaperone-mediated autophagy and ubiquitin proteasome pathways.** *Faseb J* 2009, **23**(10):3383-3392.
121. Abbasi S, Lee JD, Su B, Chen X, Alcon JL, Yang J, Kellems RE, Xia Y: **Protein kinase-mediated regulation of calcineurin through the phosphorylation of modulatory calcineurin-interacting protein 1.** *J Biol Chem* 2006, **281**(12):7717-7726.
122. Shin SY, Yang JM, Choo SM, Kwon KS, Cho KH: **System-level investigation into the regulatory mechanism of the calcineurin/NFAT signaling pathway.** *Cell Signal* 2008, **20**(6):1117-1124.
123. Kingsbury TJ, Cunningham KW: **A conserved family of calcineurin regulators.** *Genes Dev* 2000, **14**(13):1595-1604.
124. Sanna B, Brandt EB, Kaiser RA, Pfluger P, Witt SA, Kimball TR, van Rooij E, De Windt LJ, Rothenberg ME, Tschop MH *et al*: **Modulatory calcineurin-interacting proteins 1 and 2 function as calcineurin facilitators in vivo.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006, **103**(19):7327-7332.
125. 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.** *J Biol Chem* 2000, **275**(12):8719-8725.

126. Crawford DR, Leahy KP, Abramova N, Lan L, Wang Y, Davies KJ: **Hamster adapt78 mRNA is a Down syndrome critical region homologue that is inducible by oxidative stress.** *Arch Biochem Biophys* 1997, **342**(1):6-12.
127. 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.** *Hum Mol Genet* 1995, **4**(10):1935-1944.
128. Rothermel BA, Vega RB, Williams RS: **The role of modulatory calcineurin-interacting proteins in calcineurin signaling.** *Trends Cardiovasc Med* 2003, **13**(1):15-21.
129. Fuentes JJ, Pritchard MA, Estivill X: **Genomic organization, alternative splicing, and expression patterns of the DSCR1 (Down syndrome candidate region 1) gene.** *Genomics* 1997, **44**(3):358-361.
130. U M, Shen L, Oshida T, Miyauchi J, Yamada M, Miyashita T: **Identification of novel direct transcriptional targets of glucocorticoid receptor.** *Leukemia* 2004, **18**(11):1850-1856.
131. Hirakawa Y, Nary LJ, Medh RD: **Glucocorticoid evoked upregulation of RCAN1-1 in human leukemic CEM cells susceptible to apoptosis.** *J Mol Signal* 2009, **4**:6.
132. Mammucari C, Tommasi di Vignano A, Sharov AA, Neilson J, Havrda MC, Roop DR, Botchkarev VA, Crabtree GR, Dotto GP: **Integration of Notch 1 and calcineurin/NFAT signaling pathways in keratinocyte growth and differentiation control.** *Dev Cell* 2005, **8**(5):665-676.
133. Ermak G, Harris CD, Battocchio D, Davies KJ: **RCAN1 (DSCR1 or Adapt78) stimulates expression of GSK-3beta.** *Febs J* 2006, **273**(10):2100-2109.
134. Yang J, Rothermel B, Vega RB, Frey N, McKinsey TA, Olson EN, Bassel-Duby R, Williams RS: **Independent signals control expression of the calcineurin inhibitory proteins MCIP1 and MCIP2 in striated muscles.** *Circ Res* 2000, **87**(12):E61-68.
135. Lin HY, Michtalik HJ, Zhang S, Andersen TT, Van Riper DA, Davies KK, Ermak G, Petti LM, Nachod S, Narayan AV *et al*: **Oxidative and calcium stress regulate DSCR1 (Adapt78/MCIP1) protein.** *Free Radic Biol Med* 2003, **35**(5):528-539.
136. Wang Y, De Keulenaer GW, Weinberg EO, Muangman S, Gualberto A, Landschulz KT, Turi TG, Thompson JF, Lee RT: **Direct biomechanical induction of endogenous calcineurin inhibitor Down Syndrome Critical Region-1 in cardiac myocytes.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002, **283**(2):H533-539.
137. Lee JY, Lee HJ, Lee EJ, Jang SH, Kim H, Yoon JH, Chung KC: **Down syndrome candidate region-1 protein interacts with Tollip and positively modulates interleukin-1 receptor-mediated signaling.** *Biochim Biophys Acta* 2009, **1790**(12):1673-1680.
138. Lee HJ, Kim YS, Sato Y, Cho YJ: **RCAN1-4 knockdown attenuates cell growth through the inhibition of Ras signaling.** *FEBS Lett* 2009, **583**(15):2557-2564.
139. Miyazaki T, Kanou Y, Murata Y, Ohmori S, Niwa T, Maeda K, Yamamura H, Seo H: **Molecular cloning of a novel thyroid hormone-responsive gene, ZAKI-4, in human skin fibroblasts.** *J Biol Chem* 1996, **271**(24):14567-14571.
140. Canaider S, Facchin F, Griffoni C, Casadei R, Vitale L, Lenzi L, Frabetti F, D'Addabbo P, Carinci P, Zannotti M *et al*: **Proteins encoded by human Down syndrome critical region gene 1-like 2 (DSCR1L2) mRNA and by a novel DSCR1L2 mRNA isoform interact with cardiac troponin I (TNNI3).** *Gene* 2006, **372**:128-136.
141. Sieber M, Karanik M, Brandt C, Blex C, Podtschaske M, Erdmann F, Rost R, Serfling E, Lieb-scher J, Patzel M *et al*: **Inhibition of calcineurin-NFAT signaling by the pyrazolopyrimidine compound NCI3.** *Eur J Immunol* 2007, **37**(9):2617-2626.
142. Mondino A, Mueller DL: **mTOR at the crossroads of T cell proliferation and tolerance.** *Semin Immunol* 2007, **19**(3):162-172.
143. Thomson AW, Turnquist HR, Raimondi G: **Immunoregulatory functions of mTOR inhibition.** *Nat Rev Immunol* 2009, **9**(5):324-337.
144. Baumgrass R, Weiwad M, Erdmann F, Liu JO, Wunderlich D, Grabley S, Fischer G: **Reversible inhibition of calcineurin by the polyphenolic aldehyde gossypol.** *J Biol Chem* 2001, **276**(51):47914-47921.
145. Sieber M, Baumgrass R: **Novel inhibitors of the calcineurin/NFATc hub - alternatives to CsA and FK506?** *Cell Commun Signal* 2009, **7**:25.

146. Aramburu J, Yaffe MB, Lopez-Rodriguez C, Cantley LC, Hogan PG, Rao A: **Affinity-driven peptide selection of an NFAT inhibitor more selective than cyclosporin A.** *Science* 1999, **285**(5436):2129-2133.
147. Proksch P, Giaisi M, Treiber MK, Palfi K, Merling A, Spring H, Krammer PH, Li-Weber M: **Ro-caglamide derivatives are immunosuppressive phytochemicals that target NF-AT activity in T cells.** *J Immunol* 2005, **174**(11):7075-7084.
148. Lindstedt R, Ruggiero V, V DA, Manganello S, Petronzelli F, Stasi MA, Vendetti S, Assandri A, Carminati P, De Santis R: **The immunosuppressor st1959, a 3,5-diaryl-s-triazole derivative, inhibits T cell activation by reducing NFAT nuclear residency.** *Int J Immunopathol Pharmacol* 2009, **22**(1):29-42.
149. O'Keefe SJ, Tamura J, Kincaid RL, Tocci MJ, O'Neill EA: **FK-506- and CsA-sensitive activation of the interleukin-2 promoter by calcineurin.** *Nature* 1992, **357**(6380):692-694.
150. Rodriguez A, Martinez-Martinez S, Lopez-Maderuelo MD, Ortega-Perez I, Redondo JM: **The linker region joining the catalytic and the regulatory domains of CnA is essential for binding to NFAT.** *J Biol Chem* 2005, **280**(11):9980-9984.
151. 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.** *J Biol Chem* 2004, **279**(4):2470-2479.
152. Zhang Y, Baumgrass R, Schutkowski M, Fischer G: **Branches on the alpha-C atom of cyclosporin A residue 3 result in direct calcineurin inhibition and rapid cyclophilin 18 binding.** *Chembiochem* 2004, **5**(7):1006-1009.
153. Högestatt ED, Jönsson BA, Ermund A, Andersson DA, Björk H, Alexander JP, Cravatt BF, Basbaum AI, Zygmunt PM: **Conversion of acetaminophen to the bioactive N-acylphenolamine AM404 via fatty acid amide hydrolase-dependent arachidonic acid conjugation in the nervous system.** *J Biol Chem* 2005, **280**(36):31405-31412.
154. Caballero FJ, Navarrete CM, Hess S, Fiebich BL, Appendino G, Macho A, Munoz E, Sancho R: **The acetaminophen-derived bioactive N-acylphenolamine AM404 inhibits NFAT by targeting nuclear regulatory events.** *Biochem Pharmacol* 2007, **73**(7):1013-1023.
155. Trevillyan JM, Chiou XG, Chen YW, Ballaron SJ, Sheets MP, Smith ML, Wiedeman PE, Warrior U, Wilkins J, Gubbins EJ *et al*: **Potent inhibition of NFAT activation and T cell cytokine production by novel low molecular weight pyrazole compounds.** *J Biol Chem* 2001, **276**(51):48118-48126.
156. Roth MD: **Interleukin 2 induces the expression of CD45RO and the memory phenotype by CD45RA+ peripheral blood lymphocytes.** *J Exp Med* 1994, **179**(3):857-864.
157. Farber DL: **Differential TCR signaling and the generation of memory T cells.** *J Immunol* 1998, **160**(2):535-539.
158. Horgan KJ, Tanaka Y, Shaw S: **Postthymic differentiation of CD4 T lymphocytes: naive versus memory subsets and further specialization among memory cells.** *Chem Immunol* 1992, **54**:72-102.
159. Dutton RW, Bradley LM, Swain SL: **T cell memory.** *Annu Rev Immunol* 1998, **16**:201-223.
160. Clement LT: **Isoforms of the CD45 common leukocyte antigen family: markers for human T-cell differentiation.** *J Clin Immunol* 1992, **12**(1):1-10.
161. Qin Y, Van Den Noort S, Kurt J, Gupta S: **Dual expression of CD45RA and CD45RO isoforms on myelin basic protein-specific CD4+ T-cell lines in multiple sclerosis.** *J Clin Immunol* 1993, **13**(2):152-161.
162. Pan F, Sun L, Kardian DB, Whartenby KA, Pardoll DM, Liu JO: **Feedback inhibition of calcineurin and Ras by a dual inhibitory protein Carabin.** *Nature* 2007, **445**(7126):433-436.
163. Ishikawa J, Ohga K, Yoshino T, Takezawa R, Ichikawa A, Kubota H, Yamada T: **A pyrazole derivative, YM-58483, potently inhibits store-operated sustained Ca<sup>2+</sup> influx and IL-2 production in T lymphocytes.** *J Immunol* 2003, **170**(9):4441-4449.
164. Zitt C, Strauss B, Schwarz EC, Spaeth N, Rast G, Hatzelmann A, Hoth M: **Potent inhibition of Ca<sup>2+</sup> release-activated Ca<sup>2+</sup> channels and T-lymphocyte activation by the pyrazole derivative BTP2.** *J Biol Chem* 2004, **279**(13):12427-12437.
165. Takezawa R, Cheng H, Beck A, Ishikawa J, Launay P, Kubota H, Kinet JP, Fleig A, Yamada T, Penner R: **A pyrazole derivative potently inhibits lymphocyte Ca<sup>2+</sup> influx and cytokine**

- production by facilitating transient receptor potential melastatin 4 channel activity.** *Mol Pharmacol* 2006, **69**(4):1413-1420.
166. Martin BL: **Inhibition of calcineurin by the tyrophostin class of tyrosine kinase inhibitors.** *Biochem Pharmacol* 1998, **56**(4):483-488.
  167. Stewart SG, Hill TA, Gilbert J, Ackland SP, Sakoff JA, McCluskey A: **Synthesis and biological evaluation of norcantharidin analogues: towards PP1 selectivity.** *Bioorg Med Chem* 2007, **15**(23):7301-7310.
  168. Brill GM, Premachandran U, Karwowski JP, Henry R, Cwik DK, Traphagen LM, Humphrey PE, Jackson M, Clement JJ, Burres NS *et al*: **Dibefurin, a novel fungal metabolite inhibiting calcineurin phosphatase activity.** *J Antibiot (Tokyo)* 1996, **49**(2):124-128.
  169. Weissenmayer B, Boeckeler K, Lahrz A, Mutzel R: **The calcineurin inhibitor gossypol impairs growth, cell signalling and development in Dictyostelium discoideum.** *FEMS Microbiol Lett* 2005, **242**(1):19-25.
  170. Weiser DC, Shenolikar S: **Use of protein phosphatase inhibitors.** *Curr Protoc Protein Sci* 2003, **Chapter 13**:Unit 13 10.
  171. Hashimoto Y, Perrino BA, Soderling TR: **Identification of an autoinhibitory domain in calcineurin.** *J Biol Chem* 1990, **265**(4):1924-1927.
  172. Mulero MC, Orzaez M, Messeguer J, Messeguer A, Perez-Paya E, Perez-Riba M: **A fluorescent polarization-based assay for the identification of disruptors of the RCAN1-calcineurin A protein complex.** *Anal Biochem* 2010, **398**(1):99-103.
  173. Linette GP, Li Y, Roth K, Korsmeyer SJ: **Cross talk between cell death and cell cycle progression: BCL-2 regulates NFAT-mediated activation.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996, **93**(18):9545-9552.
  174. Shibasaki F, Kondo E, Akagi T, McKeon F: **Suppression of signalling through transcription factor NF-AT by interactions between calcineurin and Bcl-2.** *Nature* 1997, **386**(6626):728-731.
  175. Mihatsch MJ, Kyo M, Morozumi K, Yamaguchi Y, Nickeleit V, Ryffel B: **The side-effects of ciclosporine-A and tacrolimus.** *Clin Nephrol* 1998, **49**(6):356-363.
  176. Durette PL, Boger J, Dumont F, Firestone R, Frankshun RA, Koprak SL, Lin CS, Melino MR, Pessolano AA, Pisano J *et al*: **A study of the correlation between cyclophilin binding and in vitro immunosuppressive activity of cyclosporine A and analogues.** *Transplant Proc* 1988, **20**(2 Suppl 2):51-57.
  177. Sigal NH, Dumont F, Durette P, Siekierka JJ, Peterson L, Rich DH, Dunlap BE, Staruch MJ, Melino MR, Koprak SL *et al*: **Is cyclophilin involved in the immunosuppressive and nephrotoxic mechanism of action of cyclosporin A?** *J Exp Med* 1991, **173**(3):619-628.
  178. Dumont FJ, Staruch MJ, Koprak SL, Siekierka JJ, Lin CS, Harrison R, Sewell T, Kindt VM, Beattie TR, Wyvratt M *et al*: **The immunosuppressive and toxic effects of FK-506 are mechanistically related: pharmacology of a novel antagonist of FK-506 and rapamycin.** *J Exp Med* 1992, **176**(3):751-760.
  179. Schulz EG, Mariani L, Radbruch A, Hofer T: **Sequential polarization and imprinting of type 1 T helper lymphocytes by interferon-gamma and interleukin-12.** *Immunity* 2009, **30**(5):673-683.
  180. Noguchi H, Matsushita M, Okitsu T, Moriwaki A, Tomizawa K, Kang S, Li ST, Kobayashi N, Matsumoto S, Tanaka K *et al*: **A new cell-permeable peptide allows successful allogeneic islet transplantation in mice.** *Nat Med* 2004, **10**(3):305-309.
  181. Yu H, van Berkel TJ, Biessen EA: **Therapeutic potential of VIVIT, a selective peptide inhibitor of nuclear factor of activated T cells, in cardiovascular disorders.** *Cardiovasc Drug Rev* 2007, **25**(2):175-187.
  182. Lee MY, Garvey SM, Baras AS, Lemmon JA, Gomez MF, Schoppee Bortz PD, Daum G, LeBoeuf RC, Wamhoff BR: **Integrative genomics identifies DSCR1 (RCAN1) as a novel NFAT-dependent mediator of phenotypic modulation in vascular smooth muscle cells.** *Hum Mol Genet* 2010, **19**(3):468-479.
  183. Cano E, Canellada A, Minami T, Iglesias T, Redondo JM: **Depolarization of neural cells induces transcription of the Down syndrome critical region 1 isoform 4 via a calcineurin/nuclear factor of activated T cells-dependent pathway.** *J Biol Chem* 2005, **280**(33):29435-29443.

184. Cho KO, Kim YS, Cho YJ, Kim SY: **Upregulation of DSCR1 (RCAN1 or Adapt78) in the peri-infarct cortex after experimental stroke.** *Exp Neurol* 2008, **212**(1):85-92.
185. Canellada A, Ramirez BG, Minami T, Redondo JM, Cano E: **Calcium/calcineurin signaling in primary cortical astrocyte cultures: Rcan1-4 and cyclooxygenase-2 as NFAT target genes.** *Glia* 2008, **56**(7):709-722.
186. Kyttälä S, Habermann I, Minami T, Ehninger G, Kiani A: **Regulation of Down Syndrome Critical Region 1 expression by Nuclear Factor of Activated T cells in megakaryocytes.** *Br J Haematol* 2009, **144**(3):395-408.
187. Wu H, Kao SC, Barrientos T, Baldwin SH, Olson EN, Crabtree GR, Zhou B, Chang CP: **Down syndrome critical region-1 is a transcriptional target of nuclear factor of activated T cells-c1 within the endocardium during heart development.** *J Biol Chem* 2007, **282**(42):30673-30679.
188. 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.** *Nat Immunol* 2003, **4**(9):874-881.
189. Hooghe B, Hulpiau P, van Roy F, De Bleser P: **ConTra: a promoter alignment analysis tool for identification of transcription factor binding sites across species.** *Nucleic Acids Res* 2008, **36**(Web Server issue):W128-132.
190. Dienz O, Eaton SM, Krahl TJ, Diehl S, Charland C, Dodge J, Swain SL, Budd RC, Haynes L, Rincon M: **Accumulation of NFAT mediates IL-2 expression in memory, but not naive, CD4+ T cells.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007, **104**(17):7175-7180.
191. Nordmann R, Andersen E, Trussardi R, Mazer NA: **Kinetics of interleukin 2 mRNA and protein produced in the human T-cell line Jurkat and effect of cyclosporin A.** *Biochemistry* 1989, **28**(4):1791-1797.
192. Fuleihan R, Ramesh N, Horner A, Ahern D, Belshaw PJ, Alberg DG, Stamenkovic I, Harmon W, Geha RS: **Cyclosporin A inhibits CD40 ligand expression in T lymphocytes.** *J Clin Invest* 1994, **93**(3):1315-1320.
193. Chuvpilo S, Jankevics E, Tyrsin D, Akimzhanov A, Moroz D, Jha MK, Schulze-Luehrmann J, Santner-Nanan B, Feoktistova E, Konig T *et al*: **Autoregulation of NFATc1/A expression facilitates effector T cells to escape from rapid apoptosis.** *Immunity* 2002, **16**(6):881-895.
194. Zhou B, Cron RQ, Wu B, Genin A, Wang Z, Liu S, Robson P, Baldwin HS: **Regulation of the murine Nfatc1 gene by NFATc2.** *J Biol Chem* 2002, **277**(12):10704-10711.
195. Shin SY, Choo SM, Kim D, Baek SJ, Wolkenhauer O, Cho KH: **Switching feedback mechanisms realize the dual role of MCIP in the regulation of calcineurin activity.** *FEBS Lett* 2006, **580**(25):5965-5973.
196. Podtschaske M, Benary U, Zwinger S, Hofer T, Radbruch A, Baumgrass R: **Digital NFATc2 activation per cell transforms graded T cell receptor activation into an all-or-none IL-2 expression.** *PLoS One* 2007, **2**(9):e935.
197. Nagata S: **Fas ligand-induced apoptosis.** *Annu Rev Genet* 1999, **33**:29-55.
198. Green DR, Droin N, Pinkoski M: **Activation-induced cell death in T cells.** *Immunol Rev* 2003, **193**:70-81.
199. Lyons AB: **Divided we stand: tracking cell proliferation with carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester.** *Immunol Cell Biol* 1999, **77**(6):509-515.
200. Sambrook J, Russell DW: **Molecular cloning: a laboratory manual**, 3rd edn. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.
201. Mondragon A, Griffith EC, Sun L, Xiong F, Armstrong C, Liu JO: **Overexpression and purification of human calcineurin alpha from Escherichia coli and assessment of catalytic functions of residues surrounding the binuclear metal center.** *Biochemistry* 1997, **36**(16):4934-4942.



## 8 Publikationsliste

### 8.1 Poster

- 2004 Joint annual meeting of the German and Scandinavian Societies for Immunology, Kiel; Inhibition of calcineurin-NFAT signalling by a pyrazolopyrimidine compound acting additively to Cyclosporin A.
- 2008 12th joint meeting of the Signal Transduction Society (STS), Weimar; RCAN1C is differentially expressed in T helper cell subsets.

### 8.2 Publikationen

- 2007 M. Sieber *et al.* Inhibition of calcineurin-NFAT signaling by the pyrazolopyrimidine compound NCI3. *Eur J Immunol.* 2007 Sep;37(9):2617-26
- 2009 Review M. Sieber und R. Baumgrass Novel inhibitors of the calcineurin/NFATc hub – alternatives to CsA and FK506? *Cell Commun Signal*, 2009 Oct 27;7(1):25

## Danksagung

Allen voran möchte ich Ria Baumgraß danken, daß ich in ihrer Gruppe arbeiten konnte und daß sie mich während meiner Doktorarbeit all die Jahre intensiv unterstützt und angeleitet hat.

Ich danke Burkhard Micheel, Jörg Schenk und Frank Sellrie sowie Edgar Serfling und René Rost für ihre Kooperation und guten Ratschläge.

Mein besonderer Dank gilt Luzie Reiners-Schramm, Joachim Grün, Thoralf Kaiser, Uwe Niessner, Sascha Rutz, Martin Szyska und Frederick F. Heinrich für ihre unschätzbare Hilfe, Geduld und Reagenzien.

Hilmar Frank, Birgit Füßel, Tuula Geske, Heidi Hecker-Kia, Falk Neumann, Heidi Schliemann, Regina Schuck und der Verwaltung des DRFZ danke ich für ihre Unterstützung und das Schaffen einer angenehmen Arbeitsatmosphäre.

Ich bedanke mich bei meinen Lehrern Trix Kopke, Lothar Lehnhard und Dietmar Krautwurst, daß sie mir das molekularbiologische Handwerkzeug mit auf den Weg gaben.

Nicht zuletzt möchte ich all meinen Kollegen, den ehemaligen und aktuellen Mitgliedern der AG Signaltransduktion Uwe Benary, Hanna Bendfeldt, Claudia Brandt, Andreas Czech, Stefan Frischbutter, Anne Gompf, Uschi Gruner, Daniel Hackbusch, Ivan Kel, Sonja Kimmig, Anett Köhler, Stefan Kröger, Melanie Krüger, Solveigh Kru-sekopf, Britta Lamottke, Yü-Hien Lee, Maria Lexberg, Peter Liman, Martin Listek, Marion Mäusemann, Astrid Menning, Karin Müller, Luisa Neubrandt, Sylvia Nie-brügge, Vladimir Pavlovic, Martin Pohland, Miriam Podtschaske, Tobias Scheel, Claudia Schlundt, Michael Schmück, Biljana Smiljanovic, Alexander Stöhr, Katherine Sturm, Alex Trahorsch, Jil Ulrich und Fanny Wegner für die gute Zeit, die Wissenschaft und das Sozialleben. Nicht zu vergessen auch all die Kollegen des DRFZ und MPI, die den Aufenthalt am Institut so lehrreich und fröhlich gemacht haben.

Meinen Freunden gilt meine Dankbarkeit, hier seien Tobias Schwarz, Maik Wienecke, Danilo Mertsch und Christiane Schmidt stellvertretend für alle Rocker genannt.

Vor allem aber danke ich meiner Familie für die Unterstützung, insbesondere meiner Frau Joline.

## **Selbstständigkeitserklärung**

Hiermit versichere ich, daß ich die vorliegende Dissertation selbst verfaßt und keine weiteren als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Diese Arbeit wurde in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Berlin, den 16.02.2010