

INAUGURAL - DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät

der

Ruprecht – Karls – Universität Heidelberg

vorgelegt von

Maren Zappe geb. Hödebeck (Apothekerin)

aus Münster

Tag der mündlichen Prüfung: 25. Mai 2016

Die Rolle des Transkriptionsfaktors NFAT5
bei Bluthochdruck-induzierten
arteriellen Remodellierungsprozessen

Gutachter: Prof. Dr. Markus Hecker
Prof. Dr. Johannes Backs

Für Stefan

I Abkürzungsverzeichnis

5-HTT	5-Hydroxytryptamintransporter
ACE	Angiotensin- <i>Converting</i> -Enzym
ACTBL2	<i>Actin-Beta like Protein 2</i>
AED	Auxilliäre Exportdomäne
ADH	Antidiuretisches Hormon
AS	Aminosäure
AT ₁	Angiotensinrezeptor-1
BGT1	Betain/ γ -Aminobutyrat (GABA)-Transporter
BMPR-2	<i>Bone morphogenetic protein 2</i>
BNP	<i>Brain natriuretic protein</i>
BSA	<i>Bovine serum albumine</i>
cAbl	<i>Abelson murine leukemia viral oncogen homolog 1</i>
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CAS	<i>Crk-associated substrate</i>
CDK-1	<i>Cyclin-dependent kinase-1</i>
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CPT	Carnitin-Palmitoyltransferase
CRBP-1	<i>Cellular retinol binding protein-1</i>
CRM-1	<i>Chromosomal maintenance 1</i>

Cys	Cystein
DAG	Diacylglycerol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOCA	Desoxykortikosteronazetat
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
Elk-1	<i>ETS domain-containing protein Elk-1</i>
ERK	<i>Extracellular-signal regulated kinase</i>
ET	Endothelin
EZM	Extrazellulärmatrix
FAK	<i>Focal adhesion kinase</i>
FLS	Fibroblasten-artige Synoviozyten
GE	Gelelektrophorese
GRB2	<i>Growth factor receptor-bound protein 2</i>
GMZ	glatte Gefäßmuskelzelle(n)
H	Stunde
HEK	<i>Human embryonic kidney</i>
H _f	Herzfrequenz
HIF	<i>Hypoxia-inducible factor</i>
HUASMC	humane umbilikale glatte Gefäßmuskelzellen
HZV	Herzzeitvolumen
I	Stromzeitvolumen
IEP	isoelektrischer Punkt

IGF-1	<i>Insulin-like growth factor-1</i>
IL	Interleukin
IMCD	<i>Inner medullary collecting duct</i>
IP ₃	Inositoltriphosphat
JNK	C-jun N-terminale Kinase
Kg	Kilogramm
K _v	spannungsabhängiger Kaliumkanal
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MCP-1	<i>Monocyte chemotactic protein-1</i>
MDCK	<i>Madin-Darby canine kidney</i>
Min	Minuten
MLCK	Myosin-Leichte-Kette-Kinase
MLCP	Myosin-Leichte-Kette-Phosphatase
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
MMP	Matrix-Metalloprotease
mosm	Milliosmol
mPAP	<i>Mean pulmonary arterial pressure</i>
NES	Nukleäres Exportsignal
NLS	Nukleäres Lokationssignal
NFAT5	<i>Nuclear Factor of Activated T-Cells</i>
NFκB	<i>Nuclear Factor Kappa B</i>
NO	Stickstoffmonoxid

Nup	Nukleoporin
ODA	Octadecansäure
ODN	Oligo-Desoxynukleotide
PAH	Pulmonale arterielle Hypertension
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDE	Phosphodiesterase
PDGF	<i>Platelet-derived growth factor</i>
PGI	Prostazyklin
PLC	Phospholipase C
P_{tm}	transmurale Druckdifferenz
qPCR	quantitative Polymerase-Kettenreaktion
R	Widerstand
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
r_i	Innerer Radius
RHD	Rel-Homologie-Domäne
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RVSP	<i>Right ventricular systolic pressure</i>
S_t	tangentiale Wandspannung
S100A4	<i>S100 calcium binding protein A4</i>
SAC	<i>Stretch-activated channels</i>
Ser	Serin

SGK-1	Serum- und Glukokortikoid-induzierbare Kinase
SHR	<i>Spontaneously hypertensive rats</i>
SM-MHC	<i>Smooth muscle myosin heavy chain</i>
SM22 α	<i>Smooth muscle 22 alpha</i>
SM α A	<i>Smooth muscle alpha actin</i>
SMIT	Inositoltransporter
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
SRF	<i>Serum response factor</i>
SV	Schlagvolumen
TAUT	Taurintransporter
TGF- β	<i>Transforming growth factor beta 1</i>
TLR	<i>Toll-like-Rezeptor</i>
Thr	Threonin
TNC	Tenascin C
TNF α	Tumornekrosefaktor alpha
TonEBP	<i>Tonicity-element binding protein</i>
TRPC	<i>Transient receptor potential channel</i>
Tyr	Tyrosin
TPR	totaler peripherer Widerstand
VCAM1	<i>Vascular cell adhesion molecule 1</i>

II Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung.....	1
2	Summary.....	3
3	Einleitung.....	5
3.1	Das Blutgefäßsystem	5
3.1.1	Aufbau von Arterien	5
3.1.2	Funktion von Arterien.....	6
3.1.3	Regulation des arteriellen Blutdrucks	8
3.1.4	Kontraktion von glatten Muskelzellen	10
3.2	Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems	11
3.2.1	Arterieller Bluthochdruck	11
3.2.2	Pulmonaler arterieller Bluthochdruck.....	13
3.2.3	Therapie des Bluthochdrucks	14
3.2.4	Phänotypänderung der Gefäßmuskelzellen	17
3.3	Der Transkriptionsfaktor NFAT5.....	21
3.3.1	Die NFAT-Familie	21
3.3.2	Mechanismen zur Regulation der Aktivität von NFAT5	24
3.3.3	Regulation von NFAT5 in glatten Gefäßmuskelzellen	26
3.4	Zielsetzung der vorliegenden Arbeit	27
4	Material	29
4.1	Geräte und Materialien	29
4.2	Verbrauchsmaterialien	30
4.3	Medien, Lösungen und Reagenzien für die Zellkultur.....	30
4.4	Stimulatoren und Inhibitoren.....	31
4.5	Reagenzien für den siRNA-basierten Gen-Knockdown	31
4.6	Reagenzien und Kits für molekularbiologische und biochemische Analysen	32
4.7	Kits für Klonierungsarbeiten.....	32

4.8	Puffer, Lösungen und Chemikalien	32
4.9	Primersequenzen	38
4.10	Plasmide	39
4.11	Kompetente Bakterien	40
4.12	Antikörper und Farbstoffe	40
4.12.1	Primärantikörper	40
4.12.2	Sekundärantikörper	41
4.12.3	Farbstoffe und Fluorophor-konjugierte Substanzen	41
4.13	Geräte, Lösungen und Materialien für operative Eingriffe	42
4.14	Präparationsbesteck	42
5	Methoden	43
5.1	Zellkultur	43
5.1.1	Isolation von glatten Gefäßmuskelzellen aus der Nabelschnur	43
5.1.2	Kultivierung und Passagieren von glatten Gefäßmuskelzellen in der Zellkultur ...	43
5.1.3	Überexpression von NFAT5-Plasmiden	44
5.1.4	Si-RNA vermittelte Inhibition von NFAT5- und κ -Aktin-Transkription	45
5.1.5	Biomechanische Dehnung	45
5.1.6	Live-Cell-Imaging	46
5.2	Protein-biochemische Analysen	46
5.2.1	Proteinisolation	46
5.2.2	Isolation von nukleären und zytosolischen Proteinen	46
5.2.3	Bradford-Proteinmessung	47
5.2.4	Gelelektrophoretische Proteinauftrennung (SDS-PAGE)	47
5.2.5	Nass-Blot-Verfahren	47
5.2.6	2D-Gelelektrophorese	48
5.2.7	Chromatin-Immunopräzipitation (CHIP)	50
5.2.8	Click-Reaktion	51
5.3	Molekularbiologische Methoden	52

5.3.1	Isolation von mRNA	52
5.3.2	cDNA-Synthese	52
5.3.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	53
5.3.4	Genotypisierung der SMC-NFAT5 ^{fl/fl} -Mäuse	55
5.3.5	Transformation von Plasmiden	57
5.3.6	Überexpression von Plasmiden	57
5.3.7	Endotoxin-freie Aufarbeitung von Bakterienkulturen.....	58
5.3.8	Mutation von spezifischen Sequenzen der Plasmide	58
5.4	Bioinformatische Analysen	59
5.4.1	In silico-Promoteranalyse	59
5.5	Immunfluoreszenz-basierte Analysen	59
5.5.1	Fixierung von murinem Gewebe	59
5.5.2	Einbettung	60
5.5.3	Anfertigung von Gewebeschnitten.....	60
5.5.4	Immunfluoreszenzfärbung	60
5.5.5	NFAT5-Immunhistochemie.....	61
5.5.6	Immunzytofluoreszenz	61
5.5.7	Automatisierte Immunfluoreszenzaufnahmen (TissueGnostic).....	62
5.6	In vivo-Tiermodelle.....	62
5.6.1	Nutzung von induzierbaren SMC-NFAT5 ^{-/-} -Mäusen	62
5.6.2	DOCA-Salz-Hypertonie-Modell	63
5.6.3	Implantation von Telemetrie-Sonden	64
5.6.4	Hypoxie-induzierter Bluthochdruck	65
5.6.5	Ex vivo-Perfusionsmessung	67
5.7	Statistik	67
6	Ergebnisse.....	68
6.1	Untersuchung der Regulation der NFAT5-Expression und Lokalisation in gedehnten glatten Gefäßmuskelzellen.....	68

6.1.1	Analyse der Proteinexpression und der Kerntranslokation von NFAT5 bei biomechanischer Belastung.....	68
6.1.2	Untersuchung der mRNA-Neusynthese von NFAT5 in dehnungsstimulierten glatten Gefäßmuskelzellen	69
6.1.3	Analyse des Einflusses der proteasomalen Aktivität auf die Proteinexpression und nukleäre Translokation von NFAT5.....	70
6.2	Untersuchung der NFAT5-abhängigen Genexpression.....	71
6.2.1	<i>Untersuchung der Beeinflussung der Tenascin C-Expression durch NFAT5 bei biomechanischer Dehnung.....</i>	71
6.2.2	Quantifizierung der dehnungsinduzierten Proteinexpression von κ -Aktin.....	72
6.2.3	Analyse der dehnungsinduzierten κ -Aktin-Expression in Abhängigkeit von NFAT5	73
6.2.4	Untersuchung der Migration von κ -Aktin-defizienten glatten Gefäßmuskelzellen	74
6.3	Untersuchung der Expression und Funktion von NFAT5-Isoformen in biomechanisch stimulierten Gefäßmuskelzellen	75
6.3.1	Regulation der NFAT5-Spleiß-Varianten bei biomechanischer Belastung.....	76
6.3.2	Analyse der Kerntranslokation der NFAT5-Isoformen in HUASMCs nach biomechanischer Dehnung	76
6.4	Analyse des Einflusses von posttranslationalen Modifikationen auf die dehnungsinduzierte Kerntranslokation von NFAT5.....	77
6.4.1	Identifikation der isoelektrischen Punkte von nukleärem und zytosolischem NFAT5 in gedehnten glatten Gefäßmuskelzellen.....	78
6.4.2	Untersuchung der Bedeutung der Phosphorylierung von NFAT5 an Serin-1197 für die dehnungsinduzierte Kerntranslokation	78
6.4.3	Analyse des Einflusses der Aminosäure Tyrosin-143 auf die dehnungsinduzierte Translokation von NFAT5	81
6.4.4	Bedeutung der Kinase c-Abl für die Kerntranslokation von NFAT5	82
6.4.5	Untersuchung der dehnungsinduzierten Kerntranslokation von NFAT5 in glatten Gefäßmuskelzellen nach Behandlung mit dem Multikinase-Inhibitor Dasatinib ..	82

6.4.6	Bedeutung der Palmitoylierung für die Kerntranslokation von NFAT5-Isoform C bei Dehnung	84
6.4.7	Nachweis von palmitoyliertem NFAT5 in nukleären und zytosolischen Lysaten ...	84
6.4.8	Bedeutung der Aminosäure Cystein-81 für die dehnungsvermittelte Kerntranslokation der NFAT5-Isoform C	85
6.4.9	Untersuchung des Einflusses der Carnitin-Palmitoyltransferase-Familie 1 (CPT1) auf die dehnungsinduzierte Kerntranslokation von NFAT5	86
6.5	Untersuchung zur Entwicklung von pulmonaler Hypertonie in NFAT5 ^{-/-} -Mäusen.....	87
6.5.1	Darstellung der Proteinexpression von NFAT5 in Pulmonalarterien von SMC-NFAT5 ^{fl/fl} - und SMC-NFAT5 ^{-/-} -Mäusen mit pulmonaler Hypertonie	87
6.5.2	Bestimmung des Fulton-Indexes als Maß für die Entwicklung einer Rechtsherzhypertrophie.....	88
6.5.3	Untersuchung des Einflusses von NFAT5 auf die Zunahme der arteriellen Wanddicke im PAH-Modell	89
6.5.4	Expressionsanalyse von κ -Aktin in den Pulmonalarterien NFAT5-defizienter Mäuse im PAH-Modell.....	90
6.5.5	Untersuchung der Tenascin C-Akkumulation in den Lungen der SMC-NFAT5 ^{fl/fl} - bzw. SMC-NFAT5 ^{-/-} -Mäuse.....	91
6.5.6	Analyse des Einflusses von Hypoxie auf die NFAT5-mRNA-Expression und die Kerntranslokation von NFAT5.....	92
6.6	Analyse einer experimentell induzierten arteriellen Hypertonie in SMC-NFAT5 ^{-/-} -Mäusen.....	93
6.6.1	Analyse des Einflusses von NFAT5 auf den systolischen und diastolischen Blutdruckanstieg im DOCA-Salz-Hypertonie-Modell	93
6.6.2	Bestimmung der Bluthochdruck-induzierten Proliferation von glatten Gefäßmuskelzellen der Femoralarterie im DOCA/Salz-Hypertonie -Modell.....	94
7	Diskussion.....	96
7.1	Regulation der Aktivität von NFAT5 in glatten Gefäßmuskelzellen nach biomechanischer Belastung	96
7.1.1	Regulation der Aktivität von NFAT5 durch Expression, Synthese bzw. Abbau	96

7.1.2	Regulation der Aktivität von NFAT5 durch Lokalisation	98
7.1.3	Regulation der Aktivität von NFAT5 durch Proteinmodifikation	100
7.2	Funtionelle Bedeutung der transkriptionellen Ziele von NFAT5 in glatten Gefäßmuskelzellen.....	104
7.3	Funktion von NFAT5 im Rahmen von vaskulären Remodellierungsprozessen.....	107
8	Limitation der Arbeit.....	112
9	Ausblick	114
10	Literaturverzeichnis	116
11	Publikationsliste	131
12	Danksagung.....	132

1 Zusammenfassung

Bluthochdruck gilt als Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen wie Schlaganfall oder Herzinfarkt. Der erhöhte transmurale Druck, der auf die arteriellen Gefäße wirkt, resultiert nach dem Gesetz von Laplace in einer erhöhten tangentialen Wandspannung und führt zu pathologischen Veränderungen in der arteriellen Gefäßwand. Infolgedessen erhöht sich die Gefäßsteifigkeit, die - über einen Anstieg des peripheren Widerstands und somit einer Nachlasterhöhung für das Herz - die Progression der Hypertonie weiter fördert. Durch einen Anstieg der Wandspannung verlieren glatte Gefäßmuskelzellen ihren kontraktiven, ruhenden Phänotyp, der durch die Expression von Genprodukten des kontraktiven Apparates (z.B. SM-MHC, SM α A) gekennzeichnet ist. Gleichzeitig erhöht sich die Proliferation und Migrationsaktivität der glatten Gefäßmuskelzellen einhergehend mit einer gesteigerten Synthese von Matrixmolekülen (z.B. Kollagen I) und Matrixmetalloproteinasen wie MMP-2, was sich auf die Architektur und Komposition der Extrazellulärmatrix auswirkt.

In diesem Zusammenhang wurde beschrieben, dass der Transkriptionsfaktor NFAT5 (*nuclear factor of activated T-cells 5*) diesen aktivierten, synthetischen glattmuskulären Phänotyp fördert, indem er beispielsweise eine verstärkte Genexpression des Matrixmoleküls Tenascin C (TNC) stimuliert, welches die Proliferation der Zellen fördert. Basierend auf diesen Beobachtungen diente diese Arbeit der Aufklärung von biomechanisch induzierten Mechanismen, die zur Aktivierung von NFAT5 führen. Darüber hinaus sollte die funktionelle Rolle von NFAT5 während Bluthochdruck-induzierter Remodellierungsprozesse *in vitro* und *in vivo* untersucht werden.

Die biomechanische Dehnung glatter Gefäßmuskelzellen aus Arterien *in vitro* resultierte sowohl in einer erhöhten Proteinsynthese als auch in einem verstärkten Kernimport von NFAT5, das nach Bindung an die DNA die Genexpression von *Actin-beta-like-protein 2* (*ACTBL2*) induzierte. *ACTBL2* kodiert dabei für die Aktin-Isoform κ -Aktin, die funktionell einen kritischen Beitrag zur gerichteten glattmuskulären Migration lieferte.

Ferner konnte erstmalig gezeigt werden, dass eine divergente Regulation der NFAT5-Isoformen A und C nach Dehnung auftritt. Die Überexpression der entsprechenden

Kapitel 1

Isoformen führte dazu, dass die nukleäre Akkumulation von NFAT5c, das in ruhenden Zellen sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern vorliegt, durch biomechanische Dehnung verstärkt wird. Im Gegensatz dazu war NFAT5a sowohl in ruhenden als auch in gedehnten Zellen ausschließlich im Zytoplasma lokalisiert.

Der Einfluss von posttranslationalen Proteinmodifikationen auf die Kerntranslokation von NFAT5 wurde mithilfe der zielgerichteten Mutation von spezifischen Aminosäuren im NFAT5c-Protein bzw. durch die Inhibition bestimmter Signalwege untersucht. So war eine u.a. durch die Kinase c-Abl vermittelte Phosphorylierung von Tyrosin-143 ebenso wie eine Palmitoylierung durch Palmitoyltransferasen der CPT1-Familie (Carnitin-Palmitoyltransferasen) essentiell für den dehnungsinduzierten Kernimport von NFAT5. Im Gegensatz dazu schien die Kerntranslokation durch eine Phosphorylierung an Serin-1197 inhibiert und somit kontrolliert zu werden.

Durch die Verwendung von induzierbaren, glattmuskulär NFAT5-defizienten Mäusen war es möglich, die funktionelle Rolle von NFAT5 *in vivo* zu untersuchen. Bei der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie resultierte ein Verlust von glattmuskulärem NFAT5 in einer verminderten Rechtsherzhypertrophie, einer geringeren medialen Verdickung der kleinen peripheren Lungenarterien sowie einer verminderten Expression der NFAT5-abhängigen Zielgene TNC und κ -Aktin. Außerdem führte der Verlust von glattmuskulärem NFAT5 im Rahmen einer experimentell induzierten arteriellen Hypertonie (DOCA/Salz-Modell) zu einer verminderten Proliferation der glatten Gefäßmuskelzellen in den Femoralarterien.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte somit gezeigt werden, dass der Transkriptionsfaktor NFAT5 – möglicherweise durch die Regulation der Genexpression von κ -Aktin und TNC – eine bisher unbekannte, wichtige Rolle in der Pathogenese von Bluthochdruck-induzierten Gefäßumbauprozessen spielt. Die der dehnungsinduzierten Translokation von NFAT5 in den Zellkern zugrunde liegenden Mechanismen könnten zukünftig als Angriffspunkt zur Entwicklung einer neuartigen Therapie Hypertonie-induzierter arterieller Umbauprozesse genutzt werden.

2 Summary

Hypertension is a known risk factor for cardiovascular diseases such as stroke or cardiac infarction. According to the law of Laplace, a rise in transmural pressure acting on the arterial vessel wall causes an increase in wall tension or stress, which may lead to maladaptive remodelling processes in the arterial vessel wall. Consequently, arterial stiffness rises followed by an increase in peripheral resistance and afterload for the heart, hence promoting a further rise in blood pressure. Due to the increase in wall stress, the vascular smooth muscle cells (SMC) lose their so-called contractile resting phenotype, which is characterized by the expression of gene products such as smooth muscle myosin heavy chain (SM-MHC) or smooth muscle α actin (SM α A). This phenotypic shift enhances the cells' migratory and proliferative properties accompanied by an increased expression of matrix molecules (e.g. collagen I) and metalloproteinases (MMPs) such as MMP-2, which affect the architecture and composition of the extracellular matrix. In this regard, it has been reported that the transcription factor NFAT5 (nuclear factor of activated T-cells 5) may promote this transition into an active, synthetic SMC phenotype by enhanced transcription of downstream effector gene products such as that of the matrix molecule tenascin C (TNC), leading to increased SMC migration and mitogenesis.

Based on these findings, this work serves to clarify the mechanism(s) underlying biomechanical stretch-induced activation of NFAT5. Additionally, the functional role of NFAT5 during hypertension-induced remodelling processes *in vitro* and *in vivo* was investigated in greater detail.

Biomechanical stretch of arterial SMCs *in vitro* led to an increase in protein synthesis as well as to an enhanced nuclear import of NFAT5, which after binding to the DNA further promoted expression of actin-beta-like-protein 2 gene (*ACTBL2*). *ACTBL2* encodes the actin isoform κ -actin that functionally contributed towards SMC migration.

Here, we show for the first time that NFAT5 isoforms A and C are differentially regulated in stretch-stimulated SMCs. Overexpression of the corresponding isoform in vascular SMCs revealed that NFAT5c, which was primarily located in the cytosol and partially in the nucleus of resting cells, increasingly accumulated in the nucleus upon exposure of

Kapitel 2

the cultured SMCs to (cyclic) stretch. In contrast, NFAT5a was detected exclusively in the cytosolic fraction in resting as well as in stretch-stimulated SMCs.

The impact of posttranslational protein modification on NFAT5 translocation was studied by site-directed mutagenesis of specific amino acids of the NFAT5c protein or by inhibition of definite signalling molecules. Thus, phosphorylation of tyrosine-143 mediated by kinase c-Abl amongst others as well as palmitoylation through (a) member(s) of the CPT1 (carnithine palmitoyltransferase 1) family was essential for the stretch-induced nuclear import of NFAT5. In contrast, nuclear translocation appeared to be inhibited and thus controlled by phosphorylation of NFAT5c at serine-1197.

The use of inducible, SMC-specific NFAT5-deficient mice enabled further investigation into the functional role of NFAT5 *in vivo*. In hypoxia-induced pulmonary hypertension, the SMC-specific loss of NFAT5 led to reduced right heart hypertrophy, reduced medial thickening of peripheral small lung arteries as well as reduced expression of the NFAT5-dependent genes tenascin C and κ -actin. In addition, knockdown of smooth muscle NFAT5 attenuated SMC proliferation in the femoral arteries in experimentally induced arterial hypertension (DOCA/salt model).

In a nutshell, this work reveals that NFAT5 – potentially through controlling κ -actin and TNC expression – plays a hitherto unrecognized important role during hypertension-induced remodelling processes in arteries and possibly arterioles. The underlying mechanism(s) that enable(s) NFAT5 translocation to the nucleus upon stretch may thus serve as (a) potential target(s) for the development of novel treatment options for (cardio)vascular diseases associated with a prolonged rise in arterial blood pressure.

3 Einleitung

3.1 Das Blutgefäßsystem

Die Hauptaufgabe des Herz-Kreislaufsystems ist die Versorgung der Körperzellen mit Sauerstoff und Nährstoffen sowie dem gleichzeitigen Abtransport von CO₂ und Stoffwechselprodukten. Der Transport von Hormonen dient zudem der organübergreifenden zellulären Kommunikation. Außerdem ist das Kreislaufsystem entscheidend an der Thermoregulation des Körpers beteiligt.

Man unterteilt den Körperkreislauf in einen großen und kleinen Kreislauf. Im großen Körperkreislauf wird das mit Sauerstoff angereicherte Blut zunächst aus dem linken Ventrikel über die Aorta ausgeworfen und gelangt über die großen Leitungsarterien, kleinen Arterien und Arteriolen sowie Kapillaren in Gewebe und Organe. Über das Kapillarsystem wird das sauerstoffarme Blut über die Venen wieder zurück zum Herzen geführt. Über die Vena cava gelangt das Blut in den rechten Vorhof. Im kleinen Kreislauf wird das Blut vom rechten Ventrikel über die Lungenarterien und Venen über den linken Vorhof wieder zurück zum Herzen befördert¹.

3.1.1 Aufbau von Arterien

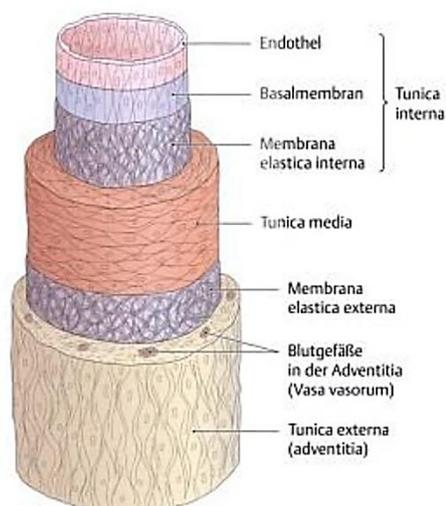


Abb. 1: **Aufbau einer Arterie.** Übernommen aus „Prometheus - Lernatlas der Anatomie: Innere Organe“, M.Schünke, 2009

Die Gefäßwand der Arterien besteht aus drei Schichten. Die innere Schicht (*Tunica intima*) wird aus einer einschichtigen Endothelzellschicht gebildet, die die innere Oberfläche der Arterien auskleidet. Es folgt eine Basalmembran, die aus Kollagen und Laminin aufgebaut ist sowie die aus Kollagen und Elastin gebildete *Elastica interna*. Die sich anschließende mittlere Schicht (*Tunica media*) wird von glatten Muskelzellen, die ringförmig angeordnet sind, und der

Extrazellulärmatrix (EZM), die sich hauptsächlich aus Kollagen (Typ I und III), Fibronectin, Elastin und Proteoglykanen zusammensetzt, gebildet. Die äußere Schicht (*Tunica*

Kapitel 3

adventitia) wird von der *Tunica media* durch die *Elastica externa* getrennt und besteht aus Fibroblasten, Kollagen sowie longitudinal angeordneten glatten Muskelzellen. Sie dient der Verankerung der Gefäße im umliegenden Gewebe. Die größeren Arterien verfügen zudem über ein eigenes Gefäßsystem (*Vasa vasorum*) und sind innerviert^{1,2}.

3.1.2 Funktion von Arterien

Funktionell unterscheiden sich die drei Schichten, aus denen Arterien aufgebaut sind, voneinander. Die *Tunica interna* trennt das Gefäß vom zirkulierenden Blut und kontrolliert den Gas-, Flüssigkeits- und Stoffaustausch zwischen Blut und umliegendem Gewebe. Das Endothel ist an vielen physiologischen Reaktionen im Kreislaufsystem aktiv beteiligt. Die Bildung und Freisetzung von endothelialen, vasoaktiven Substanzen wie Stickstoffmonoxid (NO), Prostacyclin (PGI₂) oder Endothelin (ET) resultiert in einer parakrinen Stimulation glattmuskulärer Zellen der *Tunica media* und beeinflusst so den Tonus der Gefäße. Zusätzlich wird die Interaktion der Endothelzellen mit Immunzellen durch Adhäsionsmoleküle wie Selektine oder Integrine ermöglicht^{1,3}.

Die glatten Muskelzellen in der *Tunica media* erzeugen den myogenen Basaltonus und regulieren durch Kontraktion bzw. Relaxation die Gefäßweite. Dies geschieht in Abhängigkeit des Blutdrucks sowie neurohumoraler Faktoren, die mit dem Blut zirkulieren, aus sympathischen Nervenendigungen (Varikositäten) freigesetzt oder von den Endothelzellen metabolisiert bzw. synthetisiert werden. Außerdem produzieren die glatten Muskelzellen die EZM, in die sie eingebettet sind, und die - abhängig von ihrer Zusammensetzung - die Eigenschaften der glatten Gefäßmuskelzellen (GMZ) beeinflusst. Die *Tunica adventitia* dagegen ist innerviert und versorgt mithilfe der *Vasa vasorum* die Wand der großen Leitungsgefäße mit Nährstoffen^{1,2,4}.

Man unterscheidet zwischen Arterien vom elastischen und muskulösen Typ. Diese differieren hinsichtlich des Verhältnisses von glatten Muskelzellen und elastischen Fasern in der *Tunica media*. Die großen Arterien vom elastischen Typ (Aorta, Arteria pulmonalis) entspringen den Ventrikeln des Herzens und weisen durch den hohen Anteil an elastischen Fasern eine hohe Dehnbarkeit auf. Sie gewährleisten ein weitgehend kontinuierliches Fließen des Blutes, indem sie einen Teil der bei der Systole (Auswurf des Schlagvolumens aus den Ventrikeln) auftretenden Energie in Form einer passiven

Dehnung der Gefäßwand kurzfristig speichern, in der Diastole wieder freisetzen (Windkesselfunktion) und so die auftretenden Druckschwankungen zwischen Systole und Diastole verkleinern^{2,4}. Die Arterien vom muskulösen Typ hingegen weisen einen höheren Anteil an GMZ auf; je weiter die Arterien dabei vom Herzen entfernt sind, desto größer ist die Masse der GMZ in der Media und je geringer der Anteil an elastischen Fasern.

Durch das Hagen-Poiseuille-Gesetz ($I = \frac{\pi r^4 \Delta P}{8 \eta l}$) kann unter Zuhilfenahme des Ohm'schen Gesetzes ($I = \frac{\Delta P}{R}$) verdeutlicht werden, dass der Widerstand (R) eines Gefäßes invers proportional zur 4. Potenz des Innenradius ist ($R = \frac{8 \eta l}{\pi r^4}$). Verkleinert sich der Gefäßradius durch Kontraktion, so steigt der Widerstand an. Dabei nimmt der hydrostatische Druck in Strömungsrichtung vor der Verengung zu und fällt dahinter ab. Auch die Strömung des Blutes durch das Gefäßsystem folgt generell den allgemeinen Strömungsgesetzen der Physik. Das Blut, das vom linken Ventrikel ausgeworfen wird, fließt infolge der arteriovenösen Druckdifferenz (hydrodynamischer minus hydrostatischer Druck, longitudinaler Druckgradient) und wird entsprechend des regionalen Strömungswiderstands auf die Organe verteilt¹. Dabei gilt das Gesetz nach Ohm, wobei das Stromzeitvolumen (I oder dV/dt), das auch als Herzzeitvolumen (HZV) definiert werden kann, dem Quotienten aus longitudinalem Druckgradient (ΔP , sozusagen der treibenden Druckdifferenz bzw. Kraft) und dem zu überwindenden Widerstand (R) entspricht. Letzterer entspricht dem vorgenannten totalen peripheren Widerstand (TPR). Es gilt somit die folgende Formel: $HZV = \frac{\Delta P}{TPR}$ ^{1,5}.

Im arteriellen Gefäßsystem differieren die Widerstände der einzelnen Gefäße. So weisen Arterien vom elastischen und muskulösen Typ, je nach Ruhetonus und Entfernung zum Herzen, unterschiedliche Strömungswiderstände auf. Präkapilläre Arteriolen und kleine (End)Arterien besitzen aufgrund des vergleichsweise geringen Querschnitts wesentlich höhere Einzelwiderstände als die Aorta. Nach der 1. Kirchhoff'schen Regel addieren sich die Einzelwiderstände der in Serie, also hintereinander geschalteten Gefäßabschnitte zum Gesamtwiderstand. Sind die Gefäße dagegen parallel, also nebeneinander geschaltet, so addieren sich gemäß der 2. Kirchhoff'sche Regel die Kehrwerte der

Kapitel 3

Einzelwiderstände zum Gesamtwiderstand¹. Nur so ist überhaupt zu gewährleisten, dass der durch den rhythmischen Auswurf des Blutes aus dem linken Ventrikel erzeugte, hydrodynamische Druck ausreicht, um sämtliche Organe und Gewebe im Körperkreislauf ausreichend mit Blut zu versorgen. Unabhängig vom Gesamtquerschnitt eines Gefäßabschnitts wird jedoch das Herzzeitvolumen konstant gehalten (Kontinuitätsprinzip), sodass in Gefäßen mit kleiner werdendem Querschnitt, also zur Peripherie hin, die mittlere Strömungsgeschwindigkeit kontinuierlich abnimmt; am langsamsten strömt es demzufolge in den postkapillären Venolen^{1,5}.

3.1.3 *Regulation des arteriellen Blutdrucks*

Grundsätzlich unterscheidet man zwischen der systemischen Kreislaufregulation und der lokalen Regulation der Organdurchblutung. Die systemische Blutdruckregulation dient der Aufrechterhaltung des arteriellen Blutdrucks, wobei ein mittlerer arterieller Druck von 100 mmHg angestrebt wird. Man unterscheidet zwischen einer kurz-, mittel- und langfristigen Regulation, die im nachfolgenden Abschnitt dargestellt wird.

Die sinoaortalen Pressorezeptoren, die als freie Nervenendigungen in der Media und Adventitia des Karotissinus und im Aortenbogen liegen, werden durch die Dehnung des Gefäßes stimuliert und hemmen bei einem kurzfristigen Blutdruckanstieg die efferente Sympathikusaktivität, was in einer Senkung der Herzfrequenz und einem geringeren peripheren Widerstand resultiert. Bei einem Blutdruckabfall wird nach dem Prinzip der negativen Rückkopplung der zuvor beschriebene, hemmende Einfluss gemindert und die Sympathikusaktivität erhöht¹. Des Weiteren kann der arterielle Blutdruck kurzfristig auch z.B. über die Aktivität von peripheren Chemorezeptoren, die ebenfalls im Aortenbogen und Karotissinus lokalisiert sind, beeinflusst werden. Eine Aktivierung der Chemorezeptoren, z.B. durch einen Abfall des arteriellen Sauerstoffpartialdrucks, führt nachfolgend zu einer erhöhten Sympathikusaktivität und erhöht so Herzfrequenz und den totalen peripheren Widerstand^{1,3,4}. Aber auch die in den Vorhöfen vorkommenden Dehnungsrezeptoren tragen zu der kurzfristigen Blutdruckregulation durch Beeinflussung der Sympathikusaktivität bei. Durch Stimulation der Rezeptoren wird die Sympathikusaktivität entweder erhöht (Rezeptor Typ A, welcher während der Kontraktion des Vorhofmyokards aktiviert wird) oder gehemmt (Typ B, welcher infolge der passiven Dehnung der Vorhöfe während der späten Ventrikelsystole aktiviert wird)¹.

Mittel- bzw. langfristig kann eine Anpassung des Blutdrucks auch über die Aktivierung des RAAS (Renin-Angiotensin-Aldosteron-System) bewirkt werden¹. So führt eine erhöhte Sympathikusaktivität über die Freisetzung von Adrenalin u.a. β_1 -Rezeptor-vermittelt zu einer verstärkten Freisetzung des Enzyms Renin aus den Reninspeichernden Granulazellen der präglomerulären Nierenarteriolen (*Vasa afferentia*), welches Angiotensin I aus dem Pro-Hormon Angiotensinogen (aus der Leber) abspaltet. Das auf den Endothelzellen der Lunge vorhandene Angiotensin-*Converting*-Enzym (ACE) setzt Angiotensin I zu Angiotensin II um. Angiotensin II wirkt AT_1 -Rezeptor-vermittelt vasokonstriktorisch und fördert die Freisetzung des Mineralkortikoids Aldosteron aus der Nebennierenrinde. Dies resultiert in einer verstärkten Aldosteron-vermittelten Retention von Natriumionen und Wasser im distalen Konvolut bzw. Sammelrohr der Nierentubuli und führt somit zu einer Erhöhung des zirkulierenden Blutvolumens^{1,3}.

Die Durchblutung der Organe wird vor allem durch den Gefäßdurchmesser der Widerstandsgefäße beeinflusst. So erfolgt eine Anpassung des Gefäßdurchmessers an den jeweiligen akuten Bedarf des Organs. Beispielsweise bedingt ein erhöhter Sauerstoffbedarf bei körperlicher Arbeit eine erhöhte Durchblutung der Skelettmuskulatur bei gleichzeitig verminderter Durchblutung z.B. der Nieren. Bei unter Ruhebedingung stark durchbluteten Organen wie Lunge, Herz oder Gehirn dagegen wird die Organdurchblutung auch bei Veränderungen des Blutdrucks zumindest relativ konstant gehalten.

So führt die Freisetzung von Noradrenalin aus terminalen sympathisch-adrenergen Varikositäten und dessen Bindung an glattmuskuläre α_1 -Rezeptoren zu einer Konstriktion von Widerstandsgefäßen, die eine hohe sympathische Gefäßinnervation aufweisen (neurogene Regulation). Dadurch kommt es in der Gesamtheit insbesondere zur Erhöhung des totalen peripheren Widerstands und damit des diastolischen Blutdruckwertes. Endotheliale Mediatoren können sowohl eine vasodilatierende Wirkung (z.B. durch Stickstoffmonoxid) als auch durch Endothelin-1 eine vasokonstriktorische Wirkung auslösen. Zu den gefäßaktiven Hormonen, welches sympathisch vermittelt aus dem Nebennierenmark freigesetzt wird, zählt Adrenalin (neurohumorale Regulation). Adrenalin wirkt zum einen β_2 -Rezeptor-vermittelt vasodilatierend. Dies ist besonders wichtig für die Durchblutung der Koronargefäße,

Kapitel 3

welche eine hohe Dichte an β_2 -Rezeptoren aufweisen, oder den Blutgefäßen der arbeitenden Skelettmuskulatur. Über die α_1 -Rezeptoren wirkt Adrenalin dagegen vasokonstriktorisch. Die Wirkung von Adrenalin ist dabei konzentrationsabhängig (Adrenalin besitzt eine höhere Affinität zu β_2 -Rezeptoren als zu α_1 -Rezeptoren) sowie abhängig von der Verteilung der β_2 - bzw. α_1 -Rezeptoren in den jeweiligen Gefäßen. Die Gefäße in der Haut weisen beispielsweise eine hohe Dichte an α_1 -Rezeptoren auf¹. Es ist jedoch zu beachten, dass Adrenalin zudem β_1 -Rezeptor-vermittelt die Herzfrequenz (positiv chronotrop) und die Kontraktionskraft (positiv inotrop) steigert. Infolgedessen wird das Schlagvolumen und somit das Herzzeitvolumen erhöht. Durch das erhöhte Schlagvolumen werden so insbesondere das zirkulierende Blutvolumen und damit der systolische Blutdruckwert erhöht.

3.1.4 Kontraktion von glatten Muskelzellen

Die Kontraktion von glatten Muskelzellen erfolgt ähnlich wie bei der Skelettmuskulatur durch den Gleitfilamentmechanismus, wodurch Aktinfilamente an den Myosinfilamenten vorbeigleiten und über den Querbrückenzyklus zu einer Verkürzung der glattmuskulären Zellen in Längsrichtung führen. Auslöser des Kontraktionsmechanismus ist ein Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration (über ca. 10^{-7} mol/l), der nach Bindung von Agonisten an Membranrezeptoren der glatten Muskelzellen und Initiierung nachfolgender Signalwege stimuliert werden. So bindet z.B. der Neurotransmitter Noradrenalin an den α_1 -Rezeptor, der in der Zellmembran der glatten Muskelzellen lokalisiert ist und führt Gq-Protein-vermittelt zu einer Aktivierung der Phospholipase C β . Dies resultiert in einer Spaltung von Phosphatidylinositolbisphosphat in die Signalmoleküle Inositoltrisphosphat (IP₃) und Diacylglycerol (DAG). Die Bindung von IP₃ an den IP₃-Rezeptor (ligandengesteuerter Calciumkanal) in der Membran des ER bewirkt die Freisetzung von Calcium in das Cytoplasma¹.

Der Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration führt zu einer Komplexbindung von jeweils 4 Calciumionen durch den Calciumsensor Calmodulin ((Ca²⁺)₄-Calmodulinkomplex). Dies resultiert in einer Aktivierung der MLCK (Myosin-leichte-Ketten-Kinase), welche die regulatorischen leichten Myosinketten phosphoryliert. Der

Querbrückenzyklus zwischen Aktinfilament und Myosinkopf wird initiiert. Durch eine Dephosphorylierung der regulatorischen leichten Myosinkette durch die MLCP (Myosin-leichte-Ketten-Phosphatase) kann der Querbrückenzyklus dagegen wieder unterbrochen werden¹.

Die Senkung der intrazellulären Calciumkonzentration wird dagegen über eine Calciumpumpe am ER bewerkstelligt, die unter Verbrauch von ATP das Calcium zurück in das ER pumpt. Funktionell ist diese Pumpe sehr ähnlich der sarkoplasmatischen Retikulum-Ca²⁺-ATPase quergestreifter Muskelzellen, kurz SERCA genannt¹.

3.2 Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems

3.2.1 Arterieller Bluthochdruck

Eine chronische Steigerung des arteriellen Blutdrucks auf Werte über 140 mmHg systolisch bzw. 90 mmHg diastolisch wird nach Klassifizierung der deutschen Hochdruckliga als Bluthochdruck oder Hypertonie Grad I bezeichnet. Bluthochdruck gilt als bedeutender Risikofaktor für kardiovaskuläre Folgeerkrankungen wie Arteriosklerose, Herzinfarkt oder Herzinsuffizienz, v. a. aber den Schlaganfall⁶, bei dem ca. 90% der Patienten eine Vorgeschichte mit Bluthochdruck aufweisen. Man unterscheidet zwischen primärer (essentieller) und sekundärer Hypertonie. Während die sekundäre Hypertonie als Folge pathologischer Organveränderungen wie z.B. einer Nierenarterienstenose angesehen wird, geht man bei der primären Hypertonie von einer genetischen Prädisposition als Ursache aus. Um welche genetischen Defekte, in der Regel Einzelbasenaustausche, es sich hierbei konkret handelt, ist aber nach wie vor unklar. Da der Blutdruck – wie bereits beschrieben - das Produkt aus Herzzeitvolumen und totalem peripheren Widerstand ist, kann die Hypertonie sowohl durch ein erhöhtes Herzzeitvolumen (z.B. durch eine verstärkte Sympathikusaktivität oder ein Problem mit der Nierenfunktion) als auch durch einen erhöhten peripheren Widerstand bedingt sein³.

Ein erhöhter Blutdruck nimmt Einfluss auf die tangentielle Wandspannung der arteriellen Gefäße. Diese wird durch die Laplace-Beziehung beschrieben ($S_t = P_{tm} \times \frac{r_i}{w}$) und ist v.a. abhängig von der transmuralen Druckdifferenz P_{tm} (Differenz zwischen intra- und extravasalem hydrostatischem Druck), die den passiven Dehnungszustand eines Gefäßes

Kapitel 3

beschreibt. Steigt der Blutdruck, so erhöht sich der intravasale Druck und führt über die damit assoziierte Erhöhung von P_{tm} zu einem Anstieg der tangentialen Wandspannung. Aber auch eine Zunahme des Innenradius durch aktive Vasodilatation kann zu einer Erhöhung der Wandspannung führen. In beiden Fällen versuchen die GMZ durch aktive Kontraktion (myogene Autoregulation) die Wandspannung zu reduzieren. Diese Reaktion ist besonders ausgeprägt in Widerstandsgefäßen von Organen, die möglichst konstant durchblutet werden sollen, wie z.B. das Gehirn oder die Glomeruli der Nieren, mit dem Ergebnis, dass sich der periphere Widerstand ($R = \frac{8\eta l}{\pi r^4}$) erhöht. Langfristig kann ein Anstieg der Wandspannung aber nur durch einen strukturellen Umbau der Gefäßwand – je nach Gefäßtyp und Größe entweder durch Hypertrophie oder Hyperplasie der glatten GMZ, die immer auch von einem Umbau der EZM begleitet ist – und damit einhergehend einer Zunahme der Wanddicke (w) ausgeglichen werden^{1,7}.

Klassischerweise wird dabei zwischen eutropher und hypertropher Gefäßremodellierung unterschieden. Der nach innen gerichtete eutrophe Gefäßumbau ist durch einen geringeren Gefäß- und Innendurchmesser mit unveränderter medialer Querschnittsfläche charakterisiert, während die hypertrophe Remodellierung mit einer erhöhten medialen Querschnittsfläche einhergeht. In beiden Fällen ist der Media/Lumen-Quotient erhöht^{8,9}. Essentielle Hypertonie wird normalerweise mit einem eutrophen Gefäßumbau in den Widerstandsgefäßen assoziiert, während ein hypertropher Umbau dieser Gefäße bei sekundären Hypertonieformen auftritt, in denen das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System verstärkt aktiv ist. Ein Beispiel dafür ist die renovaskuläre Hypertonie¹⁰. In den Leitungsarterien dagegen wird bei Hypertonie eine nach außen gerichtete hypertrophe Remodellierung beobachtet, bei der die Gefäßwand verdickt ist und der Innendurchmesser wächst.

Beteiligt am Bluthochdruck-induzierten Gefäßwandumbau sind vor allem Matrixmetalloproteasen, die in ihrer Funktion als proteolytisch aktive Endopeptidasen – wahrscheinlich Integrin-vermittelt – gezielt Matrixmoleküle der EZM abbauen und so aktiv an der Restrukturierung der EZM und der glatten Muskelzellen in der Gefäßwand mitwirken¹¹. Des Weiteren scheint bei dem eutrophen Gefäßumbau ein Zusammenspiel aus Apoptose und Zellwachstum am Erhalt des medialen Volumens beteiligt zu sein¹².

Eine verstärkte Expression von Adhäsionsmolekülen (z.B. *vascular cell adhesion molecule 1*, VCAM-1) und Chemokinen (z.B. *monocyte chemoattractant protein 1*, MCP-1) und nachfolgender Rekrutierung von Monozyten, die in der Gefäßwand zu Makrophagen differenzieren, führt zu einer als geringgradig bezeichneten Inflammation. Durch eine gesteigerte Kollagensynthese wird zudem das Kollagen-Elastin-Verhältnis in der Media beeinflusst¹³, die in einem Verlust der Dehnbarkeit und somit in einem Anstieg der Gefäßsteifigkeit (*stiffness*) resultiert.

Die Dehnbarkeit der Gefäße wird generell durch den Anteil an elastischen Fasern charakterisiert. So führt ein altersbedingter Verlust von elastischen Fasern in den Leitungsarterien zu einer verringerten Dämpfungsfunktion (Windkesselfunktion) und somit zu einem erhöhten Pulsdruck. Damit steigt die Gefahr für unter Ruhebedingungen stark durchblutete Organe wie Gehirn oder Niere¹⁴. Die Störung der Mikrozirkulation in der Niere kann als Folge eines dauerhaft erhöhten Pulsdruckes zu einer glomerulären Hyperfiltration und einer Schädigung des glomerulären Filters und nachfolgend zu einer Mikroalbuminurie führen¹⁵. Im Gehirn erhöht sich durch einen dauerhaft erhöhten Pulsdruck u.a. die Dissektionsgefahr und somit das Risiko eines blutigen Schlaganfalls¹⁶.

Eine erhöhte Gefäßsteifigkeit der Widerstandgefäße, die - wie bereits beschrieben - durch einen permanent erhöhten Blutdruck bedingt sein kann, resultiert zudem in einer Nachlasterrhöhung für das linke Herz, wodurch der im linken Ventrikel erzeugte Druck zur Überwindung des Gegendrucks in der Ausflussbahn (Aorta) ansteigen muss. Die Folge ist gemäß der LaPlace-Beziehung die Entstehung einer Linksherzhypertrophie (kompensatorische Zunahme der Wanddicke mit Umbau der EZM), die in eine Herzinsuffizienz übergehen kann¹⁷.

3.2.2 Pulmonaler arterieller Bluthochdruck

Die pulmonale arterielle Hypertonie (PAH) ist durch einen mittleren pulmonalen arteriellen Blutdruck (mPAP, *mean pulmonary arterial pressure*) von über 25 mmHg unter Ruhebedingungen und über 30 mmHg bei Belastung gekennzeichnet (1. Grad)¹⁸. Als Normalwert gilt ein mPAP von 14 ± 3 mmHg. Die klinische Signifikanz eines mPAPs zwischen 21 und 24 mmHg ist bislang unklar¹⁹. Man unterscheidet bei PAH zwischen idiopathischer und familiärer PAH. Während die zugrunde liegenden Faktoren, die die

Kapitel 3

Entstehung der idiopathischen PAH begünstigen, weitgehend unbekannt sind, geht man als Ursache der familiären PAH von Mutationen in Proteinen des TGF- β -Signalwegs aus. Am häufigsten treten dabei Mutationen im *BMPR2*-Gen (*bone morphogenetic protein 2*) auf. PAH gehört aufgrund seiner geringen Inzidenz (2,4 Neuerkrankungen/Million Einwohner/Jahr) zu den seltenen Krankheiten (*Orphan disease*)²⁰ und kann nur symptomatisch behandelt werden. Eine Heilung ist bisher nicht möglich. Die 5-Jahres-Überlebensrate liegt bei 30-50 %³.

Charakterisiert wird die PAH u.a. durch ein unkontrolliertes Wachstum der glatten Muskelzellen vor allem in den kleinen peripheren Lungenarterien, was zu einer medialen Hypertrophie, Intima-Hyperplasie, Fibrose der Adventitia sowie Verkleinerung des Gefäßlumens führt. Die Endothelzellen bilden und setzen vermehrt das vasokonstriktorisch aber auch mitogen wirkende ET-1 frei bei gleichzeitiger Reduktion der Freisetzung von Vasodilatoren wie NO und PGI₂. Zusätzlich wird die PAH mit einer funktionellen Störung spannungsabhängiger Kalium-Kanäle (K_v1.5) in den glatten Muskelzellen der pulmonalen Arteriolen und damit einhergehend einer Fehlsteuerung der hypoxischen pulmonalen Vasokonstriktion assoziiert¹⁸. Auch die Bildung von sogenannten plexiformen Läsionen wird beschrieben²¹. Diese bestehen aus Endothelzellen, Matrixproteinen und Fibroblasten, sogenannte Kapillarproliferate in der Wand der Pulmonalarterien, die deren Lumen zusätzlich verkleinern und somit den präkapillären pulmonalen Widerstand erhöhen. Eine gesteigerte Thrombogenität erhöht die Gefahr einer Okklusion der kleinen Arterien²². Zudem trägt eine erhöhte Expression des mitogen wirkenden Matrix-Moleküls Tenascin C²³ zu der Progression des Krankheitsverlaufs bei. Durch die beschriebene Verengung des Lumens wird der Widerstand in den Lungengefäßen erhöht, was zu einer gesteigerten Nachlast des rechten Ventrikels und langfristig zu einem Rechtsherzversagen führt²⁴, dem sogenannten *Cor pulmonale*.

3.2.3 Therapie des Bluthochdrucks

Um den arteriellen Blutdruck chronisch hypertensiver Patienten zu normalisieren, bedarf es einer medikamentösen Therapie, die je nach Patient und Schweregrad der Hypertonie individuell aus den zur Verfügung stehenden Substanzklassen zusammengestellt wird³. So wird nach dem Stufenplan der Deutschen Hochdruckliga

zunächst mit einer Monotherapie begonnen. Bei ausbleibender Blutdrucksenkung wird zu einer Zweier- bzw. Dreikombination übergegangen. Ziel ist eine Senkung des systolischen Blutdrucks auf Werte unter 140 mm Hg, besser unter 130 mm Hg und noch besser auf 120 mm Hg oder darunter (SPRINT-Studie²⁵) und des diastolischen Blutdrucks unter 90 mm Hg, besser unter 85 mm Hg und noch besser auf 80 mm Hg oder darunter. Das ist mit einer Monotherapie nicht zu erreichen und bedarf einer möglichst geschickten und individuell abgestimmten Kombinationstherapie mit den sogenannten Antihypertensiva der 1. Wahl, die im Folgenden kurz beschrieben sind.

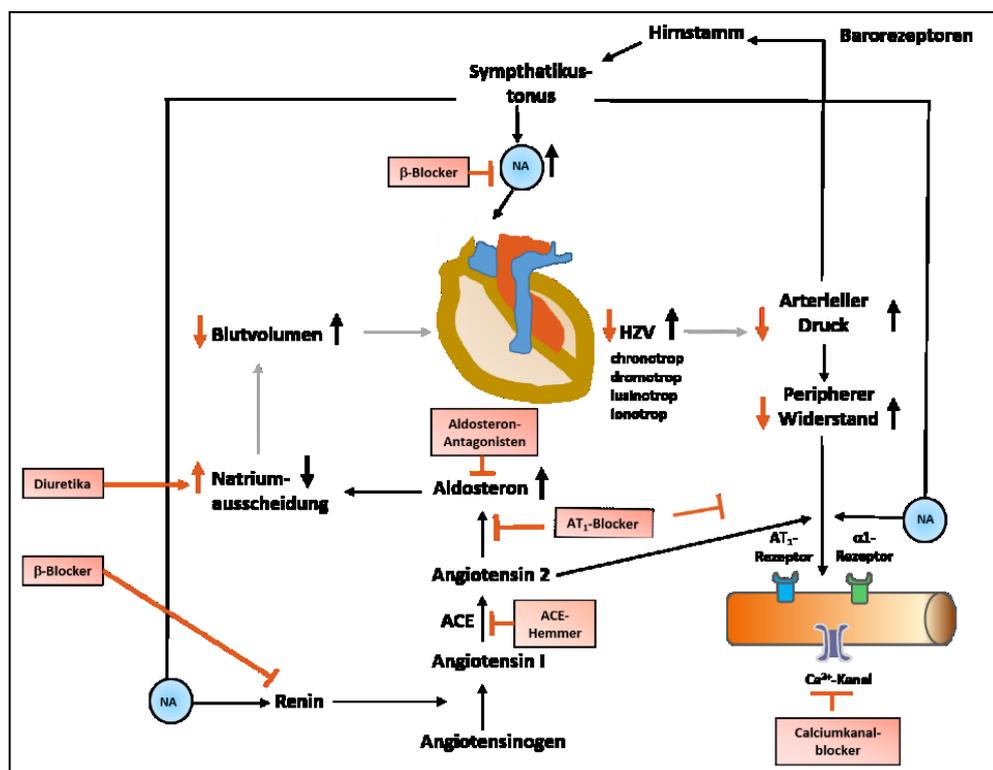


Abb. 2: Darstellung der Angriffsorte von antihypertensiv wirkenden Pharmaka. NA= Noradrenalin, HZV= Herzzeitvolumen, ACE= Angiotensin-Converting-Enzym. Modifiziert aus Arzneimittelwirkungen, Mutschler, 2008.

Die Substanzklasse der Betablocker (z.B. Metoprolol) verringert selektiv die β_1 -Rezeptor-vermittelte Steigerung der Herzfrequenz (H_f) durch Noradrenalin und gilt daher als Mittel der Wahl bei Patienten mit erhöhtem Herzzeitvolumen ($HZV = SV \times H_f$). Die Wirkung der vorwiegend eingesetzten Thiaziddiuretika (z.B. Hydrochlorothiazid) beruht primär auf einer moderat gesteigerten renalen Natriumausscheidung und der damit assoziierten, verminderten Wasserretention. Insofern beeinflusst diese Substanzklasse im Wesentlichen das zirkulierende Blutvolumen, damit das Schlagvolumen (SV) und letztlich ebenfalls das HZV^3 . Des Weiteren kann der periphere Gefäßwiderstand durch

Kapitel 3

die Substanzklasse der Calciumkanalblocker oder Antagonisten (z.B. Amlodipin) gemindert werden, die durch ihre inhibitorische Wirkung auf die L-Typ-Calciumkanäle der GMZ vasodilatierend wirken, somit den totalen peripheren Widerstand und damit v.a. den diastolischen Blutdruckwert senken. Außerdem kann der Blutdruck durch Eingriff in das RAAS-System beeinflusst werden. So wird durch die Substanzklasse der ACE-Hemmer (z.B. Captopril) die Spaltung von Angiotensin I zu Angiotensin II unterbunden, während die sogenannten AT₁-Rezeptor-Antagonisten (z.B. Losartan) selektiv die Wirkung von Angiotensin II am AT₁-Rezeptor hemmen. Die Wirkung einer verminderten Angiotensin II-Bildung bzw. Wirkung ist dieselbe; durch Antagonisierung der vasokonstriktorischen Wirkung von Angiotensin II wird der totale periphere Widerstand und damit der diastolische Blutdruck gesenkt. Durch Verhinderung der Angiotensin II-vermittelten Freisetzung von Aldosteron aus der Nebennierenrinde sinkt die renale Wasserretention, damit das zirkulierende Blutvolumen und infolgedessen Schlagvolumen, Herzzeitvolumen und der systolische Blutdruck. Durch die wesentlich effizientere und globalere Wirkung dieser Substanzklasse im Vergleich zu den anderen Antihypertensiva der 1. Wahl werden ACE-Hemmer bzw. Angiotensinrezeptor-Antagonisten bevorzugt bei Patienten mit einer ausgeprägteren arteriellen Hypertonie eingesetzt³.

In der Pharmakotherapie der pulmonalen Hypertonie wird durch den Einsatz von vasodilatierend wirkenden Substanzen versucht, das Lumen der verengten Gefäße zu erweitern und somit die Blutversorgung im Lungenkreislauf zu verbessern. Eine ‚Heilung‘ der Krankheit ist nur durch eine Herz-Lungentransplantation möglich³. Während inhalative Prostanoiden (z.B. Iloprost) eingesetzt werden, die über einen intrazellulären cAMP-Anstieg die Vasokonstriktion in den Lungenarterien vermindern, inhibieren gemischte Endothelin-Rezeptorantagonisten (z.B. Bosentan) v.a. die ET-1-vermittelte Vasokonstriktion. Auch das ursprünglich zur Behandlung der erektilen Dysfunktion entwickelte Sildenafil findet in der Therapie der PAH Anwendung. Es hemmt die Phosphodiesterase-5, welche cGMP zu GMP abbaut, und führt über den daraus resultierenden Anstieg der cGMP-Konzentration in den GMZ zu einer Relaxation der Lungengefäße²⁰. Da eine manifestierte Rechtsherzinsuffizienz die Bildung von

peripheren Ödemen begünstigt, gilt die Einnahme von Diuretika bei Patienten mit PAH als unabdingbar²⁰.

3.2.4 Phänotypänderung der Gefäßmuskelzellen

Im Vergleich zu ausdifferenzierten Skelettmuskelzellen oder Kardiomyozyten besitzen GMZ die Fähigkeit, in kurzer Zeit auf Veränderungen ihres zellulären Umfeldes durch reversible phänotypische Veränderungen zu reagieren^{26,27}. Charakterisiert wird der Phänotyp von GMZ durch die Morphologie, die migratorische Fähigkeit sowie der Expression von sogenannten Markerproteinen. Im adulten Gefäß weisen sie eine niedrige Proliferationsrate auf und synthetisieren Proteine, die die Elemente des kontraktiles Apparates bilden und somit essentiell für die Kontraktion und die Blutdruckregulation sind²⁷. Man spricht dabei von einem kontraktiles Phänotyp der GMZ. Ihre Aktivierung z.B. durch humorale Faktoren bei einer Gefäßverletzung oder durch biomechanischen Stress bei Bluthochdruck resultiert in einem Verlust der kontraktiles Eigenschaften und fördert migratorische, proliferative Eigenschaften, die einem synthetischen Phänotyp zugeordnet werden²⁶. In unterschiedlichen Gefäßen aber auch im gleichen Gefäß kann der Phänotyp der GMZ variieren. Dies kann zum Teil durch die unterschiedliche embryonale Herkunft der GMZ erklärt werden²⁸.

Kontraktile GMZ besitzen eine elongierte, spindelförmige Morphologie. Charakterisiert werden sie vor allem durch die Synthese von Proteinen, die – wie bereits erwähnt – essentiell für die Kontraktion sind. Dazu zählen *smooth muscle- α -actin* (SM α A), Smoothelin, *smooth muscle myosin heavy chain* (SM-MHC), *smooth muscle 22-alpha* (SM22 α) und Calponin²⁹. SM-MHC gilt dabei als der einzige Marker, der eine echte Spezifität für GMZ aufweist³⁰. Daher werden die genannten Marker nicht zur Identifizierung von GMZ, sondern nur in Kombination zur Charakterisierung ihres Differenzierungsstatus verwendet²⁶.

Der Promoter kontraktiles, glattmuskulärer Gene weist *cis*-regulatorische Elemente (Bindungsstellen für *trans*-regulatorische Faktoren) auf, die als CARG Box-Elemente ((CC(A/T-reich)₆GG) bezeichnet werden. Diese werden durch den Transkriptionsfaktor *serum response factor* (SRF) erkannt und gebunden. Mithilfe des Koaktivators Myocardin, der mit dem an die CARG-Box gebundenen SRF assoziiert, kann SRF die

Kapitel 3

Transkription bzw. Expression kontraktile Markergene transaktivieren³¹. Als Gegenspieler von Myocardin gilt der *ternary complex factor* Elk-1 (*ETS domain-containing protein Elk-1*), der unter Serumstimulation durch ERK1/2 (*extracellular-signal regulated-kinase 1/2*) phosphoryliert wird und ebenfalls als Kofaktor an SRF bindet³². Ein SRF-Elk-1-reguliertes Gen ist c-Fos, welches als proliferationsförderndes Proto-Onkogen bezeichnet wird³³. Somit wird dem Transkriptionsfaktor SRF eine ambivalente Rolle in der glattmuskulären Genregulation zuteil, da in Abhängigkeit der Bindung seiner Koaktivatoren sowohl der kontraktile als auch der synthetische Phänotyp gefördert werden kann.

Morphologisch unterscheidet sich der synthetische vom kontraktile Phänotyp GMZ durch die als rhomboid oder epitheloid bezeichnete Zellform. Die kontraktile Filamente sind durch eine hohe Anzahl von Organellen ersetzt, die für die Proteinsynthese wichtig sind. Generell wird der synthetische Phänotyp weniger durch die Expression spezieller Markerproteine beschrieben, als durch ein „Verschwinden“ von Proteinen, die dem kontraktile Phänotyp zugeordnet werden. So ist die Proteinexpression von SM-MHC oder Calponin in proliferierenden GMZ deutlich reduziert. Dagegen wird CRBP-1 (*cellular retinol binding protein 1*), das als essentiell für den Transport und Metabolismus von Retinol gilt, in synthetischen GMZ verstärkt gebildet²⁶.

Wie bereits erwähnt, kann eine Veränderung des glattmuskulären Phänotyps durch verschiedene Faktoren induziert und somit sowohl der synthetische als auch der kontraktile Phänotyp begünstigt werden. So wird unter Stimulation mit PDGF-BB (*platelet-derived growth factor*) die Expression von SM α A verringert und die Proliferation der GMZ gefördert^{26,34}. Diese Beobachtungen stehen im Zusammenhang mit einer durch PDGF-BB-vermittelten Phosphorylierung von ERK1/2 und der Akt-Kinase (Proteinkinase B) mit nachfolgender Aktivierung von JNK (*c-jun N-terminal kinase*). Zudem wird Elk-1 – wie bereits beschrieben – durch aktiviertes ERK1/2 phosphoryliert und verdrängt den Kofaktor Myocardin aus dessen Bindung mit SRF.

TGF- β 1 (*transforming growth factor β 1*) hingegen fördert den kontraktile Zustand glattmuskulärer Zellen. In kultivierten GMZ wird durch TGF- β 1-Stimulation die Expression von SM α A, SM-MHC and Calponin verstärkt. Zusätzlich induziert TGF- β 1 die

Expression von p21, einem Zellzyklusprotein, das die Zellteilung unterbindet²⁶. Die zugrunde liegende Signaltransduktion verläuft über die Bindung von TGF- β 1 an dessen Rezeptor (einem Komplex aus TGF-Rezeptor Typ II und ALK5-Rezeptor Typ I), wodurch ALK5 durch den TGF-Rezeptor phosphoryliert wird. Nachfolgend werden Smad 2 und 3-Proteine rekrutiert, phosphoryliert und mit Smad 4 komplexiert. Dieser Komplex transloziert in den Zellkern, um nachfolgend die Genexpression zu induzieren. Die TGF- β 1-vermittelten Effekte werden als CARG/SRF-abhängig beschrieben, da Smad 3 direkt mit SRF interagiert, wodurch eine Bindung von Myocardin an SRF gefördert wird³⁵.

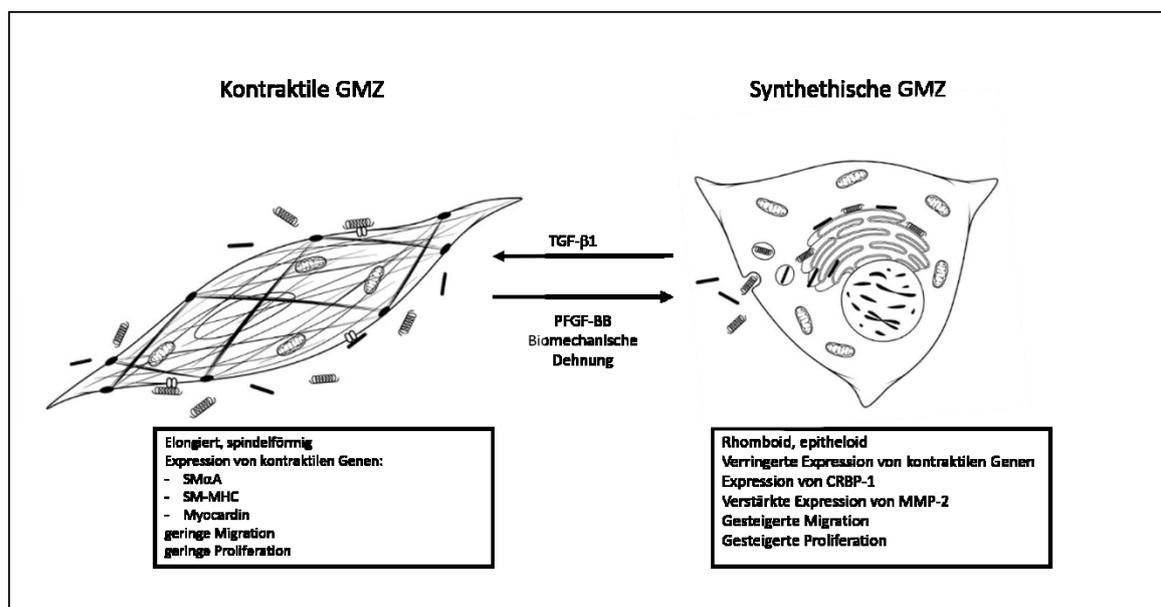


Abb. 3: Phänotypische Charakterisierung glatter GMZ. Modifiziert aus Milewicz et. al.³⁶

In Abhängigkeit des initialen Phänotyps der glatten Muskelzellen kann durch Stimulation mit Retinsäure sowohl der kontraktile als auch der synthetische Zustand der Zellen unterstützt werden. So wurde einerseits eine verstärkte Retinsäure-vermittelte Expression von Smoothelin und SM-MHC sowie eine verringerte Proliferation der GMZ beschrieben. Andererseits wurde eine verstärkte Expression des synthetischen Markers CRBP-1 sowie eine verstärkte Proliferation nach Retinsäurestimulation berichtet. Auch für TNF- α (Tumornekrosefaktor α) und IGF-1 (*Insulin-like growth factor 1*) sind ambivalente Effekte hinsichtlich ihrer Wirkung auf den glattmuskulären Phänotyp beschrieben²⁶.

Die Zusammensetzung der EZM besitzt ebenfalls Einfluss auf den phänotypischen Zustand der GMZ. Dabei binden die EZM-Moleküle spezifisch an

Kapitel 3

Transmembranrezeptoren, z.B. Integrine, die sich auf der Oberfläche der GMZ befinden. Die EZM ist hauptsächlich aus Kollegen (meist Typ I und III), Elastin und Proteoglykanen aufgebaut³⁷. Heparine tragen zur Aufrechterhaltung des kontraktiven Phänotyps der GMZ bei, da es deren Proliferation verringert. Auch fibrilläres Kollagen Typ I fördert den kontraktiven Zustand der GMZ, wohingegen dessen monomere Form (Gelatin) die Proliferation der Zellen fördert. Des Weiteren fördert Kollagen Typ IV den kontraktiven Phänotyp der GMZ, das Glycosaminglykan Hyaluronsäure dagegen verstärkt Migration und Proliferation und damit den synthetischen Phänotyp der GMZ. Laminin wird eine ambivalente Rolle zuteil, da es sowohl unter PDGF-BB als auch unter TGF- β 1-Stimulation verstärkt exprimiert wird und die Proliferation von GMZ sowohl fördern als auch hemmen kann²⁶. Die Matrix-Metalloproteinasen, die von glatten Muskelzellen sezerniert werden, sind durch ihre Funktion als Endopeptidasen aktiv an der Komposition der EZM beteiligt und tragen somit zur Phänotyp-Modulation selbst bei³⁰.

Zusätzlich wird der Phänotyp glattmuskulärer Zellen auch durch biomechanische Faktoren beeinflusst. Während eine erhöhte Schubspannung (*shear stress*), die primär auf die Endothelzellen im Gefäß wirkt, die GMZ in der Media nur indirekt beeinflusst (z.B. durch das bei erhöhter Schubspannung vermehrt freigesetzte NO), wirkt eine erhöhte Wandspannung infolge einer größeren transmuralen Druckdifferenz direkt auf die GMZ und verformt (dehnt) diese bidirektional. Dies geschieht unter anderem bei arteriellem Bluthochdruck und resultiert in einer Proliferation der Zellen, die zu einer Verdickung der Media führt. Arterien sind in diesem Kontext in der Lage, durch autokrine und parakrine hormonale Mechanismen auf mechanischen Stress zu reagieren. So verschiebt sich unter Dehnung die Anordnung der Glykoproteine in der EZM, welche mit Integrinen interagieren³⁸. Die zytoplasmatische Domäne der Integrine dient funktionell der Signalweiterleitung und beeinflusst Proteine des Zytoskeletts und die Aktivität von Kinasen an den fokalen Adhäsionen (z.B. *focal adhesion kinase* oder Src-Kinase). Auch der PDGF-A- sowie der EGF (*epidermal growth factor*)-Rezeptor werden als mechanosensitiv beschrieben³⁹. So führt die Aktivierung des EGF-Rezeptors zu einer Rekrutierung des Adapterproteins GRB2 (*growth factor receptor-bound protein 2*) und über den Ras-vermittelten Signalweg zu einer Phosphorylierung von ERK1/2⁴⁰. Aktiviertes ERK1/2 gilt dabei als essentiell für die Phosphorylierung von c-Fos, was somit

als Untereinheit des Transkriptionsfaktors AP-1 (*activator protein 1*) zu dessen Aktivierung beiträgt. Die Familie der Rho GTPasen (Cdc42, Rac, Rho) weist in gedehnten GMZ ebenfalls eine erhöhte Aktivität auf und stimuliert Signalwege, die zu einer Aktivierung der Proteinkinasen JNK, p38 oder Akt führen⁴¹.

Des Weiteren sind auch mechanosensitive, nicht-selektive Kationenkanäle beschrieben, die nach Aktivierung zu Veränderungen der jeweiligen intrazellulären Ionenkonzentration führen. Als Beispiel kann hier die Aktivierung des *stretch-activated channels* (SAC) genannt werden, der zu einem Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration führt⁴². Zudem werden auch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren wie der AT₁-Rezeptor als mechanosensitiv beschrieben⁴³ und kann so – unabhängig von der Bindung seines Liganden Angiotensin II – aktiviert werden. Dies führt G-Protein-vermittelt über die Aktivierung der PLC β - wie bereits erläutert – zur Spaltung von Phosphatidylinositolbisphosphat in IP₃ und DAG. Zusätzlich zu der IP₃-vermittelten Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration werden membranständige *transient receptor potential* (TRP)-Kanäle wie z.B TRPC6 (nicht-selektiver Kationenkanal) durch DAG aktiviert⁴⁴. Nach der dadurch eingeleiteten, initialen Depolarisation der glatten Muskelzellen werden spannungsabhängige L-Typ-Calciumkanäle geöffnet. Dies resultiert in einer Kontraktion der glatten Muskelzellen, die als Reaktion auf die biomechanische Dehnung (myogene Antwort) betrachtet wird.

3.3 Der Transkriptionsfaktor NFAT5

3.3.1 Die NFAT-Familie

Zu der Familie der NFAT-Transkriptionsfaktoren gehören fünf Proteine (NFAT1-5), die strukturell der Rel/NF- κ B-Familie zugeordnet werden^{45,46}. So weisen sie die für Rel und NF- κ B-Proteine charakteristische, konservierte DNA-Bindedomäne auf, die als Rel-Homologie-Domäne (RHD) bezeichnet wird (Abb. 4). Die Funktion und Struktur der RHD im Zusammenhang mit NF- κ B-DNA-Komplexen wurde bereits gut charakterisiert. Die RHD besteht dabei aus zwei Subdomänen, wobei RHD-N (N-terminal) spezifisch DNA-Bindungsstellen erkennt und RHD-C (C-terminal) essentiell für die Dimerisierung von NF- κ B und dessen Bindung an I- κ B ist. Wie auch NF- κ B liegt NFAT5 in wässriger Lösung dimerisiert vor. Im Vergleich dazu liegt z.B. NFAT1 in Lösung als Monomer vor⁴⁷. Bindet

Kapitel 3

das als symmetrisch beschriebene NFAT5-Dimer an die DNA, wird – anders als im NF- κ B-DNA-Komplex – die ganze DNA umzirkelt⁴⁶. Dies steht im Zusammenhang mit einer erhöhten kinetischen Stabilität und einer langsamen Dissoziation des NFAT5-DNA-Komplexes. Hinsichtlich der DNA-Bindung unterscheiden sich NFAT1-4 von NFAT5, da eine Bindung von NFAT1-4 an die DNA sowohl als Monomer als auch als Dimer beschrieben wird. Die Bindung von NFAT1-4 an die DNA im Komplex mit anderen Transkriptionsfaktoren wird jedoch am häufigsten beobachtet. So führt die Interaktion von AP-1 und NFAT1-4 und dessen DNA-Bindung zu einer erhöhten Stabilität des gebildeten AP-1/NFAT-DNA-Komplexes. Des Weiteren kann NFAT1-4 z.B. auch mit Transkriptionsfaktoren, die der GATA-Familie zugeordnet sind (z.B. GATA-4), zusammenwirken⁴⁵.

Für NFAT5 wurde die Konsensussequenz 5'-TGGAAA-3' identifiziert, sie ähnelt der Konsensussequenz von NFAT1-4 (5'GGAAAA-3'), die im Komplex mit anderen Transkriptionsfaktoren gebunden wird. Auf die für NFAT1-4 angegebene Konsensussequenz folgt eine invertierte Wiederholung der Basen GGA (oder GGA und GGT), wenn NFAT als Monomer oder als Dimer an die DNA bindet. Dabei unterscheidet sich die Länge der Sequenz minimal (insgesamt 9-10 Basenpaare (Monomer) bzw. 11-12 Basenpaare (Dimer))⁴⁸.

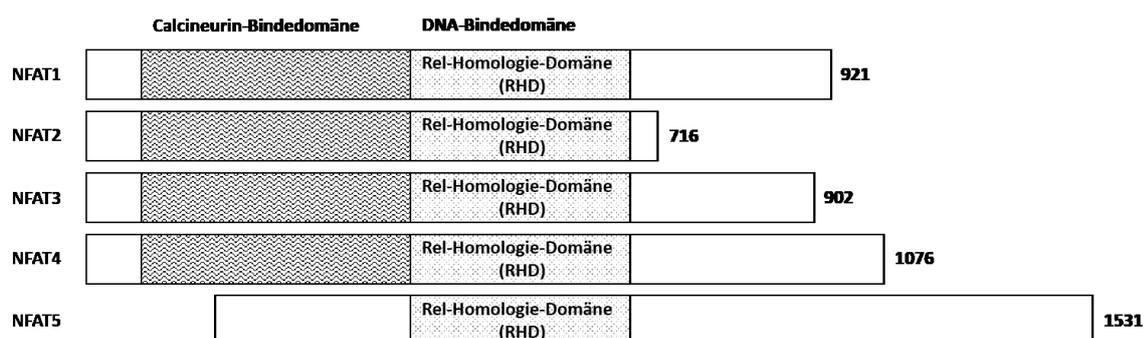


Abb. 4: Schematische Darstellung der NFAT-Familie von Transkriptionsfaktoren. NFAT1-5 weisen eine gemeinsame RHD-Region auf. Im Vergleich zu NFAT1-4 fehlt die Calcineurin-Bindedomäne im NFAT5-Protein. Abbildung nach Cheung et. al, 2013.

Strukturell gibt es weiterhin nur geringe Gemeinsamkeiten von NFAT5 mit den anderen Mitgliedern der NFAT-Familie. So wird NFAT1-4 durch eine Calcineurin-regulatorische Domäne charakterisiert, die sich N-terminal zur DNA-Bindedomäne befindet⁴⁹. Im inaktiven Zustand liegt diese Domäne hyperphosphoryliert vor. Erst deren

Dephosphorylierung durch die Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Serinphosphatase Calcineurin führt zu einer Aktivierung von NFAT1-4, wodurch eine Kerntranslokation und Interaktion mit den Promotoren bestimmter Zielgene möglich wird⁴⁵. Als NFAT1-4 abhängige Zielgene gelten unter anderem IL-2, IL-4, TNF- α (in Immunzellen)⁵⁰ oder BNP (*brain natriuretic peptide*) (in Kardiomyozyten)⁵¹.

Während die Aktivität von NFAT1-4 somit von der intrazellulären Calciumkonzentration abhängt, wird sowohl die Expression von *NFAT5*, die Synthese des NFAT5-Proteins als auch die Translokation von NFAT5 in den Zellkern durch osmotischen Stress induziert (siehe Kapitel 3.3.2). NFAT5 wird dabei Calcineurin-unabhängig reguliert. NFAT5 interagiert nicht mit dem Transkriptionsfaktor AP-1, der sich als Heterodimer aus den Untereinheiten c-Fos und c-Jun zusammensetzt und eine wichtige Rolle in der NFAT1-4-vermittelten Genregulation einnimmt⁵².

Das *NFAT5*-Gen kann nach dessen Transkription durch alternatives Spleißen zu 6 unterschiedlichen Varianten führen (1-6), die für 4 verschiedene Isoformen (A-D) kodieren. Die Beschreibung der strukturellen Eigenschaften von NFAT5 bezieht sich im folgenden Abschnitt, wenn nicht anders angegeben, auf die Isoform C. NFAT5(c) besitzt zusätzlich zu der bereits beschriebenen RHD-Domäne ein N-terminales NES (nukleäres Exportsignal, Aminosäure (AS) 1-19), das in der Isoform A fehlt. Im Vergleich zu NFAT5c besitzen Isoform B und D jeweils eine zusätzliche Sequenz von 18 AS an Position AS 26. Zusätzlich fehlt in der Isoform D eine AS (Alanin-547)⁴⁹.

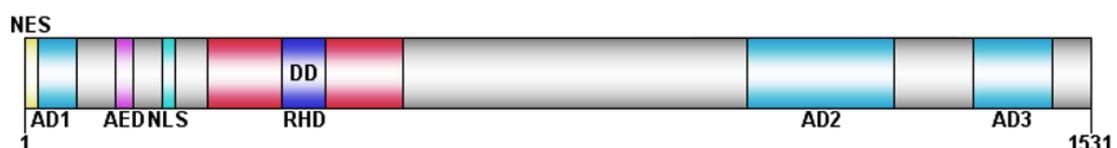


Abb. 5: **Schematische Darstellung von NFAT5c:** NES (AS 1-19), AD1 (AS1-76), AED (132-156), NLS (AS 199-216), RHD (AS 264-543), DD (AS 370-433), AD2 (AS1038-1249), AD3 (AS 1363-1476). Modifiziert nach Cheung & Ko, 2013.

Des Weiteren weist NFAT5c ein NLS (nukleäres Lokationssignal, AS 199-216), eine AED (auxilliäre Exportdomäne, AS 132-156), eine Dimerisierungsdomäne (AS 370-433)

Kapitel 3

innerhalb der RHD (AS 264-543) sowie drei Transaktivierungsdomänen (AD1, AS 1-76; AD2, AS 1039-1249; AD3; AS1363-1476) auf⁴⁹ (Abb. 5).

3.3.2 *Mechanismen zur Regulation der Aktivität von NFAT5*

Der Transkriptionsfaktor NFAT5 – auch TonEBP (*tonicity element binding protein*) genannt – wird als osmoprotektives Protein beschrieben⁴⁹. Aufgrund dieser Funktion kommt NFAT5 in der Niere eine besondere Rolle zu, da die Zellen im Nierenmark stets hohen und variablen Konzentrationen an Natrium und Harnstoff ausgesetzt sind. Die Osmolarität kann dabei auf 1000-1200 mosm/L ansteigen (zum Vergleich: Werte von 280 - 300 mosm/L gelten als isoton). Erhöhte extrazelluläre Natriumkonzentrationen sind zytotoxisch, da die Zellen zunächst über einen Wasserausstrom und infolgedessen einer intrazellulärer Konzentrierung der Elektrolyte einen osmotischen Ausgleich anstreben. Die hohe Ionenstärke kann jedoch zu Störungen in der Proteintranslation oder zur Denaturierung der DNA führen. Hyperosmolarer Stress führt zu einer Aktivierung von NFAT5^{49,53}: So werden unter diesen Bedingungen sowohl erhöhte NFAT5-mRNA-Mengen als auch eine verstärkte NFAT5-Proteinexpression detektiert. Des Weiteren führt hyperosmolarer Stress zu einer erhöhten Kerntranslokation von NFAT5 sowie zu einer verstärkten NFAT5-abhängigen Expression osmoprotektiver Genprodukte wie der Aldose-Reduktase (AR), die Glukose in Sorbitol umwandelt, dem Betain/ γ -Aminobutyrat (GABA)-Transporter (BGT1), dem Taurintransporter (TAUT) und dem Inositoltransporter (SMIT). Auch die Aquaporine 1 und 2, der Harnstoff-Transporter UT-A sowie die für die Natriumretention wichtige SGK-1 (Serum- und Glukokortikoid-induzierbare Kinase 1) sind als NFAT5-abhängige Genprodukte beschrieben. Die bereits bekannten Signalwege der osmolaritätsabhängigen Kerntranslokation von NFAT5 sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Da die Aktivierung von NFAT5 durch osmotischen Stress auch in anderen Gewebetypen (z.B. Herz, Leber, Gehirn) beobachtet wurde, spricht dies für eine konservierte Funktion von NFAT5, da die untersuchten Gewebetypen physiologisch keiner erhöhten Osmolarität ausgesetzt sind⁵². So werden NFAT5-abhängig die Enzyme CYP1 (essentiell für die Umwandlung von Ethanol zu Acetaldehyd im Körper) und CYP3A7 (fremdstoffmetabolisierende Cytochrom P450-Monooxygenase) in Hepatozyten reguliert. In der TH₁-artigen Hybridoma-Zelllinie 68-41 führt die Aktivierung von NFAT5

zu einer verstärkten Expression von TNF- α und in Mesothelzellen zu einer verstärkten Bildung von MCP-1⁴⁹.

Tabelle 1: Übersicht der Aktivierungsmechanismen von NFAT5 in Abhängigkeit vom Grad der Osmolarität.

Bedingungen	Regulation durch	Mechanismus	Position	Effekt auf NFAT5	Referenz
Hypo-osmolar	?/ Casein-Kinase-1	Phosphorylierung Phosphorylierung	Ser155/ Serin158 (AED)	Kernexport	⁵⁴
Isoosmolar	Exportin-1	CRM1-Inhibition	NES	Akkumulation im Zellkern	⁵⁵
Hyper-osmolar	CDK-5	Phosphorylierung	Thr-135 (AED)	Kernimport	⁵⁶
Hyper-osmolar	c-Abl	Phosphorylierung	Tyr-143 (AED)	Kernimport	⁵⁷
Hyper-osmolar	PLC- γ -1	Interaktion mit pTyr143	(AED)	Kernimport	⁵⁸

Abkürzungen: CRM-1 = *Chromosomal maintenance 1*, CDK-5 = *Cyclin-dependent kinase-5*, c-Abl = *Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1*, PLC- γ -1 = *Phospholipase C γ 1*, CK-1 = *Casein Kinase 1*

Derzeit wird diskutiert, ob Schwankungen in der Osmolarität z.B. bei Gewebefunktionsstörungen oder Gewebeverletzungen ausreichen, um NFAT5 zu aktivieren⁴⁹. So erreicht die Osmolarität im Serum von *Diabetes mellitus*-Patienten z.B. Werte von bis zu 350 mosm/L, in Kardiomyozyten nach einem Myokardinfarkt sind es bis zu 360 mosm/L. *In vitro* wird eine Aktivierung von NFAT5 jedoch erst ab 380 mosm/L beobachtet. Es ist daher nicht ausgeschlossen, dass andere Mechanismen initial an der Aktivierung von NFAT5 beteiligt sind⁵⁹.

Zahlreiche Studien belegen eine Osmolaritäts-unabhängige Regulation und Funktion von NFAT5 in verschiedenen Zelltypen. So führt die Aktivierung von NFAT5 durch das Integrindimer $\alpha_6\beta_4$, das bei Brustkrebs vermehrt gebildet wird, zu einer verstärkten Invasion der Karzinomzellen in eine Matrigelmatrix⁶⁰. Als NFAT5-abhängiges Zielgen wird dabei S100A4 (*s100 calcium binding protein a4*) beschrieben. In der Synovia von

Kapitel 3

Patienten mit rheumatoider Arthritis konnte für die pro-inflammatorischen Zytokine TNF- α und IL-1 β gezeigt werden, dass sie in den Fibroblasten-artigen Synoviozyten die Expression und Translokation von NFAT5 in den Zellkern fördern⁶¹. Ein siRNA-basierter *knockdown* von NFAT5 hatte eine verminderte TNF α und IL-1 β -induzierte Proliferation der Synoviozyten zur Folge. Des Weiteren ist NFAT5 an der HIV-Replikation in Monozyten beteiligt⁶². In primären T-Lymphozyten und in einer humanen T-Zelllinie (Jurkat-Zellen) wird Toll-like-Rezeptor (TLR)-vermittelt die NFAT5-Expression sowie dessen transkriptionssteigernde Wirkung auf verschiedene Zielgene verstärkt⁶³. Bislang wird eine Beteiligung von Calcineurin an einer Osmolaritäts-unabhängigen Aktivierung von NFAT5 nur in Jurkat-Zellen diskutiert⁵⁹.

Auch in der Embryonalentwicklung ist die Expression von NFAT5 essentiell. Homozygote NFAT5-defiziente Mäuse weisen eine renale Atrophie auf und sterben an Tag E14.5 (pränatal). Sie werden als immundefizient beschrieben und leiden unter einer Hypernatriämie⁶⁴. Zudem zeigen sie kardiale Entwicklungsstörungen mit einer erniedrigten Herzfrequenz. In den Kardiomyozyten wurde eine Kontraktionsstörung beobachtet, die mit einer verringerten Expression der Ryanodinrezeptoren assoziiert wird, welche zu einer Störung der Calciumfreisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum in das Cytosol führt⁶⁵.

3.3.3 *Regulation von NFAT5 in glatten Gefäßmuskelzellen*

In GMZ scheint die Funktion von NFAT5 abhängig von deren Stimulation zu sein. So verstärkt Angiotensin II die Kerntranslokation von NFAT5 ohne jedoch eine Veränderung der NFAT5-mRNA- bzw. Proteinmenge in den Zellen hervorzurufen. Allerdings führt die Stimulation mit Angiotensin II zu einer verstärkten Aktivierung eines NFAT5-Reportergenkonstrukts⁶⁶. NFAT5 ist zudem essentiell für die Angiotensin II-vermittelte Expression von SM α A. Die Stimulation von GMZ mit PDGF-BB dagegen verstärkt sowohl die Proteinexpression von NFAT5 als auch die Aktivität eines NFAT5-Reportergenkonstrukts. Ein Verlust von NFAT5 resultiert in einer verringerten PDGF-BB-induzierten glattmuskulären Migration. Untersuchungen an humanen und murinen Arterien zeigen ein hohes Expressionsniveau von NFAT5 in arteriosklerotischen Plaques sowie in der *A. carotis* 21 Tage nach einer Ballondenudation (Entfernung der Endothelzellen) des Gefäßes (*carotid artery balloon injury model*). Eine biomechanische

Aktivierung von NFAT5, die durch eine verstärkte Expression des *NFAT5*-Gens sowie eine zeitlich offenbar vorausgehende Translokation des Proteins in den Zellkern charakterisiert ist, wurde sowohl in isolierten, unter Hypertoniebedingungen perfundierten Mausarterien als auch in humanen, biomechanisch gedehnten GMZ *in vitro* beobachtet⁶⁷. Die Kerntranslokation von NFAT5 korrelierte dabei mit einer verstärkten NFAT5-abhängigen Expression von TNC, das - wie oben beschrieben - eine mitogene Wirkung auf die GMZ ausübte. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Proteinkinasen p38, MAP-Kinase (*mitogen-activated protein kinase*) und ERK1/2 keinen Einfluss auf die dehnungsinduzierte Kerntranslokation von NFAT5 besitzen.

3.4 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Eine chronische Erhöhung des Blutdrucks führt nach dem Gesetz von Laplace über den Anstieg der transmuralen Druckdifferenz zu einer erhöhten Wandspannung, der die glatten Muskelzellen in der Mediaschicht arterieller Gefäße im Körperkreislauf ausgesetzt sind. Infolgedessen werden diese bidirektional gedehnt und dedifferenzieren mit einem gewissen Zeitversatz von einem primär kontraktilem ruhenden hin zu einem aktiven synthetischen Phänotyp¹². Die Folge ist eine verstärkte Migration und anschließende Proliferation der Zellen in der sich ausbildenden Neointima und führt zusammen mit einem Umbau der extrazellulären Matrix zu einer strukturellen Gefäßwandremodellierung und einem Anstieg der Gefäßsteifigkeit. Dieser Arbeit vorausgegangene *in vitro*-Ergebnisse zeigten, dass eine Erhöhung der Wandspannung vergleichbare, biomechanische Belastung von GMZ zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFAT5 führt, die anhand dessen verstärkter Translokation in den Zellkern belegt werden konnte. Expressionanalysen wiesen ferner auf eine NFAT5-Abhängigkeit der biomechanisch induzierten Expression des Matrixmoleküls Tenascin C hin, welches die migratorische Aktivität der GMZ verstärkte.

Die Regulation und Funktion von NFAT5 in biomechanisch aktivierten GMZ ist darüberhinaus weitgehend unbekannt und wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit näher untersucht. Dabei sollte *in vitro* der Mechanismus des dehnungsinduzierten Kernimports detailliert charakterisiert und posttranslationale Modifikationen von NFAT5 sowie Signalwege, die die Kerntranslokation beeinflussen, identifiziert werden. Des Weiteren konnte im Vorfeld dieser Arbeit κ -Aktin (*ACTBL2*) mithilfe der Microarray-Technologie

Kapitel 3

als mögliches NFAT5-abhängiges Gen ermittelt werden. Es sollte daher zunächst die Expression von ACTBL2 analysiert, dessen Expressionsabhängigkeit von NFAT5 verifiziert und nachfolgend auf dessen funktionelle Bedeutung im Rahmen des hypertoniebedingten Gefäßwandumbaus eingegangen werden.

Da Tenascin C bereits als Biomarker bei einer bestehenden pulmonalen Hypertonie bekannt war, sollte *in vivo* untersucht werden, ob die Entstehung von Bluthochdruckerkrankungen wie die PAH oder die arterielle Hypertonie mit einer verstärkten Aktivität von NFAT5 assoziiert ist. Dazu sollten induzierbare, glatte GMZ-spezifische NFAT5-defiziente Mäuse genutzt und die Rolle von NFAT5 im Hypoxie-induzierten PAH-Modell sowie im DOCA/Salz-Hypertoniemodell untersucht werden.

4 Material

4.1 Geräte und Materialien

Bezeichnung	Artikelbezeichnung	Hersteller
Agarosegel-Dokumentation	Gel Doc™ RX+ System,	Biorad, München
Bakterieninkubator	Innova 4230	New Brunswick Scientific, Eppendorf, Hamburg
Chemilumineszenzdetektor	ImageQuant LAS 4000 Mini	GE Healthcare, München
Gelgießapparatur (WB)	Mini-Protean® Tetra Cell Casting Module	BioRad, München
Glasplatten (WB)	Mini Protean®	
FlexCell® FX5K Tension System		Dunn Labortechnik, Asbach
Gerät zur Isoelektrischen Fokussierung	Pharmacia Biotech IPGphor Isoelectric Focusing System	GE Healthcare, München
Light Cycler (qPCR)	LightCycler® 1.5	Roche, Mannheim
Mikroskope	Lichtmikroskop CKX41 Fluoreszenzmikroskop IX83 OP-Mikroskop M650	Olympus, Hamburg OP-Mikroskop, Wild Heerbrugg, Gais, Schweiz
Mikrotiterplatten-Lesegerät	Power Wave XS	Bio-Tek, Bad Friedrichshall
Photospektrometer	NanoDrop ND-1000	Thermo Scientific, Braunschweig
SDS-PAGE-Apparatur	Mini-Protean® Tetra Cell	Biorad, München
Zellkulturinkubatoren	Innova CO-170, Function Line	New Brunswick Scientific, Eppendorf, Hamburg Heraeus Instruments, Thermo Scientific, Braunschweig

Kapitel 4

4.2 Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
Bakterienröhrchen	Sarstedt, Nürnberg
Dehnungsplatten (Bioflex® Plates Collagen I, Flexcell®)	Dunn Labortechnik, Asbach
Flügelkanülen (Venofix® A, 25G)	B Braun, Melsungen
Gelstreifen für die Isoelektrische Fokussierung	GE Healthcare, München
LightCycler® Kapillaren (20 µL)	Roche, Mannheim
Reagiergefäß 1,5 mL (Biosphere SafeSeal Tube)	Sarstedt, Nürnberg
Plastikröhrchen 15 mL steril	
Plastikröhrchen 50 mL steril	
Zellkulturflaschen (T75 TC-Flasche)	
Zellkulturplatten, 6 Well	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellkulturplatten, 96 Well	
Zellkulturschalen (60 cm ²)	Trasadingen Schweiz

4.3 Medien, Lösungen und Reagenzien für die Zellkultur

Bezeichnung	Katalognummer	Hersteller
BSA (<i>bovine serum albumine</i>), Fettsäure-frei	A8806	Sigma-Aldrich, Hamburg
DMEM (1 ×) + glutaMAX-I, + 1 g/L Glucose, + Pyruvat	21885-025	Gibco® Life Technologies, Darmstadt
Fungizone, 250 UG/mL,	15290-018	Invitrogen™ Life Technologies, Darmstadt
HBSS	14175-053	Gibco®, Life Technologies, Darmstadt
<i>Heat Inactivated</i> FBS	10500-064	Gibco® Life Technologies, Darmstadt
Opti-MEM™ I	31985-070	
Pen Strep (Penicillin 5000 U/mL,	15070063	

Streptomycin 5000 µg/mL)		
Trypsin-EDTA (0,05 %)	25300-054	

4.4 Stimulatoren und Inhibitoren

Bezeichnung	Vewendete Konzentration	Katalognummer	Hersteller
17-Octadecan-säure (ODA)	25 µM	O8382	Sigma-Aldrich, Hamburg
2-Bromopalmitat	100 µM	238422	
Actinomycin D	5 µg/mL	A9415	
Bortezomib	1 nM- 100 nM	S1013	Selleckchem, München
DMSO		23500.297	VWR, Bruchsal
Dasatinib	5 nM	sc-358114	Santa Cruz, Heidelberg
Etomoxir	40 µM	236020	Merck Millipore, Darmstadt

4.5 Reagenzien für den siRNA-basierten Gen-Knockdown

Bezeichnung	Sequenz/ Katalognummer	Hersteller
siNFAT5	5'-CCA GTT CCT ACA ATG ATA A-3'	Sigma-Aldrich, Hamburg
ABL1 Silencer®Select Validated siRNA	S864	Ambion, Applied Biosystem, Thermo Scientific, Darmstadt
RT2 PCR Primer Set for Human ACTBL2	PPH22495A	Quiagen, Hilden
Dharmacon siGenome Control siRNA, non-targeting siRNA #1	D-001210-01-20	Thermo Scientific, Darmstadt
MATra-si Reagent	7-2021-100	IBA, Göttingen

Kapitel 4

4.6 Reagenzien und Kits für molekularbiologische und biochemische Analysen

Bezeichnung	Katalognummer	Hersteller
Biotin-Azid	B10184	Life Technologies, Darmstadt
Streptavidin-HRP	P0397	DAKO, Hamburg
DAB	D5905	Sigma-Aldrich, Hamburg
Streptavidin-Agarose-Resin	20347	Thermo Scientific, Darmstadt
Peqgold Total RNA Kit	12-6634-02	Peqlab, Erlangen
Omniskript	205113	Qiagen, Hilden
TopTaq (DNA Polymerase 5 U/ μ L)	111125	Bioron, Ludwigshafen
SYBR [®] Green (LightCycler [®] 480 SYBR Green I Master)	04707516001	Roche, Mannheim

4.7 Kits für Klonierungsarbeiten

Bezeichnung	Katalognummer	Hersteller
NucleoBond [®] Xtra Maxi EF	740424.10	Macherey-Nagel, Düren
QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit	200521	Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA

4.8 Puffer, Lösungen und Chemikalien

Bezeichnung	Katalognummer/ Zusammensetzung	Hersteller
2-D-GE: Trenngel	43,4 mL Acrylamid (30 %) 32,5 mL 4 x Puffer 1,3 mL SDS (10 %) 52,2 mL aqua dest. 650 μ l APS (10 %) 42,9 μ l Temed	

Material

4 x Gelpuffer (2-D-GE)	181,5 g Tris-HCl 750 mL aqua dest. pH 8,8 Ad. 1 L aqua dest.	
Acrylamid (Rotiophorese® Gel 30 (37,5:1))	3029.1	Roth, Karlsruhe
Adenosin	A4036	Sigma-Aldrich- Hamburg
Bradfort-Reagenz (Bio-Rad <i>Protein Assay Dye Reagent Concentrate</i>)	#500-0006	Bio-Rad, München
BSA	A2153	Sigma-Aldrich, Hamburg
Blotto	sc-2325	Santa Cruz, Heidelberg
Blockierlösung (WB)	5 % Blotto in 1 × PBS	
Casein-Blockierlösung	50 mM Tris 0,25 % Casein 0,1 % BSA 15 mM Natriumazid Ad 20 mL aqua dest.	
ChIP-Lysepuffer	1 % SDS 10 mM EDTA 50 mM Tris-HCl (pH 8,0)	
Decross-Linking-Puffer	400 µl 1 M Tris-HCl (pH 6,8) 500 µl 0,2 M EDTA 66,66 µl 3M NaCl 20 µl Proteinase K (20 mg/ml) 13,34 mL aqua dest.	
DNA-Probenpuffer	R0611	Fermentas, St.
DNA-Standard (<i>GeneRuler</i>)	SM0321/2/3	Leon-Rot

Kapitel 4

100 bp DNA Ladder Plus)		
DTT 1 M	1,5425 g in 10 mL aqua dest.	
ECL Luminata™ Forte Western HRP Substrate	WBLUF0500	Merck Millipore, Darmstadt
Elutionspuffer (ChIP)	200 µl 1 M NaHCO ₃ 200 µl 10 % SDS 1600 µl aqua dest.	
IPG-Gelstreifen (Immobiline DryStrip 18cm pH 4-7)	17-1233-01	GE Healthcare, München
IPG-Puffer	17-60000-88	
Kupfersulfat	61230	Sigma-Aldrich, Hamburg
LB Agar	L2897	
LB-Broth (Lennox)	L3022	
Lysepuffer (Schwanzbiopsie)	50 mM KCl 1,5 mM MgCl ₂ 10 mM Tris-HCl (pH 8,3) 0,45 % NP-40 0,45 % Tween-20	
Magnet Dynal Protein G beads	10003D	Thermo Scientific, Darmstadt
Miglyol® 812 Mittelkettige Triglyceride	3274	Caesar & Loretz GmbH, Hilden
Mineralöl	163-2129	Biorad, München
Mowiol	Mowiol 4-88 Reagent 2,4 g Mowiol 6 g Glyzerin 6 mL H ₂ O 2 h rühren 12 mL 0,2 M Tris pH 8,5 2,5 % DABCO	

Material

N-Z-Amine®A	C0626	Sigma-Aldrich, Hamburg
Natriumfluorid	Endkonzentration: 20 mM	
Natriumorthovanadat	Endkonzentration 20 mM	
Natriumnitroprussid-Dihydrat	31444	
Nitrozellulosemembran (Amersham Protran Premium 0,45 µm NC)	10600008	GE Healthcare, München
Paraffin high-melting	X881.1	Surgipath Paraplast Plus, Roth, Karlsruhe
Paraffin low-melting	107300	Merck
PBST 10 x	160 g NaCl 4 g KCl 23 g Na ₂ HPO ₄ 4 g KH ₂ PO ₄ Ad 2 L aqua dest.	
PBST 1 x	1 × PBS + 0,05 % Tween-20	
Pefabloc SC	Stocklösung 200 mg/mL in H ₂ O	Sigma-Aldrich, Hamburg
Polyethylenimin, verzweigt	408727	
Proteinlysepuffer 1 (Kernextraktion)	10 mM HEPES 10 mM KCl 0,1 mM EDTA 0,1 mM EGTA 0,15 % Nonidet-P-40	
Proteinlysepuffer 2 (Kernextraktion)	20 mM HEPES 400 mM NaCl 0,01 mM EDTA 0,01 mM EGTA 0,15 % Nonidet-P-40	
Protease-Inhibitoren-Mix	Pepstatin A	P5318-5MG

Kapitel 4

	Leupeptin-Hemisulfat, Vewendung: 12 µL/1 mL Lysepuffer	L2884-10MG
Prälyse-Puffer	50 mM Glucose 25 mm Tris-HCl (pH 8,0) 10 mM EDTA	
Proteinase K	405102	Bioron, Ludwigshafen
Proteinstandard (<i>Precision Plus Protein™ Dual Color Standard</i>)	161-0374	BioRad, München
Rehydrierungspuffer	9 g Urea 3,8 g Thiourea 0,5 g Chaps Ad 25 mL aqua dest.	
Ringerlösung	8,93 g NaCl 0,41 g KCl 0,264 g CaCl ₂ 0,43 g NaHCO ₃ 1 g Glukose 2 mg Natriumnitroprussid 27 mg Adenosin	
RIPA-Lysepuffer	790 mg Tris 900 mg NaCl 75 mL H ₂ O pH 7,4 einstellen 10 % NP-40 10 % Natriumdesoxycholat 1 mL 10 mM EDTA Ad 100 mL aqua dest.	
Roti®-Load 1		Carl Roth, Karlsruhe

Material

SDS-Equilibrationpuffer	6,7 mL Tris 4x-Puffer 50 mM pH 8,8 72,06 g Urea 69 mL Glycerol (87 %) 4 g SDS Ad 200 mL aqua dest.	
SDS-PAGE-Laufpuffer 10 X	30,2 g Tris 188 g Glyzin 50 mL 20 % SDS Ad 1 L aqua dest.	
SDS-PAGE-Laufpuffer 1 x	100 mL SDS-PAGE-Laufpuffer ad 1 L aqua dest.	
Tamoxifen	5648	Sigma-Aldrich, Hamburg
TCEP	c4706	Life Technologies, Darmstadt
TBST 10 X	122 g Tris 175 g NaCl Ad 2 L aqua. dest. pH 7,6	
TBST 1 X	1 × TBS + 0,05 % Tween-20	
TBTA	678937	Sigma-Aldrich, Hamburg
Transferpuffer (WB, 2-D-GE)	400 mL Methanol p.a. 25 mL 2 M Glyzin 6 mL Ethanolamin	
Tyrode-Lösung	25 × <u>Lösung 1</u> , pH 7,4 173,9 g NaCl 5,9 g CaCl ₂ 8,8 g KCl 7,4 g MgSO ₄	5 mL Lösung 1 und 2 ad 250 mL HEPES (1 M), 0,5 g Glukose

Kapitel 4

	Ad 1 L A. dest. 25 × <u>Lösung 2</u> , pH 7,4 52,1 g NaHCO ₃ 4,1 g KH ₂ HPO ₄ Ad 1 L aqua dest.	
Westernblot: Sammelgel	2,7 mL aqua dest. 500 µl Acrylamid (30 % (v/v)) 2,5 mL 1 M Tris-HCl-Lösung pH 6,8 100 µl SDS (10 %) 100 µl APS (10 %) 4 µl TEMED	
Westernblot: Trenngel	1,25 mL Acrylamid (30 % (v/v)) 1,875 mL 1 M Tris-HCl (pH 8,8) 1,781 mL aqua dest. 50 µl SDS (10 %) 50 µl APS (10 %) 4 µl TEMED	
Zinkhaltige Fixierlösung	5 g Zinkacetat-Dihydrat 0,5 g Calciumacetat 5 g Zinkchlorid Ad 1 L 0,1 M Tris pH 7,4	Roth, Karlsruhe Merck Millipore
Zitratpuffer	9 mL Lösung A (0,1 M Zitronensäure), 41 mL Lösung B (0,1 M Tri- Natriumacetat-Dihydrat), 450 mL aqua dest.	

4.9 Primersequenzen

Bezeichnung	Sequenz <i>forward/reverse</i>	Annealing Temperatur
c-Abl	5'-CCTTCATCCCTCTCATATCAACC-3' 5'-TGGACCACTGCCTGCTGTCGC-3'	55°C

NFAT5	5'-AAGAGTGAAGATGTTACTCCAATGGAAG-3' 5'-AAAGTCTGTGCTTGTCTTGTAGTGG-3'	60°C
NFAT5 Isoformen	5'-GCCCTCGGACTTCATCTCATTG-3' 5'-GATGGATGCTGCTGAACTGTGTTAC-3'	54°C
LOX2 SDL2	5'-GTAACCATGATTAGTCTTTTAGCTTTATG-3' 5'-GTTCTGAGAATCCAA AGCACAAAC-3'	59°C
Mut_Cys81A	5'-GTGGTAAAGGAGCTGGCAGCACCCGCCATGGA-3' 5'-TCCATGGGCGGTGCTGCCAGCTCCTTACCAC-3'	60°C
Mut_Ser1197A	5'-GCCTGTTCTTGGGCAAGCATAGGAGTCTGGATG-3' 5'-CATCCAGACTCCTATGCTTGCCCAAGAAGCAGGC-3'	60°C
Mut_Ser1197Glt	5'-GGGGTTGTGCCTGTTCTTGCTCAAGCATAGGAGTCTGGARG-3' 5'-CATCCAGACTCCTATGCTTGAGCAAGAAGCAGGCACAACCC-3'	60°C
Mut_Tyr143A	5'-CAGGTGGTGGTGGATGGCCAAGACTGTGTGCCTCT-3' 5'-AGAGGCACACAGTCTTGCCATCTCACCACCACCTG-3'	60°C
RPL	5'-AGGCATTGACAACAGGGTTC-3' 5'-GTTGCACATCAGCAGCACTT-3'	56°C
SMWT1 SMWT2 Ph-Cre-As1	5'-TGACCCCATCTTCACTCC-3' 5'-AACTCCACGACCACCTCATC-3' 5'-AGTCCCTCACATCCTCAGGTT-3'	58°C
Tenascin C	5'-TCATTGTGGGTCCAGATACC-3' 5'-GGAGTCCAATTGTGGTGAAG-3'	60°C

4.10 Plasmide

Bezeichnung	Vektor	Tag	Bestellnummer	Hersteller
NFAT5- Spleißvariante 1	pCMV6- Entry	C-terminales <i>Myc-DDK-tag</i>	RC219340	OriGene, Rockville, MD, USA
NFAT5- Spleißvariante 3	pCMV6- Entry	C-terminales <i>Myc-DDK-tag</i>	RC216142	OriGene, Rockville, MD, USA

Kapitel 4

4.11 Kompetente Bakterien

Bezeichnung	Hersteller
DH5 α	Erhalten von Dr. Cordula Rumig
XL10-Gold (ultrakompetent)	s. QuickChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit

4.12 Antikörper und Farbstoffe

4.12.1 Primärantikörper

Bezeichnung	Konzentration	Katalognummer	Hersteller
Hase anti-Maus Calponin	1:500	ab4679	Abcam, Cambridge, UK
Ratte anti-Maus CD31, Klon MEC 13.3	1:50	sc-18916	Santa Cruz, Heidelberg
Maus anti-DDK	1:1000	TA50011	OriGene, Rockville, MD, USA
Hase anti-human/Maus κ -Aktin	1:100	ab100869	Abcam, Cambridge, UK
Hase anti-human/Maus Histon H3	1:1000	ab1791	
Maus anti-human NFAT5	1:500 (2D-GE)	ab56997	
Hase anti-human/Maus NFAT5	1:50 (Gewebe)	ab3446	
Hase anti-human NFAT5	1:100 (Zellen) 1:500 (WB)	sc-13035	Santa Cruz, Heidelberg
Hase anti-human-NFAT5_pSerin1197	1:100 (Zellen) 1:1000 (WB)	ab111597	Abcam, Cambridge, UK
Hase anti-human/Maus PCNA	1:500	ab 2426	
Ratte anti-Maus TNC, Klon MTn-12	1:50	MA1-26778	ThermoScientific, Darmstadt
Hase anti-Maus/human α -Tubulin	1:1000	#2144	Abcam, Cambridge, UK

4.12.2 *Sekundärantikörper*

Bezeichnung	Konzentration	Katalognummer	Hersteller
Ziege anti-Hase IgG (Gesamtmolekül), Peroxidase Antikörper	1:3000	A6154	Sigma-Aldrich, Hamburg
Ziege anti-Maus IgG (Gesamtmolekül), Peroxidase Antikörper	1:5000	A4416	
Esel anti-Hase IgG (F(ab)2 Fragment), Cy3	1:100	711-166- 152	Dionova, Hamburg
Ziege anti-Ratte IgG Alexa Fluor 647	1:100	112-605- 167	
Esel anti-Maus IgG (F(ab)2 Fragment), Cy3	1:100	715-166- 150	
Ziege anti-Hase-IgG biotinyliert	1:500	E0432	DAKO, Hamburg
normal-rabbit-IgG	1:50	#2729	CellSignaling

4.12.3 *Farbstoffe und Fluorophor-konjugierte Substanzen*

Bezeichnung	Katalognummer	Hersteller
DAPI	D1306	Invitrogen™, Life Technologies, Darmstadt
Saures Hämalaun	1 g Hämatoxylin 0,2 g Kaliumiodat 50 g Kaliumaluminiumsulfat 50 g Chloralhydrat 1 g Zitronensäure ad 1 L aqua. dest	

Kapitel 4

4.13 Geräte, Lösungen und Materialien für operative Eingriffe

Bezeichnung	Hersteller
0,9 % NaCl (isotone Natriumchlorid-Lösung zur i.v. Injektion)	B Braun, Melsungen
Bepanthen®, Augen- und Nasensalbe	Bayer, Leverkusen
DOCA-Pellets (<i>21-day release, 50 mg/pellet</i>)	Innovative Research of America, Sarasota, USA
Enthaarungscreme Veet™	Reckitt Benckiser, Heidelberg
Gewebeklebstoff Vetbond Tissue Adhesive,	3M, St. Paul, USA
Isofluran	Isofluran Baxter, Unterschleißheim
Narkosegerät mit Absauganlage	UniVet Porta, Groppler Medizintechnik, Deggendorf
Peristaltikpumpe	Reglo, Ismatec, Glattbrugg, Schweiz
Perma-Hand Seide (6) schwarz geflochten (Nahtmaterial)	Ethicon, Norderstedt
Schmerzmittel Rimadyl® Rind 50 mg/mL (Carprofen)	Pfizer, Karlsruhe
Wunddesinfektion Braunol® Ratiopharm,	B Braun, Melsungen

4.14 Präparationsbesteck

Bezeichnung	Hersteller
Federschere	Fine Science Tools, Heidelberg
feine Pinzetten	
Gefäßklemme	
grobe Pinzetten lange Schere	
grobe Pinzetten	WPI

5 Methoden

5.1 Zellkultur

5.1.1 *Isolation von glatten Gefäßmuskelzellen aus der Nabelschnur*

Die Präparation arterieller glatter Gefäßmuskelzellen aus der Nabelschnur (HUASMC) wurde unter Beachtung der Deklaration von Helsinki (1997) von der Ethikkommission in Heidelberg genehmigt (Aktenzeichen 336/2005). Die Isolation der Zellen wurde unter einer Sicherheitswerkbank durchgeführt, um das Kontaminationsrisiko gering zu halten. Zunächst wurden die Enden um 1-2 cm gekürzt, um beschädigte Bereiche zu entfernen. Danach erfolgte die Präparation der Media der beiden Arterien unter sorgfältiger Entfernung der Adventitia. Anschließend wurden die Arterien auf Knopfkanülen aufgezogen und mit HBSS blutleer gespült. Um die Endothelzellen zu entfernen, wurde die Arterie auf der Kanüle mehrfach vor- und zurückgezogen und nochmals gespült. Um ein Auswachsen der Zellen aus der Nabelschnur zu ermöglichen, wurden die Arterien in einer runden Zellkulturschale (60 mm²) in etwa 1 mm breite Ringe geschnitten und mit einer Schnittseite waagrecht auf den Schalenboden gestellt. Die anschließende Inkubationszeit (30 Min bei 37°C und 5 % CO₂) diente der Adhäsion der Ringe an den Schalenboden. Danach wurden vorsichtig 15 mL Zellkulturmedium (DMEM mit 15 % FCS, Antibiotika und Antimykotika) hinzugegeben. Die Kultivierung der Zellen (Medienwechsel alle 3 Tage) betrug etwa 2 Wochen, bis die glatten Muskelzellen ausgewachsen waren und eine Konfluenz von 70 % aufwiesen. Die ringförmigen Arterien wurden entfernt und HUASMC in eine Zellkulturflasche 75 cm² transferiert.

5.1.2 *Kultivierung und Passagieren von glatten Gefäßmuskelzellen in der Zellkultur*

HUASMC wurden in Zellkulturflaschen (75 cm²) bei 37°C und 5 % CO₂ im Inkubator kultiviert. Das Nährmedium war DMEM-Medium, das 15 % FCS enthält. Auf den Zusatz von Antibiotika und Antimykotika wurde verzichtet. Die Passagierung der Zellen erfolgte maximal bis Passage 4. Der Wechsel des Zellkulturmediums wurde zweimal pro Woche durchgeführt, um ein optimales Zellwachstum zu gewährleisten. Bei einer Konfluenz von 80 % wurden die Zellen passagiert. Zunächst wurde mit Waschmedium gewaschen und mit 2 mL Trypsin/EDTA bei 37°C inkubiert. Nach 2 Min. wurde die Trypsin-Aktivität durch Zugabe von 10 mL des vorgewärmten Zellkulturmediums inhibiert. Mithilfe der

Kapitel 5

Zentrifugation (5 Min., 1000 rpm) wurden die Zellen sedimentiert und der Überstand abgesaugt. Die Zellen wurden in 10 mL Zellkulturmedium resuspendiert und jeweils 3 mL der Zellsuspension in eine neue Zellkulturflasche (75 cm²) gegeben. Für nachfolgende Versuche wurden je 100.000 Zellen pro Lochvertiefung einer 6-Loch-Zellkulturplatte ausgesät und bis zu einer Konfluenz von 70-80 % kultiviert, abhängig von den experimentellen Bedingungen des nachfolgenden Versuches.

5.1.3 Überexpression von NFAT5-Plasmiden

Die Überexpression von Proteinen in HUASMC erfolgte mithilfe der Transfektion von Plasmiden, die kommerziell von der Firma Origene erworben wurden (NFAT5 Isoform A_RC219340; NFAT5 Isoform C_RC216142) bzw. die mithilfe des *Site-directed-Mutagenesis*-Kit (Agilent Technologies, Waldbronn) an einer Aminosäure mutiert wurden. Der folgende Ansatz wurde pro Vertiefung einer 6-Lochplatte angewendet: In eine steriles 1,5 mL-Reaktionsgefäß wurde 200 µl DMEM gegeben und mit 9 µl des Transfektionsreagenz PEI sowie 3 µl des gelösten Plasmids (1 µg/µl) vermischt. Nach einer Inkubationszeit von 15 Min. (RT) wurden jeweils 200 µl des Gemisches tropfenweise zu den Zellen gegeben. Nach einer Transfektionszeit von 5 h bei 37°C und 5 % CO₂ wurde mit DMEM-Medium gewaschen und pro Vertiefung 3 mL Zellkulturmedium hinzugegeben. Nach 24 Stunden konnten die überexprimierten Proteinen nachgewiesen werden oder aber die Zellen für nachfolgende Experimente verwendet werden.

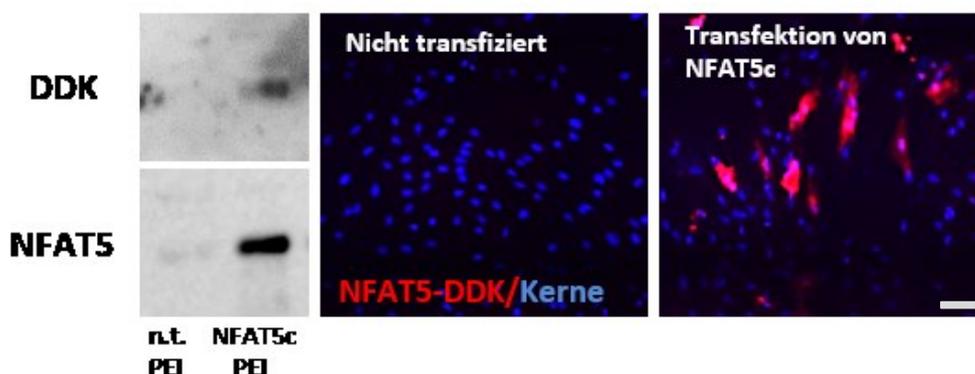


Abb. 6: Darstellung der Überexpression von NFATc in glatten Muskelzellen. 24 h nach der Transfektion mit Plasmid RC216142 (kodiert für NFAT5 Isoform C mit C-terminaler DDK-Sequenz) wurde die Expression der C-terminalen DDK-Sequenz nach Isolation der Proteine mithilfe des Westernblot-Verfahrens bzw. mithilfe der spezifischen Immunfluoreszenzanalyse nachgewiesen. N.t = nicht transfiziert, Maßbalken 100 µm) PEI = Polyethylenimin

5.1.4 Si-RNA vermittelte Inhibition von NFAT5- und κ -Aktin-Transkription

Um die Translation der NFAT5 bzw. ACTBL2- oder c-Abl-mRNA *in vitro* spezifisch zu unterbinden, wurden HUASMC mit siRNA (*small interfering RNA*) behandelt. Dazu wurde die siRNA an magnetische Nanopartikel gebunden. Durch den Einsatz von magnetischen Kräften gelangten die mit siRNA beladenen Nanopartikel in die Zelle. Das Zellkulturmedium wurde zunächst mit 2 mL Optimem-Medium ersetzt. Pro Vertiefung einer 6-Lochplatte wurden 3 μ l Matra-Si, 3 μ g siRNA zu Optimem-Medium (Endvolumen 200 μ l) gegeben und vermischt. Die Inkubationszeit betrug 20 Min., wobei jeweils nach 5 Min. zusätzlich gemischt wurde und das Gemisch anschließend tropfenweise zu den Zellen hinzugegeben. Für den Kontrollansatz wurde anstelle der spezifischen siRNA die unspezifische siScramble-RNA verwendet. Die Zellkulturplatten wurden bei 37°C und 5 % CO₂ für 15 Min. auf eine Magnetplatte gestellt. Danach wurde das Medium entfernt und mit Zellkulturmedium ersetzt. Nach 48 Stunden wurden die Zellen weiterbehandelt.

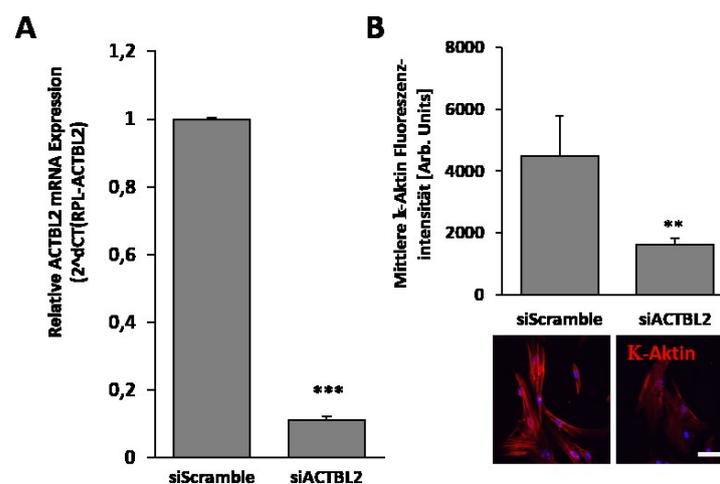


Abb. 7: Darstellung der siRNA-vermittelten Verringerung der ACTBL2-Expression. Die Analyse der relativen RNA-Mengen nach Isolation der RNA erfolgte mithilfe der qPCR für die Genexpression von ACTBL2 (A, *** $p < 0,001$, siScramble vs. siACTBL2, $n=3$). Die Verringerung der Proteineexpression von κ -Aktin nach Behandlung mit ACTBL2-siRNA wurde mithilfe der Immunfluoreszenz bestimmt (B, ** $p < 0,01$ siScramble vs. siACTBL2, Maßbalken 100 μ m, $n=3$).

5.1.5 Biomechanische Dehnung

Bei Bluthochdruck sind Gefäße einer erhöhten Wandspannung ausgesetzt. Um diesen Effekt *in vitro* nachzuahmen, wurden HUASMC auf flexible, mit Kollagen-1 beschichtete Membranen in einer 6-Loch-Zellkulturplatten kultiviert (Flexcell®). Durch Anlegen eines definierten Vakuums können die Zellen einer zyklischen Dehnung ausgesetzt werden.

Kapitel 5

Die Dehnung der Zellen erfolgte bei 13-15 % bei 0.5 Hertz über 24 h mit der FX-5000 Software Version 1.0.

5.1.6 *Live-Cell-Imaging*

Zur Darstellung des migratorischen Verhaltens von HUASMC wurde das *Live-Cell-Imaging* durchgeführt. Dazu wurde das CellSens Olympus (IX-3)-Mikroskop verwendet. Durch die beheizbare Einfassung der Zellkulturplatte kann das Medium der Zellen während des Versuchs konstant auf 37°C eingestellt werden. Dies wird durch einen Meßfühler kontrolliert. Die Zellen wurden mit 5 % CO₂ begast.

5.2 Protein-biochemische Analysen

5.2.1 *Proteinisolation*

Zur Isolation von Proteinen aus HUASMC (Gesamtzelllysat) wurden die Zellen zunächst mit kaltem (4°C) HBSS gewaschen. Zu jeder Vertiefung der 6-Loch-Zellkulturplatte wurde 300µl des Proteinlysepuffers (RIPA-Puffer, der Protease- und Phosphatase-Inhibitoren enthält) hinzugegeben und 15 Min. auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen abgeschabt, in ein 1,5 mL-Reaktionsgefäß überführt, gründlich vermischt und 15 Min. auf Eis inkubiert. Die nachfolgende Zentrifugation (13.000 rpm, 4°C, 15 Min.) diente der Sedimentation zellulärer Bestandteile. Nachfolgend wurde der Überstand in ein neues 1,5 mL-Reaktionsgefäß überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

5.2.2 *Isolation von nukleären und zytosolischen Proteinen*

HUASMC wurden mit eiskaltem HBSS zweimalig gewaschen und jede Vertiefung der 6-Loch-Zellkulturplatte mit 100 µl Lysepuffer 1, der Protease- und Phosphatase-Inhibitoren enthält, versetzt. Die Zellen wurden abgeschabt und in ein 1.5 mL-Reaktionsgefäß überführt. Um die zytosolischen Proteine zu isolieren, wurde mithilfe der Zentrifugation (10.000 rpm, 4°C, 15 Min.) sedimentiert und der Überstand abgenommen. Der pelletierte Rückstand wurde mit 1 mL eiskaltem PBS gewaschen und mit 40 µl Lysepuffer 2 versetzt. Nach zweimaligem Sonifizieren (50 Watt für 5 Sek.) wurde erneut sedimentiert (10.000 rpm, 4°C, 15 Min.) und der Überstand, der die nukleären Proteine enthält, in ein neues 1,5 mL-Reaktionsgefäß überführt. Die Lysate wurden anschließend weiter aufgearbeitet oder bei -80°C gelagert.

5.2.3 *Bradford-Proteinmessung*

Die Bradford-Proteinmessung diente der Bestimmung von Proteinkonzentrationen in Proteinlysaten. Hierbei wurden Proteine mit dem Triphenylmethanfarbstoff Coomassie-Brillant-Blau G-250 komplexiert, dessen Absorptionsmaximum sich nach Bindung der Proteine von 465 nm auf 595 nm verschiebt und photometrisch erfasst werden kann. Vor Beginn der Messung wurde das Bradford-Reagenz 1:5 sowie die Proteinlysate 1:100 mit H₂O verdünnt. Pro Vertiefung einer 96-Loch-Zellkulturplatte wurden 200 µl des verdünnten Bradford-Reagenz zu 80 µl verdünnten Proteinlysats gegeben. BSA-Lösungen in verschiedenen Konzentrationen sowie H₂O (als Nullwert) dienten der Erstellung einer Eichgeraden, die für die anschließende Kalkulation der Proteinkonzentrationen benutzt wurde. Die photometrische Messung erfolgte bei 595 nm.

5.2.4 *Gelelektrophoretische Proteinauftrennung (SDS-PAGE)*

Die diskontinuierliche Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) dient der Auftrennung von Proteinen aufgrund ihres Molekulargewichts. Die eingesetzte Proteinmenge betrug jeweils 20 µg (Einstellung des Proteingehaltes erfolgte mit Lysepuffer; Endvolumen: 20 µl). Zu jeder Probe wurden jeweils 5 µl des reduzierenden Roti-Load-Puffers (BioRad, München) gegeben, gemischt und für 5 Min. bei 95°C auf dem Heizblock inkubiert. Für die optimale Auftrennung von Proteinen mit großem Molekulargewicht wurden Acrylamidgele verwendet, dessen Acrylamidkonzentration im Trenngel bei 7.5 % (v/v) lag. Das Sammelgel enthielt 4 % Acrylamid (v/v). Die Gele wurden in die Western-Blot-Apparatur (BioRad, München) eingespannt und die Kammern mit Laufpuffer gefüllt. Die aufgekochten Proteinlysate sowie der Proteinmarker (Biorad, München) wurden in die vorbereiteten Taschen des Sammelgels aufgetragen. Die Elektrophorese lief bei einer angelegten Spannung von 100 V und anschließend wurden die Proteine aus dem Gel auf eine Nitrozellulosemembran transferiert.

5.2.5 *Nass-Blot-Verfahren*

Um die aufgetrennten Proteine aus der SDS-Gelelektrophorese aus dem Trenngel auf eine Nitrozellulosemembran zu transferieren, wurde das Nass-Blott-Verfahren angewendet. Dazu wurde das Trenngel vom Sammelgel getrennt und zusammen mit der

Kapitel 5

zugeschnittenen Nitrozellulosemembran, Filterpapier und Schwamm in die Wet-Blot-Kammer eingebracht und die Kammer anschließend mit Transferpuffer befüllt. Der Transfer fand bei 350 mV statt (Transferzeit 1.5 h). Die Membran wurde anschließend in ein 50 mL-Röhrchen übertragen. Zur Absättigung von unspezifischen Bindungen wurden 8 mL Blotto-Lösung (5 % Blotto in PBS) in das Röhrchen gegeben und für 1 h auf dem Rollmischer inkubiert. Der Primärantikörper wurde im Anschluss (abhängig von den Herstellerangaben) in PBS oder in Blotto-Lösung verdünnt, in das Röhrchen gegeben und über Nacht auf dem Rollmischer bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde dreimal mit TBST gewaschen, anschließend mit dem verdünnten Sekundärantikörper für 1 h bei RT inkubiert und erneut zweimal gewaschen. Der nachfolgende Waschriff wurde mit PBS durchgeführt. Um die Proteine zu detektieren, wurde ECL-Lösung auf die Membran gegeben, 5 Min. bei RT inkubiert und die Chemilumineszenz anschließend mit dem Image Quant LAS 4000 mini (GE Healthcare, München) aufgenommen. Für die Quantifizierung der Banden wurde das Image J-Programm, Version v1.47v (NIH, Bethesda, USA) verwendet.

5.2.6 2D-Gelelektrophorese

Anhand des isoelektrischen Punktes (IEP) eines Proteins (der IEP gibt den pH-Wert an, bei dem die Nettoladung eines Proteins Null beträgt⁶⁸) können Proteine durch die Methode der isoelektrischen Fokussierung separiert werden. Dazu wurde ein pH-Gradientengel verwendet, in dem sich die Proteine aufgrund ihrer Ladung so weit im elektrischen Feld bewegen, bis ihre Nettoladung ausgeglichen ist. Im Anschluss konnte mithilfe der SDS-Gelelektrophorese nach Proteingröße aufgetrennt werden (2D-Gelelektrophorese).

Erste Dimension: Die Proteinlysate wurden mithilfe der Ethanol-fällung präzipitiert, in 350µl Rehydrierungspuffer, der 6,5 µl DTT (1 M) sowie 1,75 µl IPG-Puffer enthält, resuspendiert und gleichmäßig in den IPGphor-Streifenhalter (Pharmacia Biotech, GE-Healthcare, München) gegeben und verteilt. Der IPG-Gelstreifen (GE-Healthcare, München) wurde mit der Gelseite luftblasenfrei auf das jeweilige Proteinlysate gelegt. Als Verdunstungsschutz wurden 900 µl Mineralöl (Biorad, München) gleichmäßig über den Gelstreifen verteilt. Der IPG-Streifenhalter wurde verschlossen und die Elektrophorese gestartet (IPGphor, Pharmacia Biotech, GE-Healthcare, München) (Tabelle 2).

Tabelle 2: Parameter der ersten Dimension

Schritt	Voltstärke	Zeitdauer
S1 (Rehydrierung)	30 V	12 h
S2	200 V	1 h
S3	500 V	1 h
S4	1000 V	1 h
S5	80000 V Grad.	30 Min.
S6	8000 V	12 h

Anschließend wurden die IPG-Streifenhalter in einer Plastikwanne, die mit gereinigtem Wasser befüllt worden ist, geöffnet, die Gelstreifen vorsichtig mit einer Pinzette entnommen und über Nacht bei -80°C gelagert.

Zweite Dimension: Die Gelstreifen wurden zunächst für 20 Min. bei leichtem Schütteln mit 10 mL Equilibrierungspuffer, der 100 mg DTT enthält, und anschließend mit 10 mL SDS-Equilibrierungspuffer, zu dem 250 mg Iodoacetamid hinzugegeben wurde, inkubiert. Für die Elektrophorese wurden die zuvor vorbereiteten Acrylamidgele (12.5 % (v/v) Acrylamid) in die Elektrophoresekammer eingebaut und die Gelstreifen waagegerecht und luftblasenfrei auf den Gelrand gelegt. 10 µl des Proteinmarkers wurden auf ein Filterpapier (0,5 cm breit) gegeben und in linke Seite der Kammer zwischen Gelstreifen und Glasrand gebracht. 2 mL aufgewärmte Agarose (2,5 % (m/v)), die Bromphenolblau enthält, wurde zur Fixierung vorsichtig über das Gel gegossen. Die Elektrophorese verlief zunächst mit 500 V bei 30 mA und 150 W für 30 Min. und anschließend bei 500 V mit 150 mA und 150 W. Die Elektrophorese wurde gestoppt, sobald sich die Lauffront am unteren Gelrand befand. Das Acrylamidgel wurde aus der Elektrophoresekammer genommen, in die WetBlot-Apparatur zwischen zwei Schwämmen, zwei Lagen Filterpapier und Nitrozellulosemembran eingespannt und die Apparatur mit Transferpuffer befüllt. Die Proteine wurden über 1,5 h bei 1450 mA auf die Nitrocellulosemembran transferiert.

Kapitel 5

5.2.7 Chromatin-Immunopräzipitation (CHIP)

Um die Bindung von NFAT5 an die Promoterregion von Tenascin C zu untersuchen, wurde eine Chromatin-Immunopräzipitation durchgeführt. Die Zellen wurden mit kaltem HBSS gewaschen und pro Vertiefung einer 6-Lochplatte wurde zunächst 1,5 mL Formaldehyd-PBS hinzugegeben, bei RT für 15 Min. inkubiert und danach 215 µl Glycinlösung (1 M) dazugeben und bei RT 20 Min. inkubiert. Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und mithilfe eines Zellschabers nach Zugabe von 200 µl PBS abgeschabt. Um genug Material für die nachfolgende Immunpräzipitation zu erhalten, wurden alle Zellen, die unter den gleichen Bedingungen behandelt worden sind, in ein 1,5 mL-Reaktionsgefäß zusammengeführt. Die Zellen wurden mithilfe der Zentrifugation sedimentiert (5000 rpm, 5 Min., 4°C) und der Überstand verworfen. Das Sediment wurde in 500 µl SDS-Lyse-Puffer, der Proteaseinhibitoren enthält, resuspendiert. Die nachfolgende Sonifizierung erfolgte viermalig für 15 Sekunden. Im Anschluss wurden Rückstände mithilfe der Zentrifugation sedimentiert (13.000 rpm, 5 Min., 4°C) und der Überstand in ein 1,5 mL-Reaktionsgefäß überführt. Für die anschließende Immunpräzipitation wurden 200 µl des Gesamtzelllysats entnommen, in ein 1,5 mL-Reaktionsgefäß überführt, mit 500 µl des CHIP-Lösungspuffers, der Proteaseinhibitoren enthält, vermischt und 20 µl des NFAT5-Primärantikörpers (Santa Cruz, Heidelberg) bzw. 4 µl des normal-rabbit-igG-Antikörpers (Antikörperkontrolle) hinzugegeben und über Nacht bei 4°C auf einem Drehrad inkubiert. 40 µl der Magnetic Dynal Protein G-Beads, die für die Immunpräzipitation verwendet wurden, wurden zunächst mit Heringssperma-DNA (10 mg/mL) für 1,5 h auf dem Drehrad blockiert. Im Anschluss wurden sie gewaschen, sedimentiert und die vorbereiteten Proben hinzugegeben. Nach einer Inkubation von 3 h bei 4°C auf dem Drehrad wurden die Proben auf den Magnet-Ständer gestellt. 50 µl des Überstandes wurden in ein 1,5 mL-Reaktionsgefäß gegeben (Input-Kontrolle). Die Beads wurden gewaschen, 250 µl Elutionspuffer hinzugegeben und gemischt. Nach einer Inkubation von 15 Min. bei RT auf dem Drehrad wird der Überstand in ein neues 1,5 mL-Reaktionsgefäß überführt. Zu jedem Ansatz wurde 50 µl des Elutionspuffer hinzugegeben und das Eluat mit 51 µl *Decross-Linking*-Lösung versetzt und bei 65°C für 2 h auf dem Heizblock inkubiert. Zu 50 µl der Input-Kontrolle wurde 10 µl *Decross-Linking*-Lösung hinzugegeben und ebenfalls bei 65°C für 1 h inkubiert. Die DNA wurde mithilfe der Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Extraktion isoliert. Jeder

Ansatz wurde mit 1 mL Ethanol (100 %), 100 µl Ammoniumacetat (7,5 M) sowie 4 µl Glyo-Blue (15 mg/ml) versetzt. Die Proben wurden mindestens 30 Min. bei -80°C gelagert. Das Pellet wurde mit 0,8 mL Ethanol (100 %) gewaschen, sedimentiert (13.000 rpm, 10 Min., 4°C), der Überstand entfernt und in 30 µl TE-Puffer resuspendiert. Die DNA wurde bei -20°C gelagert.

Die Primer für die anschließende semiquantitative PCR wurden so gewählt, dass sie im Bereich der NFAT5-Bindungsstelle im *TNC*-Promoter binden können (NFAT5-Bindestelle Nr.1, Position 819 bis 837). Um eine unspezifische Präzipitation auszuschließen, wurden Antikörperkontrollen (IgG-Kontrolle) mitgeführt, sowie Proben, bei denen kein Antikörper im Immunpräzipitationsschritt zugesetzt wurde (NAC). Unterstützt wurde die Durchführung dieser Arbeiten von PD Dr. Andreas H. Wagner aus unserem Institut.

5.2.8 *Click-Reaktion*

Palmitoylierte Proteine können *in vitro* mithilfe der sogenannten „CLICK-Reaktion“ identifiziert werden. Um palmitoylierte Proteine *in vitro* zu markieren, bedarf es zunächst einer Kultivierung der Zellen in DMEM-Medium, das 7,5 % Fettsäure-freies BSA enthält (mind. 24 h vor Versuchsbeginn). Zu den Zellen wurde das Palmitinsäure-Analogon 17-Octadecansäure (25 µm/L) hinzugegeben (bzw. DMSO als Kontrolle) und 1 h bei 37°C inkubiert. Im Anschluss erfolgt die Dehnung der Zellen (15 % Elogation, 24 h). Unter statischen Bedingungen kultivierte Zellen wurden als Kontrolle mitgeführt. Anschließend wurden die Zellen mit 4°C-kaltem HBSS gewaschen, die zytosolischen und die Kernproteine isoliert und die Zelllysate bei -80°C eingefroren. Am nächsten Tag wurde eine doppelte Chloroform-Methanol-Extraktion durchgeführt, der getrocknete Rückstand in 300 µl Lysepuffer (PBS+ 1 % SDS+ Proteininhibitoren, PMSF) resuspendiert und in lichtundurchsichtige 1,5 mL-Reaktionsgefäße überführt. Die folgenden Lösungen wurden jeweils hinzugegeben: 2 µl Biotinazid (100 µM), 2 µl TCEP (1 mM), 2 µl TBTA (100 µM) und 2 µl CuSO₄ (1 mM) und es wurde anschließend 1 h auf dem Rollmischer in einem dunklen Raum gemischt, gefolgt von einem doppelten Chloroform-Methanol-Aufreinigungsschritt. Der erhaltene Rückstand wurde in 150 µl Lysepuffer resuspendiert, jeweils 30 µl von gewaschenem Streptavidin-Agarose-Granulat (ThermoFisher, Darmstadt) hinzugegeben und für 1,5 h. auf dem Rollmischer gemischt. Das Granulat wurde zweimal mit Lysepuffer und zweimal mit PBS gewaschen. Der Überstand wurde

Kapitel 5

dabei verworfen. Im Anschluss wurde zu dem Granulat zu jeweils 25 µl Ladepuffer gegeben und bei 95°C für 7 Min. auf dem Heizblock aufgeköcht. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 mL-Reaktionsgefäß überführt und bei 4°C über Nacht gelagert. Die Separation mittels Gelelektrophorese erfolgte in einem 7.5 % Acylamid-Gel (v/v).

5.3 Molekularbiologische Methoden

5.3.1 *Isolation von mRNA*

Für die Isolation von mRNA von HUASMC wurde das PeqGold-Isolationsset (Peqlab, Erlangen) verwendet. Es wurden zu jeder Vertiefung einer 6-Lochplatte 400 µl Lysepuffer hinzugegeben. Die Isolation und Aufreinigung erfolgte nach den Anweisungen des Herstellers. Die RNA wurde im letzten Aufreinigungsschritt in 30 µl RNase-freien Wasser von der Säule eluiert. Die Bestimmung der Menge und Qualität erfolgte durch die Messung am Nanodrop-Spektrophotometer.

5.3.2 *cDNA-Synthese*

Die cDNA-Synthese wurde mithilfe reverser Transkription durchgeführt. Dazu wurde das Omniscript RT Kit (Quiagen, Hilden) verwendet.

Tabelle 3: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für die cDNA-Synthese

Reagenz	Volumen
10 x Reaktionspuffer	2 µl
dNTP-Mix (5 mM je dNTP)	2 µl
Oligo-dT-Primer (10 µM)	1 µl
Reverse Transkriptase	1 µl
RNA	X
RNAse-freies Wasser	14-X
	Endvolumen 20 µl

Die Menge der eingesetzten RNA lag dabei zwischen 50 ng und 250 ng. Der Reaktionsansatz wurde – wie in Tabelle 3 angegeben - vorbereitet und in einem 1,5 mL-Reaktionsgefäß bei 37°C für 1 h in einem Heizblock inkubiert.

5.3.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Das Verfahren der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) dient der Analyse der Genexpression *in vitro*. Als Ausgangssubstanz für die konventionelle PCR wurde synthetisierte cDNA verwendet. Die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes findet sich in Tabelle 4; die Reaktionsbedingungen in Tabelle 5.

Um die PCR-Produkte im Anschluss zu analysieren, wurden zu jedem PCR-Reaktionsgefäß 6 x DNA-Probenpuffer im Verhältnis 1:6 hinzugeben und 20 µl des Gemisches auf ein 1,5 %iges Agarosegel, das 0.004 % Ethidiumbromid (v/v) enthält, aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei 100 V für 45 Min. Die Detektion der Banden erfolgte mit dem Gel Doc XR-Systems und der Quantity One Software (Version 4.6.8, Biorad, München).

Tabelle 4: Reaktionsansatz für die semiquantitative PCR

Reagenz	Menge
10 X Puffer	2 µl
dNTPs 10 nM	0,6 µl
MgCl ₂ 100 mM	0,32 µl
Primer forward	0,4 µl
Primer reverse	0,4 µl
Wasser	14,2 µl
Taq-Polymerase 5 U/µl	0,08 µl
cDNA (1:5-Verdünnung)	2 µl
	Endvolumen 20 µl

Für die Expressionsanalyse von *ACTBL2* wurde die Methode der quantitativen Echt-Zeit-PCR verwendet. Bei diesem Verfahren erfolgt die Quantifizierung am Ende jedes zyklischen Amplifikationsschrittes der cDNA. Verwendet wurde hierbei der DNA-Interkalator SYBR Green I. Die Einlagerung in die DNA nimmt proportional mit der Menge der PCR-Produkte zu und kann über die Detektion des Fluoreszenzsignals detektiert werden. Der Reaktionsansatz ist in Tabelle 6 angegeben. Der LightCycler® 480 SYBR Green I Master Mix (Roche, Mannheim) enthält neben dem Farbstoff SYBR-Green

Kapitel 5

bereits die FastStart *Taq*-Polymerase sowie die benötigten Nukleotide in einem entsprechenden Reaktionspuffer. Die Durchführung der Echtzeit-PCR wurde mithilfe des Light Cycler 1.5 (Roche, Mannheim) und der Light Cycler Software (Version 3.5.17) durchgeführt (Tabelle 7). Als Referenzgen wurde *RPL32* verwendet.

Tabelle 5: Reaktionsbedingungen für die konventionelle PCR

Zyklen	Vorgang	Temperatur	Zeitdauer
	Initiale Denaturierung	95°C	2 Min.
variabel	Denaturierung	95°C	30 Sek.
	Primer-Annealing	variabel	30 Sek.
	Elongation	72°C	2 Min.
	Abkühlung	4°C	

Tabelle 6: Reaktionsansatz für die quantitative Echtzeit-PCR

Reagenz	Menge
SYBR Green I-Mix	10 µl
Primer forward	1 µl
Primer reverse	1 µl
RNAse-freies Wasser	3 µl
cDNA	5 µl
	Endvolumen 20 µl

Für die anschließende Berechnung der relativen Genexpression wurde der ΔCt -Wert gebildet. Dabei wurde der Ct-Wert des Zielgens von dem Ct-Wert des Referenzgens abgezogen (ΔCt). Der Ct-Wert beschreibt dabei den „Cycle Threshold“, ab dem die detektierte Fluoreszenz einen definierten Schwellenwert übersteigt. Je kleiner der Ct-Wert dabei ist, desto höher ist die Menge des synthetisierten PCR-Produkts. Im Anschluss wurde der $2^{-\Delta Ct}$ -Wert gebildet, um die n-fache Expression bestimmen zu können⁶⁹.

Tabelle 7: Reaktionsbedingungen für die quantitative Echtzeit-PCR

Zyklen	Vorgang	Temperatur	Zeitdauer	Temperaturänderung in °C/s
	Initiale Denaturierung	95°C	15 Min.	20
40 x	Quantifizierung	95°C	15 s	
	Annealing der Primer	Variabel	30 s	
	Elongation	72°C	30 s	
	Finale Denaturierung	95°C 60°C 95°C	0 s 10 s 0 s	20 s 1 0,2
	Finale Extension	72°C	10 Min.	

5.3.4 Genotypisierung der SMC-NFAT5^{fl/fl}-Mäuse

Die genomische DNA für die Genotypisierung wurde aus Schwanzspitzenbiopsien isoliert. Dazu wurde eine ca. 5 mm lange Schwanzspitze in ein 1,5 mL-Reaktionsgefäß gegeben. Es wurde zu jedem Reaktionsgefäß 150 µl Lysepuffer sowie 1 µl Proteinase K (20 mg/mL) gegeben. Der Aufschluss und der Verdau des Gewebes erfolgte über Nacht bei 55°C auf dem Heizblock bei leichtem Schütteln (400 rpm). Am nächsten Tag wurde zunächst die Proteinase K-Aktivität inaktiviert, indem die Proben im Heizblock erhitzt wurden (20 Min., 95°C). Mithilfe der Zentrifugation wurde bei 1000 rpm sedimentiert und etwa 130 µl des Überstandes in ein neues 1,5 mL-Reaktionsgefäß überführt. Mäuse der SMC-NFAT5^{fl/fl}-Linie, bei denen der *knockout* durch Tamoxifenbehandlung (als Aktivator der Cre-Rekombinase) induziert werden soll, müssen die Cre-Rekombinase exprimieren. Der glatte Muskelzell-spezifische Einbau der Cre-Rekombinase erfolgte unter dem SM-MHC-Promoter. Zusätzlich muss das NFAT5-Gen von loxP-Stellen flankiert sein, wodurch die aktivierte Rekombinase gezielt das sogenannte „geflochte“ Gen aus dem Genom ausschneiden kann. Der Nachweis über den Einbau der Cre-

Kapitel 5

Rekombinase sowie der loxP-Stellen im Genom erfolgte jeweils über eine Standard PCR (Tabelle 8). Die Reaktionsbedingungen sind dabei in Tabelle 9 und Tabelle 10 aufgelistet.

Tabelle 8: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für die konventionelle PCR

Reagenz	Volumen
H ₂ O	34 µl
10 X Reaktionspuffer	5 µl
MgCl ₂	1 µl
dNTP	0,4 µl
Primer 1	2 µl
Primer 2	2 µl
(Primer 3 bei SM-MHC)	(2 µl)
Tag-Polymerase	0,2 µl
DNA	1 µl
Gesamtvolumen	
NFAT5-flx	45,6 µl
SM-MHC	47,6 µl

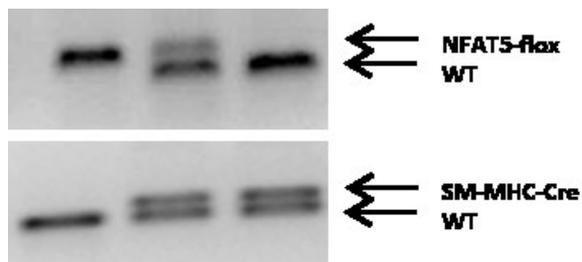


Abb. 8: Überprüfung des Genotyps der NFAT5^{fl/fl}-Mäuse. Die PCR-basierte Genotypisierung diente der Verifizierung des Einbaus der LoxP-Sequenzen in die genomische DNA, die die NFAT5-Sequenz flankieren, sowie des Einbaus der Cre-Rekombinase unter dem SM-MHC-Promoter. Es wurden nur Tiere mit dem Genotyp NFAT5^{fl/fl}-SM-MHC-Cre^{+/-} für weiteres tierexperimentelles Arbeiten verwendet.

Tabelle 9: Reaktionsbedingungen für die konventionelle PCR für NFAT5-flx

Zyklen	Vorgang	Temperatur	Zeitdauer
	Initiale Denaturierung	95°C	10 Min.
30	Denaturierung	95°C	30 Sek.
	Primer-Annealing	59°C	30 Sek.
	Elongation	72°C	2 Min.
	Finale Extension	72°C	10 Min.

Tabelle 10: Reaktionsbedingungen für die konventionelle PCR für SM-MHC-Cre

Zyklen	Vorgang	Temperatur	Zeitdauer
	Initiale Denaturierung	95°C	10 Min.
30	Denaturierung	95°C	45 Sek.
	Primer-Annealing	58°C	45 Sek.
	Elongation	72°C	2 Min.
	Finale Extension	72°C	10 Min.

5.3.5 Transformation von Plasmiden

Die kommerziell erworbenen Plasmide (RC216142_NFAT5 Isoform C und RC219340_NFAT5 Isoform A) wurden in H₂O gelöst (finale Konzentration: 75-100 µg/µl). 100 µl kompetenter Bakterien (DH5α) wurden auf Eis aufgetaut. Anschließend wurde 1 µl des verdünnten Plasmids in das Reaktionsgefäß gegeben und für 30 Min. auf Eis inkubiert. Danach wurde bei 42°C für 2 Min. auf einem Heizblock inkubiert (Hitzeschock). Zu dem Reaktionsgefäß wurde 250 µl des LB-Nährmediums hinzugegeben und der Ansatz für 1 h bei 350 rpm bei 37°C im Inkubator geschüttelt. Danach wurden die Bakterien auf einer Agarplatte ausgestrichen, die das Selektiv-Antibiotikum Kanamycin enthielten. Für 16-18 h wurden die Agarplatten im Inkubator bei 37°C inkubiert, um das optimale Wachstum der Bakterien zu erlauben.

5.3.6 Überexpression von Plasmiden

Mit einer Pipettenspitze wurden jeweils 10 Klone von einer Agarplatte gepickt, die Kanamycin in einer Konzentration von 25 µg/mL enthielt. Jeder Klon wurde in ein 14 mL-Röhrchen mit 1,5 mL Kanamycin-haltigem LB-Medium gegeben und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Aus der Übernachtskultur wurde 1 mL entnommen und in ein 1,5 mL-Reaktionsgefäß überführt. Nach Zentrifugation (13.000 rpm, 3 Min.) wurde der Überstand vollständig abgenommen. Die sedimentierten Bakterien wurden in 150 µl Prä-Lyse-Puffer resuspendiert, mit 300 µl Natriumhydroxidlösung (0,2 M), die 1 % SDS enthielt, versetzt und gemischt. Nach einer Inkubationszeit von 5 Min. auf Eis wurden 225 µl einer 3 M Kaliumacetat-Essigsäure-Lösung zu dem Gemisch gegeben. Es wurde gemischt und 15 Min. auf Eis inkubiert. Nach der Zentrifugation (13.000 rpm; 3 Min.)

Kapitel 5

wurde der Überstand abgenommen, in ein neues 1,5 mL-Reaktionsgefäß überführt und mit 400 µl 2-Propanol versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 5 Min. bei RT wurde erneut mithilfe der Zentrifugation sedimentiert (13.000 rpm, 3 Min.). Der erhaltene Überstand wurde abgenommen und der Rückstand mit 150 µl Ethanol (70 % (v/v)) gewaschen, das Pellet für 5 Min. bei 37°C getrocknet und anschließend in 30 µl aqua dest. gelöst.

5.3.7 Endotoxin-freie Aufarbeitung von Bakterienkulturen

Um Plasmide für die Transfektion in HUAMSC nutzen zu können, müssen sie endotoxinfrei sein. Dazu wurde das DNA-Aufreinigungsset von Machery-Nagel nach Protokoll verwendet. Das Ausgangsvolumen war dabei eine Bakterien-Übernachtskultur mit 300 mL LB-Medium, das mit dem jeweiligen DNA-Plasmid transformierte XL-10 ultrakompetente Zellen enthält. Die erhaltene aufgereinigte DNA-Plasmidmenge wurde jeweils auf 1 µg/µl mit gereinigtem, endotoxinfreiem Wasser eingestellt.

5.3.8 Mutation von spezifischen Sequenzen der Plasmide

Die Sequenz der Oligonukleotidprimer für die Mutagenese wurde mit Hilfe des Primer-Design-Programms von Agilent Technologies (online verfügbar) kalkuliert. Das Protokoll für die Mutagenese wurde nach Herstellerangaben in einem 0,5 mL-Reaktionsgefäß durchgeführt (Tabelle 11). Die Parameter für die Polymerase-Kettenreaktion befinden sich in Tabelle 12.

Tabelle 11: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für die gerichtete Mutagenese-PCR

Reagenz	Menge
Oligonukleotidprimer forward	125 ng
Oligonukleotidprimer reverse	125 ng
Plasmid-DNA	10 ng
10 x Reaktionspuffer	5 µl
dNTP-Lösung	1 µl
Quick-Solution	3 µl
Gereinigtes Wasser	Ad 50 µl
PfuUltra HF DNA polymerase (2,5 U/µl)	1 µl

Tabelle 12: Reaktionsbedingungen für die gerichtete Mutagenese-PCR

Segment	Zyklen	Temperatur	Zeitdauer
1	1	95°C	60 s
2	18	95°C	50 s
		60°C	50 s
		68°C	9,5 Min.
		68°C	7 Min.

5.4 Bioinformatische Analysen

5.4.1 *In silico*-Promoteranalyse

Die *in-silico*-Promoteranalyse diente der Untersuchung der Promotersequenz des humanen *ACTBL2* Gens (Homo sapiens *ACTBL2*, Zugang NG_029637, Position 28727 bis 32239) um die Anzahl an möglichen Bindestellen von NFAT5 zu ermitteln. Dabei wurden die 3202 Basenpaare oberhalb des Transkriptionsstartpunktes des *ACTBL2*-Promoters mit der MatInspector Software (Genomatrix Software, München) untersucht. Das Programm verglich die Basensequenzen des *ACTBL2*-Promoters mit möglichen DNA-Bindestellen des NFAT5-Proteins. Stimmt beide Sequenzen 100 %ig überein, so würde der maximale Wert von 1 (Core sim = Core similarity) erreicht. Lag die berechnete Übereinstimmung der analysierten Sequenzen (Matrix sim.) bei einem Wert >0,80, so wurde diese Übereinstimmung als mögliche Bindestelle des Transkriptionsfaktors an die Promoterregion des Zielgens erachtet. Unterstützt wurde die Durchführung von PD Dr. Andreas H. Wagner aus unserem Institut.

5.5 Immunfluoreszenz-basierte Analysen

5.5.1 *Fixierung von murinem Gewebe*

Um murines Gewebe noch im Tier zu fixieren, wurde das Kreislaufsystem der Tiere mit Zink-Fixierlösung perfundiert. Nach Tötung der Tiere (CO₂-Narkose/Genickbruch) wurde der Brustkorb der Tiere unterhalb des Sternums geöffnet und der Brustkorb vorsichtig durch laterales Einschneiden entfernt. Anschließend wurde mit einer feinen Schere in das rechte Herzohr geschnitten und in den linken Ventrikel eine Flügelkanüle eingeführt. Durch eine Peristaltikpumpe wurde zunächst 10 mL vorgewärmte Ringer-

Kapitel 5

Perfusionslösung, die die vasodilatierenden Substanzen Adenosin und Natriumprussid enthält, durch das Herzkreislaufsystem geleitet, um das Blut über die Öffnung des rechten Herzhohls auszuspülen. Im Anschluss erfolgte die Perfusion mit 10 mL zinkhaltiger Fixierlösung. Die Gewebe wurden entnommen und über Nacht bei 4°C in Zink-Fixierlösung aufbewahrt.

5.5.2 *Einbettung*

Die entnommenen Gewebe wurden aus der Zink-Fixierlösung genommen, kurz mit Wasser abgespült, in Einbettkassetten überführt und über eine aufsteigende Alkoholreihe (70 % Ethanol (v/v), 85 % Ethanol (v/v), 96% Ethanol (v/v), Isopropanol) dehydriert. Jeder Entwässerungsschritt der Alkoholreihe betrug 2 h, bei der Inkubation in Isopropanol wurde die Zeit auf 1,5 h reduziert. Die Einbettkassetten wurden aus dem Isopropanolbad geholt, kurz abgetropft und für 16-18 h in flüssiges Paraffin (65°C) gelegt. Am nächsten Tag wurde das Gewebe aus den Einbettkassetten entnommen und in Paraffin-befüllten metallischen Einbettformen in die gewünschte Position gebracht. Danach wurden die Einbettförmchen auf eine Kühlplatte gestellt (Verfestigung des Paraffins).

5.5.3 *Anfertigung von Gewebeschnitten*

Von Gewebe, das in Paraffin eingebettet wurde, wurden am Mikrotom Schnitte (5 µm) angefertigt. Die Schnitte wurden mithilfe eines feinen Haarpinsels im Wasserbad (42°C) auf einen Objektträger aufgebracht. Die Schnitte wurden anschließend bei 42°C über Nacht getrocknet.

5.5.4 *Immunfluoreszenzfärbung*

Zunächst wurden die angefertigten Querschnitte mittels der absteigenden Alkoholreihe (jeweils 5 Min. Xylol, Xylol, 96 % Ethanol (v/v), 85 % Ethanol (v/v), 70 % Ethanol (v/v), H₂O) zunächst deparaffiniert. Die Inkubation mit Casein-Blockierlösung (50 mM Tris, 0,25 % Casein, 0,1 % BSA, 15 mM Natriumazid, ad 20 mL aqua dest.) erfolgte für 1 h bei RT und nachfolgend die Inkubation mit dem verdünnten Primärantikörper bei 4°C über Nacht. Am nächsten Tag wurde dreimal mit TBST gewaschen, 1 h mit dem verdünnten Sekundärantikörper bei RT inkubiert und anschließend zweimalig mit TBST und einmal

mit PBS gewaschen. Die Zellkernfärbung erfolgte mit DAPI für 7 Min. bei RT. Nach einem erneuten Waschschrift mit PBS wurde mit Mowiol eingedeckelt.

5.5.5 *NFAT5-Immunhistochemie*

Für die Detektion von NFAT5 in Lungengewebe ist eine proteolytische Vorbehandlung der Schnitte nach dem Deparaffinierungsschritt notwendig. Diese erfolgte mit Proteinase K (50 µg/mL in PBS) für 18 Min. bei 50°C im Trockenschrank. Die Schnitte wurden mit TBST zweifach gewaschen und unspezifische Bindungen mit Casein-Blockierlösung blockiert (1h, RT). Über Nacht wurde mit dem Primärantikörper gegen NFAT5 (ab3446, 1:50 in Blockierlösung) bei 4°C inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit TBST wurden die Schnitte mit 3% iger Wasserstoffperoxidlösung blockiert (10 Min.) und nach erneutem Waschen mit dem Sekundärantikörper (gt-a-rb-bionityliert, DAKO, 1:500 in Blockierlösung) für 1 h inkubiert, und nachfolgend mit Streptavidin-HRP-Lösung (1:500 in Blockierlösung) für 30 Min. bei RT inkubiert. Es wurde 2 Min. mit gereinigtem Wasser gewaschen und DAB (3,3'-Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid) als Peroxidase-Substrat für 1 Min. auf die Schnitte gegeben. Die Kernfärbung wurde mit dem Farbstoff Hämalaun durchgeführt, indem die Schnitte für 1 Min. mit Hämalaunlösung behandelt wurden und danach für 5 Min. unter fließendem Wasser gespült wurden. Die Rehydrierung der Schnitte erfolgte über eine absteigende Alkoholreihe (1 Min. 70 % Ethanol (v/v), 2 Min. 96 % Ethanol (v/v), zweimalig 5 Min. Xylol) und Versiegelung mit Eukitt.

5.5.6 *Immunzytofluoreszenz*

HUASMC wurden gewaschen, das Waschmedium abgesaugt und in jede Vertiefung der 6-Loch-Zellkulturplatte 1 mL eiskaltes Methanol (Fixierung der Zellen) hinzugegeben. Die Inkubationszeit betrug 15 Min. bei 4°C. Anschließend wurde das Methanol entfernt. Nach 20 Min. bei RT wurde der zu färbende Bereich mit einem wasserabweisenden Stift umrahmt und für 30 Min. mit Casein-Blockierlösung versetzt (Reduktion unspezifischer Bindungen). Die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte für 2 h bei RT. Nach dreimaligem Waschen (mit TBST) erfolgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper (1 h, RT). Nachfolgend wurde zweimal mit TBST und einmal mit PBS gewaschen und die Zellkerne mit DAPI (1:5000 in PBS) gefärbt. Es wurde mit Mowiol versiegelt.

Kapitel 5

5.5.7 Automatisierte Immunfluoreszenzaufnahmen (TissueGnostic)

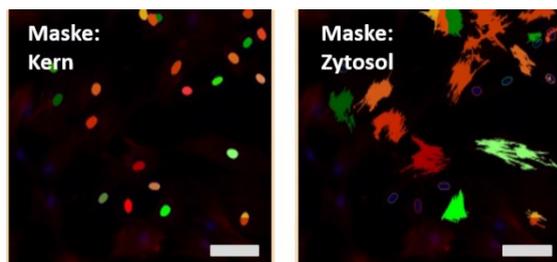


Abb. 9: Darstellung der Zellmasken zur automatisierten Auswertung mithilfe der TissueQuest-Software. Die Kernmaske beruht auf der Erkennung der Zellkerne nach DAPI-Färbung. Die zytosolische Maske wird anhand automatisierter Wachstumsschritte mit Zellgrenzenerkennung definiert. Maßbalken = 100 μ m

Für die automatisierte Aufnahme von Immunfluoreszenzfärbungen wurde das TissueFAXS-Programm (Version 4.2, Tissue Gnostics, Wien, Österreich) verwendet.

Mithilfe der TissueQuest-Software Version 4.0 war es anschließend möglich, die spezifische Immunfluoreszenz des angefärbten Proteins im Zellkern und im Zytoplasma zu unterscheiden und getrennt

zu analysieren. Dies geschah durch Anlegen von definierten Zellmasken. Die DAPI-Kernfärbung diente dabei der Identifizierung der Zellkerne für die Analyse von Kernproteinen („Kernmaske“). Zellgrenzen konnten mit der Software erkannt werden und ermöglichte die Analyse der zytoplasmatischen Immunfluoreszenz („Zytosolische Maske“)(Abb. 9).

5.6 In vivo-Tiermodelle

Alle tierexperimentellen Untersuchungen, die im Rahmen dieser Doktorarbeit durchgeführt wurden, wurden durch das Regierungspräsidium Karlsruhe genehmigt (Kennzeichnung 35-9185.81/G-124/14).

5.6.1 Nutzung von induzierbaren SMC-NFAT5^{-/-}-Mäusen

Für die Analyse der funktionellen Bedeutung von NFAT5 *in vivo* wurden induzierbare, glatte Muskelzell-spezifische NFAT5^{-/-}-Mäusen genutzt. Aus Kreuzung von NFAT5^{fl/fl}-Mäusen (zur Verfügung gestellt von Wolfgang Neuhofner aus Mannheim) mit SM-MHC-Cre^{+/-}-Mäusen (zur Verfügung gestellt von Stefan Offermanns, Bad Nauheim) ging die Mauslinie NFAT5^{fl/fl}-SM-MHC-Cre^{+/-} hervor.

Im Alter von 12-15 Wochen wurden die männlichen Tiere mit Tamoxifen (1 mg/Tag in Miglyol[®] 812 (Caesar & Loretz GmbH, Hilden), subkutane Injektion an fünf aneinander folgenden Tagen) behandelt. Dies diente der Aktivierung der Cre-Rekombinase, die die genomische loxP-flankierte NFAT5-Sequenz der glatten Muskelzellen herausschneidet. Nach 2 Wochen wurde der Verlust von NFAT5 in glattmuskulären Zellen (SMC-NFAT5^{-/-})

nachgewiesen oder die Tiere für weitere Untersuchungen verwendet. Die Kontrolltiere wurden mit Miglyol behandelt, das als Lösungsmittel für Tamoxifen genommen wurde (SMC-NFAT5^{fl/fl}-Mäuse).

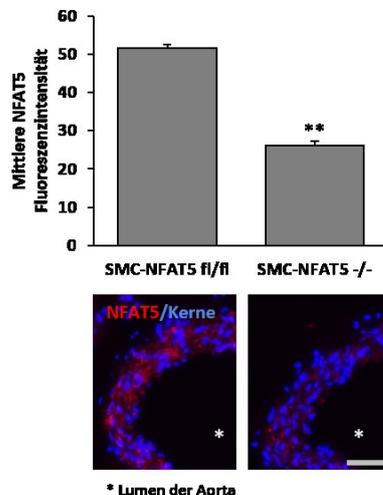


Abb. 10: **Validierung des knockdowns von NFAT5 in SMC-NFAT5^{-/-}-Mäusen nach Tamoxifenbehandlung.** 14 Tage nach Injektion von Tamoxifen wurden das Gefäßsystem der Tiere postmortem mit Zink-Fixierungslösung perfundiert, die Aorten entnommen und in Paraffin eingebettet. Der immunhistologische Nachweis von NFAT5 wurde mit dem Antikörper rb-anti-NFAT5-Antikörper (ab3446, abcam, UK) durchgeführt. Die Immunfluoreszenzaufnahmen wurden nachfolgend mithilfe der Cell^D-Software quantifiziert (*p<0,01, SMC-NFAT5^{fl/fl} vs. SMC-NFAT5^{-/-}, n=4)

5.6.2 DOCA-Salz-Hypertonie-Modell

Um den Einfluss von NFAT5 auf die Entstehung des arteriellen Blutdrucks *in vivo* zu studieren, wurde das DOCA/Salz-Modell verwendet. Dieses basiert auf der subkutanen Implantation von Desoxykortikosteronazetat (DOCA)-Pellets (Innovative Research of America, Sarasota, USA) und zusätzlicher Gabe von Natriumchlorid-haltigem Trinkwasser (1 % NaCl). Desoxykortikosteronazetat wirkt als Aldosteronanalagon über die Bindung an Mineralkortikoidrezeptoren und führt zu einer vermehrten Rückresorption von Natriumionen und Wasser distalen Konvolut bzw. Sammelrohr der Nierentubuli. Dies resultiert in einer Erhöhung des zirkulierenden Blutvolumens und nachfolgend in einer Erhöhung des diastolischen und systolischen Blutdrucks. Man spricht dabei von einem Volumen-induzierten Bluthochdruck⁷⁰. Zudem führt die erhöhte Natriumkonzentration zu einer verstärkten Aktivität von Vasopressin, das über V2-Rezeptoren den Einbau von Aquaporinen im Sammelrohr induziert und somit zusätzlich die Volumenerhöhung des Blutes fördert⁷¹.

Die Implantation der DOCA-Pellets erfolgte unter Isoflurannarkose. Zunächst wurde die Haut im Nacken der Tiere enthaart, anschließend rechts von der Halswirbelsäure ein vertikaler Schnitt gesetzt (ca. 0,5 cm lang) und eine mithilfe einer abgerundeten breiten Pinzette vorsichtig eine subkutane Tasche geformt, die bis zur linken Halsseite reichte.

Kapitel 5

Für ein leichteres Einführen in die Hauttasche wurde die raue Oberfläche des Pellets zunächst mit Glycerin benetzt, anschließend vollständig in die Hauttasche geschoben und die Wunde zugenäht. Das Trinkwasser der Tiere wurde durch eine Natriumchloridlösung (1 % (w/v)) ersetzt. In den folgenden 10 Tagen wurde die Wundnaht der Tiere täglich überprüft und der Käfig dreimal pro Woche gereinigt. Am Tag 10 nach Implantation wurden die Mäuse getötet (CO₂-Narkose/Genickbruch), das Gefäßsystem zunächst mit Ringerlösung und nachfolgend mit Zink-Fixierungslösung perfundiert, die Aorten, Femoralarterien und Mesenterialarterien entnommen und für die Einbettung in Paraffin weiterbehandelt. Unterstützt wurde diese Analyse von Dr. Caroline Arnold aus unserem Institut.

5.6.3 *Implantation von Telemetrie-Sonden*

Um den Blutdruck der SMC-NFAT5^{fl/fl} sowie der SMC-NFAT5^{-/-}-Mäusen zu bestimmen, wurden Katheter mit Batterie (PhysioTel PA-C10 Pressure Transmitter for Mice, Data Science International, MCV-Hertogenbosch, Niederlande) unter Isoflurannarkose implantiert. Die Datenübertragung erfolgte radiotelemetrisch. Zunächst wurde der Hals bis zum Beginn des Brustkorbs enthaart. Zudem wurde die Halsregion mit einem Zahnfaden fixiert, um die Beweglichkeit zu reduzieren. Anschließend wurde ein etwa 1 cm großer, medialer Schnitt am Hals gesetzt. Um ein Austrocknen des Operationsfeldes zu verhindern, wurde der Bereich konstant mit sterilem 0,9% igem NaCl (w/v) feucht gehalten. Die Haut wurde mithilfe eines Wattestäbchens vom unterliegenden Gewebe getrennt, um die Beweglichkeit des Operationsfeldes zu erhöhen. Mit einer Schere, die langsam und vorsichtig geöffnet sowie geschlossen wurde, konnte eine subkutane Tasche lateral des Abdomens geformt werden, damit die Batterie später dort platziert werden konnte. Danach wurde die Bifurkation der linken *Arteria carotis communis* in *A. carotis communis interna* und *externa* freipräpariert. Das Fettgewebe, das die Speicheldrüsen verbindet, wurde getrennt und die linke Speicheldrüse mithilfe des Fettgewebes unter der Haut fixiert. Die über der *A. carotis* liegenden Faszien wurden durchtrennt. Die *A. carotis* wird mit einem chirurgischen Dreifachknoten mit einem langen Faden verschlossen, indem an der Bifurkation unterkreuzt und den Knoten ansetzt. Das Gefäß wurde so weit wie möglich proximal freipräpariert. Danach wurde auf das längere Ende des befestigten Fadens langsam fast

maximaler Zug ausgeübt, damit der Katheter später vorgeschoben werden kann. Anschließend wurde die *A. carotis* mit einer Gefäßklemme am proximalen Ende verschlossen, um ein Nachfließen des Blutes vom Herzen zu unterbinden. Direkt hinter der Gefäßklemme wurde ein lockerer Einfachknoten angebracht, der die Befestigung des Katheters ermöglicht. Es wurde eine minimale Inzision auf der Oberseite des Gefäßes nahe des Knotens an der Bifurkation gesetzt. Um das Blut aus dem Gefäß zu entfernen, wurde mit einem Wattestäbchen leichter Druck auf das Gefäß ausgeübt und das Blut mit dem Wattestäbchen aufgenommen. Danach wurde der Katheter eingesetzt und bis zur Gefäßklemme vorgeschoben. Die Gefäßklemme wurde geöffnet und die Katheterspitze bis zur gekennzeichneten Markierung bis in den Aortenbogen geschoben. Zur Fixierung des Katheters wurde der zuvor locker um das Gefäß gebundene Einfachknoten geschlossen und mit zwei weiteren chirurgischen Dreifachknoten fixiert. Bevor die Batterie in die bereits geformte Hauttasche eingeführt werden kann, wurde diese zunächst mit 0,9 %igem NaCl gefüllt und anschließend lateral in das untere Drittel des Abdomens vorgeschoben. Um ein Verrutschen des Katheters zu verhindern, wurde er lateral des Halses subkutan mit einem Tropfen Vetbond fixiert. Anschließend wurde das Operationsfeld mit einem einfachen chirurgischen Knoten verschlossen. Die Erholungszeit der Mäuse vor jedem weiteren Eingriff lag bei einer Woche. Die Aufzeichnung des systolischen und diastolischen Blutdruck erfolgte alle 30 Min. für 5 Min. (Dataquest A.R.T. 4.3., DSI, MC s'Hertogenbosch, Niederlande). Aus den systolischen und diastolischen Blutdruckwerten lässt sich der mittlere arterielle Druck (MAD) für herznahe Gefäße berechnen:
$$MAD = \frac{diastol.Druck + (systol.Druck - diastol.Druck)}{2}$$
 Unterstützt wurde die Analyse von Dr. Caroline Arnold aus unserem Institut.

5.6.4 *Hypoxie-induzierter Bluthochdruck*

Um die Bedeutung von NFAT5 bei der Pathogenese des pulmonalen arteriellen Bluthochdrucks (PAH) zu untersuchen, wurde das Modell der Hypoxie-induzierten PAH verwendet. Unter chronischer Hypoxie werden spannungsabhängigen Kaliumkanäle der glatten Muskelzellen (u.a. Kv1.5, Kv1.2, Kv2.1) in den kleinen peripheren Lungenarterien zunächst geschlossen, bei langfristiger Exposition von Hypoxie wird dessen Genexpression verringert⁷². Es ist bislang noch unklar, welche Mechanismen zu der veränderten Expression führen. Diskutiert wird der Einfluss von vasoaktiven Substanzen

Kapitel 5

sowie Wachstumsfaktoren, die von Endothelzellen freigesetzt werden (z.B. ET-1)⁷³. Die Folge der veränderten Expression der K_v-Kanäle ist eine Membrandepolarisierung resultierend in einer Öffnung von L-Typ-Calciumkanälen, wodurch es zu einem gesteigerten Calciuminflux kommt. Die daraus resultierende Vasokonstriktion der pulmonalen Gefäße erhöht zunächst den Blutdruck im Lungenkreislauf, später jedoch wird der erhöhte pulmonale Blutdruck vor allem auf die Remodellierungsprozesse der kleinen Arterien zurückgeführt⁷⁴. Zusätzlich ist eine funktionelle Störung der Kaliumkanäle mit einer verringerten Apoptoserate von pulmonalen Arterien assoziiert, wodurch die mediale Hypertrophie der Gefäße weiter gefördert wird⁷⁵. Die erhöhte Kontraktilität der Gefäße ist zudem auf eine Aktivierung von RhoA zurückzuführen, was die MLCP-Aktivität vermindert⁷³. Außerdem wird die verstärkte Expression der TRPC-Kanälen 1 und 6 (*transient receptor potential channel*), mit der Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration assoziiert, wobei der Calciumeinstrom aus dem Extrazellularraum (TRPC-6) und dem SR (TRPC-1) erfolgt⁷⁶.

Zur Induktion der beschriebenen Reaktion wurden die SMC-NFAT5^{fl/fl} sowie die SMC-NFAT5^{-/-}-Mäuse paarweise in eine luftdichte Hypoxiekammer (Grundfläche: 338 cm² (13x26 cm), Höhe: 22 cm) gesetzt und die Kammern fest verschlossen. Die Kammer war mit Einstreu ausgelegt und enthielt Nestbaumaterialien, sowie Futter und Trinkwasser. Das Begasen der Kammer erfolgte mit einem Gemisch aus Luft (21 % Sauerstoff und Stickstoff) mit einer Rate von 12 L/Stunde. Durch kontinuierliche Zumischung von Stickstoff wurde die Sauerstoffzielgröße von 10 % erreicht, was etwa einem Sauerstoffpartialdruck der Inspirationsluft in der Lunge von 71 mmHg entspricht. Die Käfige wurden alle 5 Tage kurz geöffnet, um Streu und Futter zu tauschen. Die Mäuse, die als normoxische Kontrolltiere dienten, wurden in Käfigen im gleichen Raum bei Raumluft gehalten. Nach 21 Tagen werden die Mäuse getötet (CO₂-Narkose/Genickbruch), das Herz-Kreislaufsystem mit Ringerlösung und anschließend mit Zink-Fixierlösung perfundiert und die Lungen entnommen. Um die Zunahme der Masse des rechten Ventrikel zu bestimmen, wurde zudem das Herz entnommen und mit einer Pinzette und einer Schere der rechte Ventrikel (RV) von dem linken Ventrikel (LV) und dem Septum (S) getrennt und gewogen. Um den sogenannte Fulton-Index zu berechnen, wurden beide Werte in Relation gesetzt (*Fultons Index (FI)* = $\frac{\text{Masse (RV)}}{\text{Masse (LV+Septum)}}$).

5.6.5 *Ex vivo*-Perfusionsmessung

Um *ex vivo* die Kontraktionsfähigkeit von Gefäßen zu untersuchen, die einem erhöhten transmuralen Druck ausgesetzt werden, wurden Mesenterialarterien mit steigenden Drücken perfundiert und jeweils die Zunahme des Gefäßdurchmessers mithilfe des Culture Myograph System Model 202 Evb (DMT, Kopenhagen, Dänemark) bestimmt. Zunächst wurden die Mesenterialarterien isoliert, in dem der Dünndarm aus der zuvor getöteten Maus entnommen und in einer Präparationsschale (die Tyrode-Lösung enthielt) aufgespannt wurde. Die Arterien wurden vorsichtig mit feinen Pinzetten von den Venen und dem umliegendem Fettgewebe getrennt, anschließend von beiden Seiten auf eine Metallkapillare aufgezogen, einem Knoten fixiert und in die Perfusionskammer (DMT, Kopenhagen, Dänemark) eingesetzt. Entsprechend der Blutflussrichtung wurde auf der einen Seite ein Druck von 70 mmHg und auf der anderen Seite von 50 mmHg angelegt, sodass eine longitudinaler Druckdifferenz von 20 mmHg entstand, wodurch die Tyrode-Lösung gleichmäßig durch das Gefäß fließt. Der Gefäßdurchmesser wurde bestimmt und galt als Startwert, auf den sich alle im Weiteren gemessenen Werte beziehen. Alle zwei Min. wurde der Druck um 10 mmHg auf beiden Seiten erhöht (unter Beibehaltung der longitudinalen Druckdifferenz von 20 mmHg). Der Gefäßdurchmesser wurde nach jeder Erhöhung gemessen und mithilfe der Software VediView-1.2 bestimmt und als relativer Zunahme zum Startwert angegeben. Die Messungen wurden von Yvonne Feuchter durchgeführt.

5.7 Statistik

Die erzielten Daten wurden als Mittelwert mit positiver Standardabweichung dargestellt. Der ungepaarte T-Test (*student's T-test*) wurde angewendet, um die Signifikanz von Ergebnissen zweier unabhängiger experimenteller Gruppen zu analysieren bzw. der gepaarte T-Test bei gegebener Abhängigkeit der Gruppen. Ein p-Wert unter 0,05 galt dabei als signifikant. Für die Signifikanzanalyse von drei oder mehr experimenteller Gruppen wurde der einseitige ANOVA-Test in Kombination mit einem Tukey Post-Hoc-Test genutzt. Auch dabei galt ein p-Wert unter 0,05 als signifikant.

6 Ergebnisse

Diese Arbeit dient der Analyse der Rolle des Transkriptionsfaktors NFAT5 in arteriellen Remodellierungsprozessen, die durch biomechanische Dehnung der Gefäßwand initiiert werden. Als klinisch relevante Ursachen wurden pulmonale und arterielle Hypertonie untersucht. *In vivo* wurden dazu Tiermodelle verwendet, um den funktionellen Einfluss von NFAT5 bei der arterieller Hypertonie sowie im Speziellen bei der Hypoxie-induzierten pulmonalarteriellen Hypertonie zu untersuchen. *In vitro* wurden Mechanismen der NFAT5-abhängigen Genexpression sowie posttranslationale Modifikationen von NFAT5 analysiert, die Voraussetzung für die Translokation von NFAT5 in den Zellkern sind.

6.1 Untersuchung der Regulation der NFAT5-Expression und Lokalisation in gedehnten glatten Gefäßmuskelzellen

Es wurde bereits beschrieben, dass NFAT5 den Phänotyp von glatten Muskelzellen beeinflussen kann⁶⁶. Der Phänotyp von glatten Muskelzellen der medialen Gefäßwand wird unter anderen durch eine erhöhte Wandspannung und der daraus resultierenden Aktivierung der Zellen verändert⁷⁷. Anknüpfend an vorangegangene Arbeiten, die andeuteten, dass NFAT5 in dehnungsstimulierten HUASMCs im Kern detektiert werden kann, sollte ein entsprechender Kerntranslokationsprozess zunächst verifiziert und später mechanistisch genauer untersucht werden.

6.1.1 Analyse der Proteinexpression und der Kerntranslokation von NFAT5 bei biomechanischer Belastung

In den nachfolgenden Untersuchungen wurde der Einfluss der biomechanischen Dehnung auf die Kerntranslokation von NFAT5 in HUASMCs bestimmt. Dazu wurden HUASMCs auf einer flexiblen, mit Kollagen Typ I beschichteten Membran kultiviert und zyklisch gedehnt. Nach Stimulation der HUASMC durch biomechanische Dehnung für 24 bzw. 48 h, nicht aber 6 h erhöhte sich der prozentuale Anteil von Kernen, in denen NFAT5 detektiert wurde, signifikant (Abb. 11A-C,E). Zusätzlich wurde die relative Menge von NFAT5 in der zytosolischen Fraktion bestimmt. Nach einer Dehnungsstimulation für 6 h war die Menge von NFAT5 in HUASMCs signifikant erhöht, im Zeitverlauf nahm die Proteinmenge zunächst ab (24 h) und stieg dann wieder (48 h) signifikant an (Abb. 11D, F).

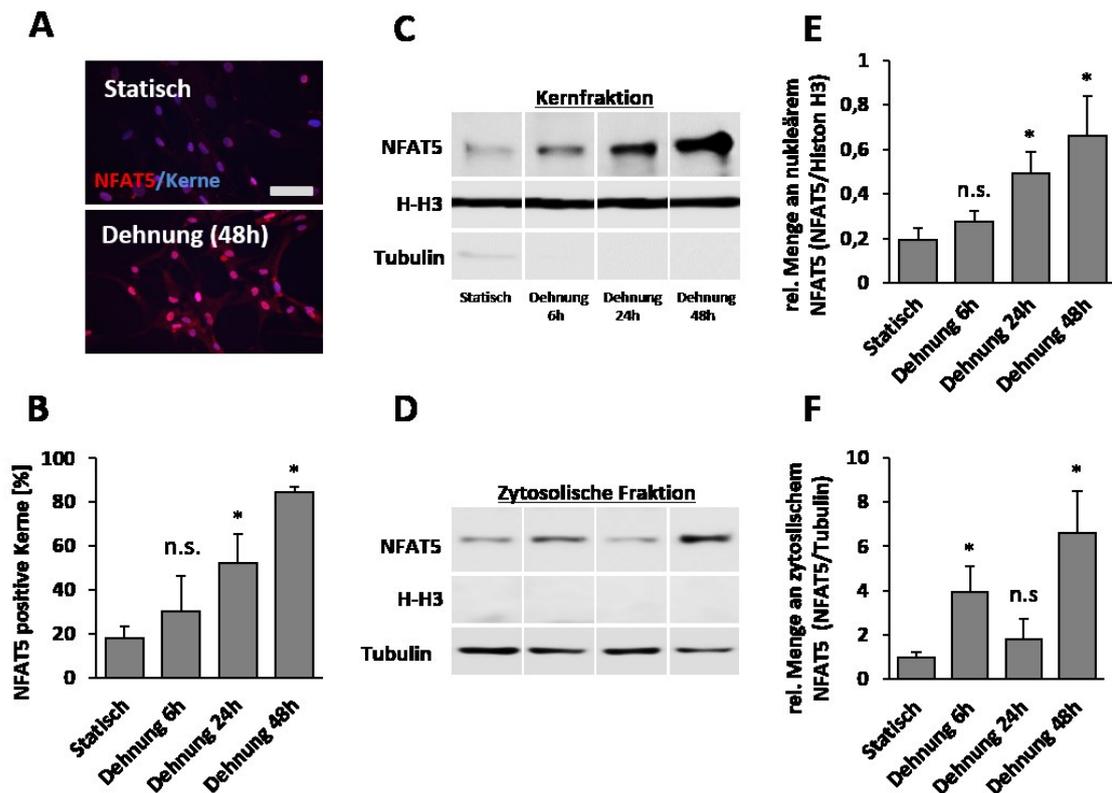


Abb. 11: Analyse der Kerntranslokation von NFAT5 in gedehnten glatten Muskelzellen. HUASMCs wurden zyklisch gedehnt (13 % Elongation, 0,5 Hz). Nach 6 h, 24 h und 48 h wurde jeweils die Dehnung gestoppt und NFAT5 mittels Immunfluoreszenzfärbung detektiert (A, rote Fluoreszenz: NFAT5, blaue Fluoreszenz: Kerne, B, * $p < 0,05$, n.s. = nicht signifikant, Dehnung vs. Statisch, $n = 3$, Maßbalken = 100 μm). Zusätzlich wurden in einer zweiten Versuchsreihe die zytosolischen sowie Kernproteine nach Dehnung isoliert und die Menge an NFAT5 mittels Westernblot dargestellt (C und D, H-H3 = Histon H3). Dazu wurden jeweils 20 μg Protein verwendet. Als Marker für die zytosolische Fraktion wurde α -Tubulin und für die Kernfraktion Histon H3 gewählt. Die Bandenintensität wurde mit Image J densitometrisch quantifiziert (E, F, * $p < 0,05$, n.s. = nicht signifikant, Dehnung vs. Statisch, $n = 3$).

6.1.2 Untersuchung der mRNA-Neusynthese von NFAT5 in dehnungsstimulierten glatten Gefäßmuskelzellen

Zunächst wurde die relative Expression der NFAT5-mRNA in biomechanisch aktivierten HUASMCs bestimmt. In den gedehnten Zellen war die detektierte Menge der NFAT5-mRNA im Vergleich zu statischen Kontrollen zweifach erhöht (Abb. 12A). Um zu untersuchen, ob der Effekt durch eine verstärkte Gentranskription bedingt wird, wurde der RNA-Polymerase-Inhibitor Actinomycin D (ActD)⁷⁸ verwendet und führte sowohl unter statischen Bedingungen als auch nach biomechanischer Stimulation zu einer signifikanten Verringerung der NFAT5-mRNA Menge (Abb. 12B).

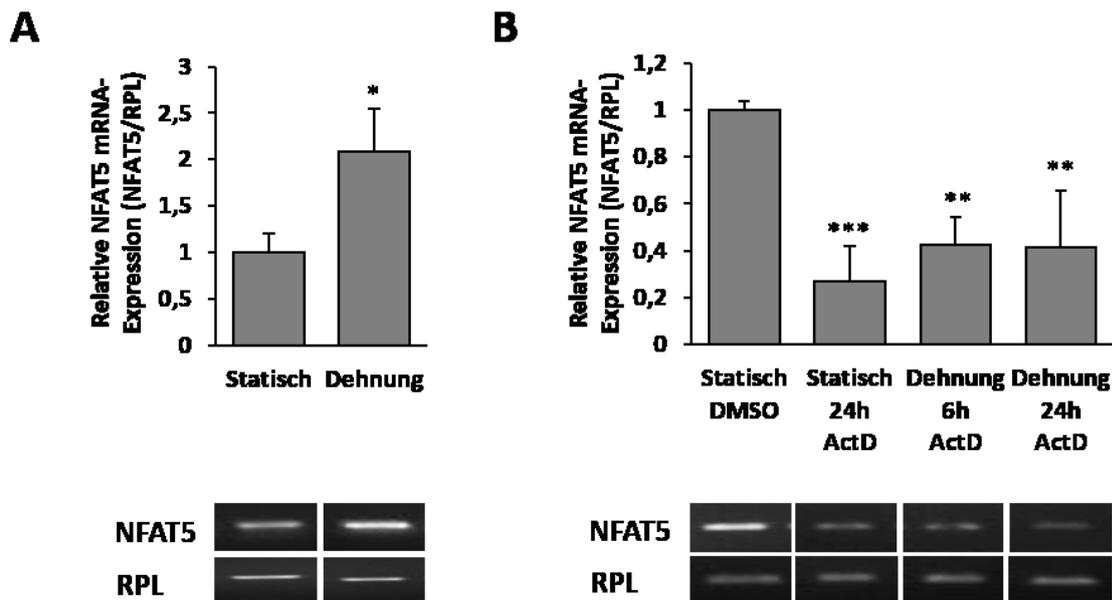


Abb. 12: **Quantifizierung der dehnungsvermittelten mRNA-Synthese von NFAT5 unter Actinomycin-D-Behandlung.** Nach biomechanischer Dehnung der HUASMCs (13 % Elongation, 0,5 Hz, 24 h) wurde die RNA isoliert und die relative Genexpression von *NFAT5* mithilfe der semiquantitativen PCR bestimmt (A, * $p < 0,05$, Dehnung vs. Statisch, $n=4$). Bei den Zellen, die mit Actinomycin D (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) stimuliert wurden, erfolgte eine einstündige Vorinkubation mit Actinomycin D bzw. DMSO (0,5 % (v/v)) als Kontrolle (B, $p^{**} < 0,01$, $p^{***} < 0,001$, Dehnung vs. Statisch, $n=3$). Dazu wurde die Expression von *NFAT5* auf die des *housekeeping* Gens *RPL32* (*RPL*) normalisiert.

6.1.3 Analyse des Einflusses der proteasomalen Aktivität auf die Proteinexpression und nukleäre Translokation von NFAT5

Neben dem Prozess der Proteinneusynthese ist der proteasomale Abbau von Proteinen ein wichtiger Bestandteil der Homöostase von Zellen. Das Ubiquitin-Proteasom-System gilt dabei als die wichtigste Komponente des nicht-lysosomalen Proteinabbaus⁷⁹. Es ist bislang jedoch nicht bekannt, ob die Stabilisation des NFAT5-Proteins in glatten Gefäßmuskelzellen von der Aktivität des Proteasoms beeinflusst wird; dies wurde unter Verwendung des 26S-Proteasominhibitors Bortezomib untersucht. Nach Behandlung von HUASMCs mit Bortezomib konnte ein signifikanter Anstieg der NFAT5-Proteinmenge im Zellkern detektiert werden (Abb. 13A, B). Bestätigt wurde dieses Ergebnis durch die Analyse von Kern- und zytosolischen Proteinlysaten im Westernblot-Verfahren. Das Ergebnis zeigt, dass die Menge des NFAT5-Proteins nach Behandlung mit Bortezomib sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern signifikant erhöht ist (Abb. 13C, D).

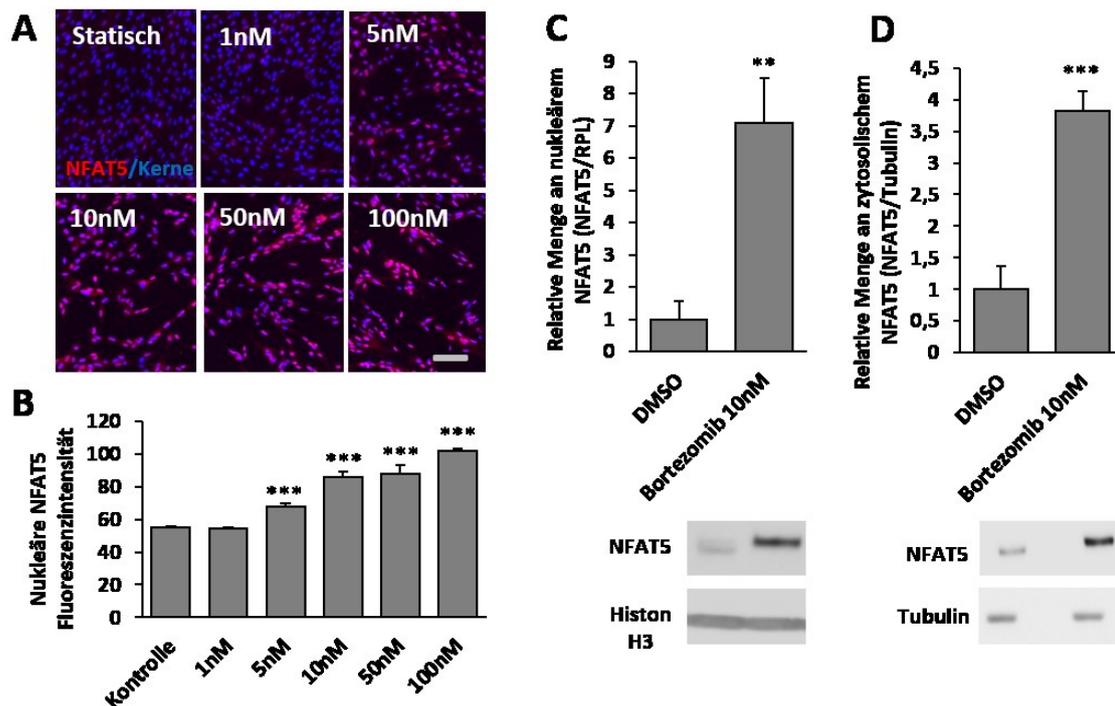


Abb. 13: Analyse des Einflusses der proteasomalen Aktivität auf die Kerntranslokation von NFAT5. HUASMCs wurden für 24 h mit steigenden Konzentrationen des Proteasominhibitors Bortezomib behandelt. Nach spezifischer NFAT5 Immunfluoreszenzfärbung wurden die Fluoreszenzbilder mithilfe des TissueFAXS-Systems automatisiert aufgenommen (A, rote Fluoreszenz: NFAT5, blaue Fluoreszenz: Kerne, Maßbalken 100 μ m) und mit dem TissueQuest-Auswerteprogramm wurde die mittlere nukleäre Fluoreszenzintensität von NFAT5 in arbiträren Größeneinheiten (arb.units) bestimmt (B, *** $p < 0,001$, behandelte Zellen vs. DMSO-Kontrolle, Bortezomibkonzentrationen: 1 nM, 5 nM, 10 nM, 50 nM, 100 nM, $n=3$). Zusätzlich wurden HUASMCs mit Bortezomib (10 nM) über 24 h behandelt, die Proteine der Kern- und der zytoplasmatischen Fraktion isoliert und anschließend NFAT5 mithilfe des Westernblot-Verfahrens nachgewiesen. Die Quantifizierung der Bandenintensität erfolgte mit der Image J Software. Als Marker für die Kernfraktion wurde Histon H3 und für die zytoplasmatische Fraktion α -Tubulin verwendet (C und D, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, Bortezomib vs. DMSO-Kontrolle, $n=3$).

6.2 Untersuchung der NFAT5-abhängigen Genexpression

Vorangegangene Analysen deuteten darauf hin, dass NFAT5 bei biomechanischer Dehnung die Genexpression von Tenascin C (*TNC*) und κ -Aktin (*ACTBL2*) reguliert⁶⁷. Diese Daten wurden mithilfe der Microarraytechnologie erhoben. Nachfolgend wurde untersucht, ob NFAT5 als Transkriptionsfaktor an die Promotersequenz von *TNC* bindet und dessen Transkription aktiv reguliert. Zudem sollte die NFAT5-abhängige *ACTBL2*-Expression zunächst verifiziert und vertiefend auf die biologische Bedeutung von κ -Aktin eingegangen werden.

6.2.1 Untersuchung der Beeinflussung der Tenascin C-Expression durch NFAT5 bei biomechanischer Dehnung

Wie vorangegangene Studien zeigten⁶⁷, führt der *knockdown* von NFAT5 in gedehnten glatten Muskelzellen zu einer Verringerung der *TNC*-mRNA-Expression. Um zu

Kapitel 6

überprüfen, ob dieser Effekt direkt durch NFAT5 über Bindung an die DNA in der *TNC*-Promoterregion vermittelt wird, wurde eine Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP) durchgeführt (Abb. 14A). Die mittels PCR amplifizierte DNA-Menge der gewählten NFAT5-Bindestelle im *TNC*-Promoter war in den ChIP-Proben der gedehnten Zellen im Vergleich zu statischen Kontrollen erhöht.

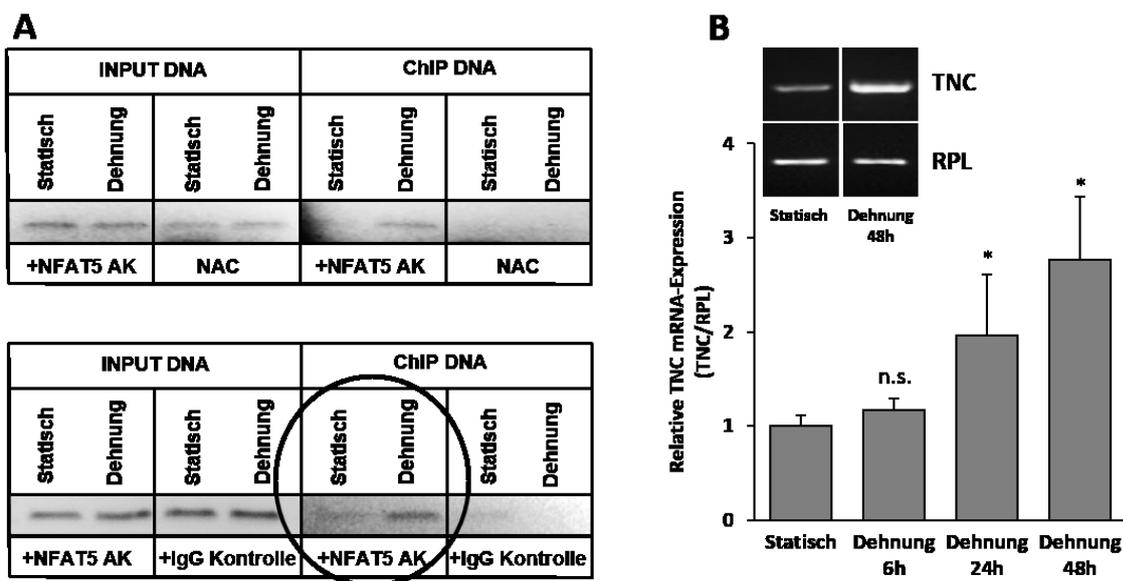


Abb. 14: Analyse der NFAT5-abhängigen Genregulation von Tenascin C. Für die Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP) wurden HUASMCs gedehnt (13 % Elongation, 0,5 Hz, 24 h) und anschließend mit Formaldehyd fixiert. Ein Prozent der aufgearbeiteten Lösung wurde entnommen und diente als DNA-Ladekontrolle (DNA-Input-Kontrolle). Die Immunpräzipitation wurde mit dem NFAT5-AK sowie Kontrollen (IgG-Kontrolle, non antibody control (NAC)) durchgeführt. Die Primer für die anschließende semiquantitative PCR wurden so gewählt, dass sie im Bereich der NFAT5-Bindestelle im *TNC*-Promoter binden können (A, n=3). Die Bestimmung der TNC-mRNA-Expression in Abhängigkeit von der Dehnungsdauer (6 h, 24 h, 48 h) wurde mithilfe der semiquantitativen PCR durchgeführt. Die Genexpression von *RPL* diente als Referenz (B, *p<0,05, n.s.= nicht signifikant, Dehnung vs. Statisch, n=3).

Des Weiteren wurde die Dynamik der dehnungsstimulierten TNC-mRNA-Synthese in einer Zeitreihe (6, 24 und 48 h) ermittelt. Nach biomechanischer Dehnung der HUASMCs stieg die relative Menge an TNC-mRNA im Vergleich zu statischen Kontrollen nach 24 h um den Faktor 2 bzw. 2,7 nach 48 h (Abb. 14B).

6.2.2 Quantifizierung der dehnungsinduzierten Proteinexpression von κ -Aktin

κ -Aktin zählt zur Familie der Aktinproteine, zu der unter anderen auch β -Aktin gehört⁸⁰. β -Aktin - als essentielle Komponente des Zytoskeletts - wird in Zellen ubiquitär exprimiert und spielt eine wichtige Rolle bei der Migration von Zellen sowie der Zellteilung⁸¹. Die Regulation und Funktion von κ -Aktin in glatten Muskelzellen ist nicht bekannt. Zunächst wurde daher der Einfluss von biomechanischer Dehnung auf die

Expression von κ -Aktin in HUASMCs bestimmt. Im Vergleich zu statischen Kontrollen war die mittlere Fluoreszenzintensität von κ -Aktin in gedehnten Zellen signifikant erhöht (Abb. 15).

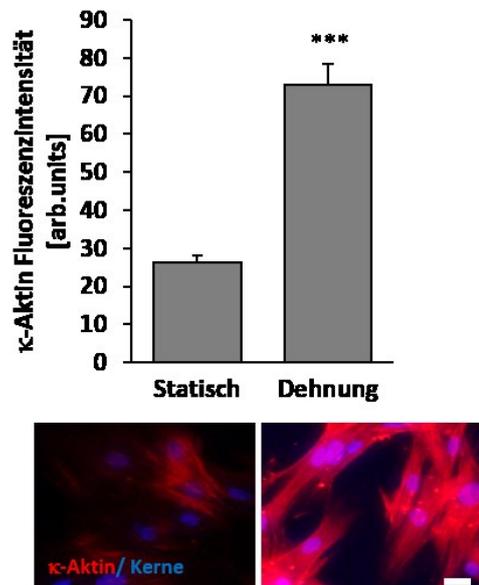


Abb. 15: **Analyse der Proteinmenge von κ -Aktin in gedehnten glatten Muskelzellen.** HUASMCs wurden zyklisch gedehnt (13 % Elongation, 0,5 Hz, 24 h) und κ -Aktin anschließend durch spezifische Immunfluoreszenzfärbung dargestellt. Für die Immunfluoreszenz-basierte Bestimmung der κ -Aktin Proteinmenge wurde das automatisierte TissueFAXS-System genutzt. Die mittlere Fluoreszenzintensität wurde durch die Messung des Grauwertes in absträren Einheiten (arb.units) mit dem TissueQuest-Programm bestimmt. Unbehandelte statisch kultivierte Zellen dienten dabei als Kontrolle (A, rote Fluoreszenz: κ -Aktin, blaue Fluoreszenz: Kerne, *** $p < 0,001$, Dehnung vs. Statisch, $n=3$, Maßbalken 20 μm).

6.2.3 Analyse der dehnungsinduzierten κ -Aktin-Expression in Abhängigkeit von NFAT5

Vorangegangene Ergebnisse deuteten darauf hin, dass die Expression von *ACTBL2* in gedehnten glatten Muskelzellen von der transkriptionellen Aktivität von NFAT5 abhängt⁶⁷. Mithilfe der *in silico*-Analyse wurde zunächst die Promotersequenz des humanen *ACTBL2*-Gens untersucht, um die Anzahl an möglichen Bindestellen von NFAT5 zu ermitteln (Abb. 16A). Das Ergebnis zeigt, dass die Promoterregion des *ACTBL2*-Gens sechs mögliche Bindestellen für NFAT5 aufweist.

Durch den siRNA-vermittelten *knockdown* von NFAT5 in HUASMCs konnte die durch Dehnung induzierte Proteinsynthese von NFAT5 signifikant reduziert werden (Abb. 16C, D). Der Verlust von NFAT5 in Zellen, die anschließend zyklisch gedehnt wurden, führte sowohl zu einer signifikanten Verringerung der *ACTBL2*-mRNA (Abb. 16B) als auch der κ -Aktin Proteinexpression (Abb. 16E, F).

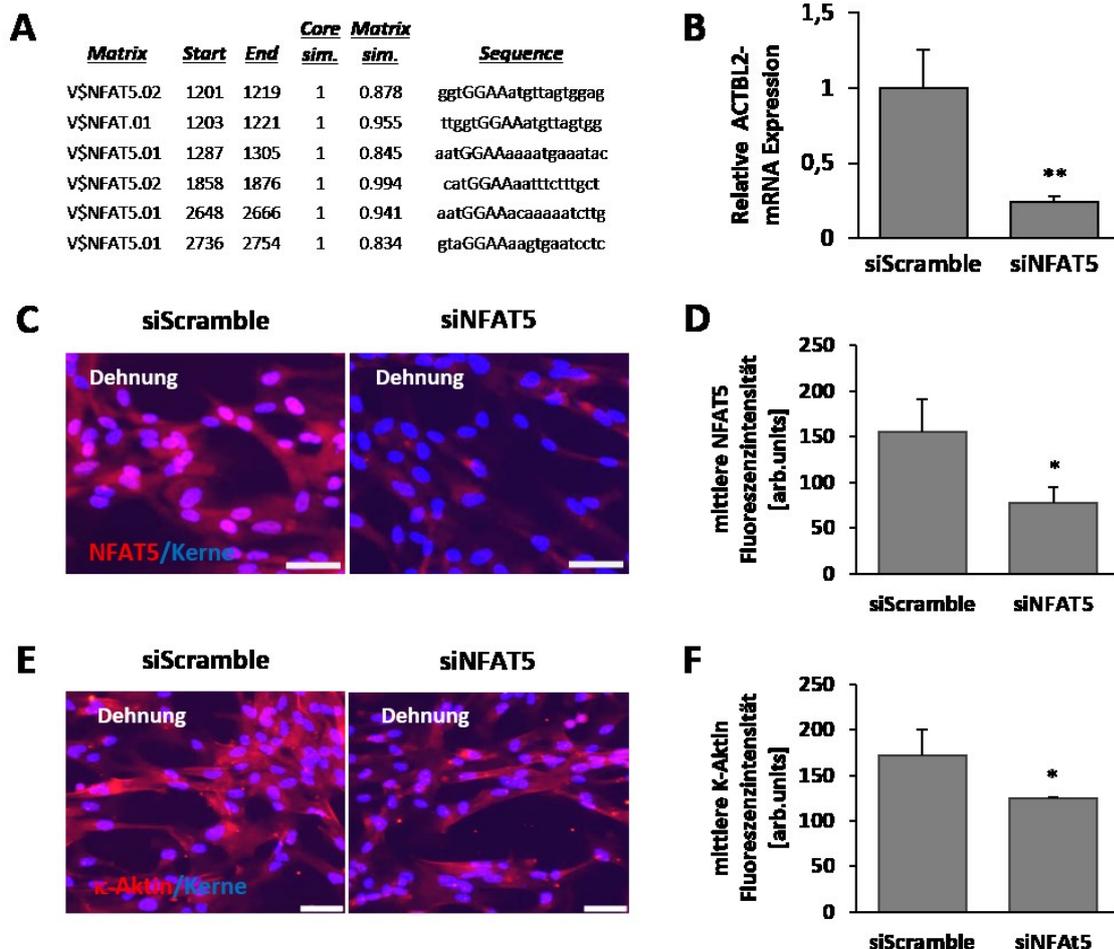


Abb. 16: **Untersuchung des Einflusses von NFAT5 auf die κ -Aktin-Proteinexpression in gedehnten HUASMCs.** Mithilfe der *in silico*-Analyse wurde der *ACTBL2*-Promoter auf mögliche NFAT5-Bindungsstellen untersucht. (A, Core sim.= theoretische Berechnung einer 100 % igen Sequenz-Übereinstimmung, Matrix sim.= berechnete Übereinstimmung der analysierten Sequenz). Dazu wurde die MatInspector Software verwendet. Die Inhibition der NFAT5-Expression in HUASMCs erfolgte mittels NFAT5-siRNA bzw mit Scramble-siRNA als Kontrolle. Nach 48 h wurden die Zellen zyklisch gedehnt (13 % Elongation, 0,5 Hz, 24 h). Die nachfolgende Analyse der *ACTBL2*-Genexpression erfolgte mithilfe der qPCR, die Expression von *RPL* diente dabei als Referenz ($B^{**}p < 0,01$, siNFAT5 vs. siScramble, $n=3$). In einem zweiten Versuchsansatz wurden die Zellen nach der zyklischen Dehnung hinsichtlich der Proteinexpression von NFAT5 und κ -Aktin untersucht und erfolgte durch die Messung der mittleren Fluoreszenzintensität nach Immunfluoreszenzfärbung (C, rote Fluoreszenz: NFAT5, E, rote Fluoreszenz: κ -Aktin, blaue Fluoreszenz: Kerne, Maßbalken: 100 μ m). Die Grauwerte wurden dabei mit der Cell^D-Software in arbiträren Größeneinheiten (arb.units) gemessen (D, F, $*p < 0,05$, siNFAT5 vs. siScramble, $n=3$).

6.2.4 Untersuchung der Migration von κ -Aktin-defizienten glatten Gefäßmuskelzellen

Die dynamische Reorganisation des Zytoskeletts gilt als Bedingung für die Migration von Zellen z.B. während der Entwicklungsphase oder der Wundheilung⁸². Dabei spielt die Polymerisation und Depolarisation von Aktinfilamenten eine wichtige Rolle⁸³. Die Lokalisation von κ -Aktin in ruhenden und migrierenden Zellen wurde nach spezifischer Immunfluoreszenzfärbung analysiert und zeigt, dass κ -Aktin in ruhenden HUASMCs in Form von Stressfasern vorliegt (Abb. 17A). Stressfasern sind Bündel von 10-30

Aktinfilamenten, die durch α -Aktinin vernetzt werden und sind von großer Bedeutung für die Adhäsion von Zellen⁸⁴.

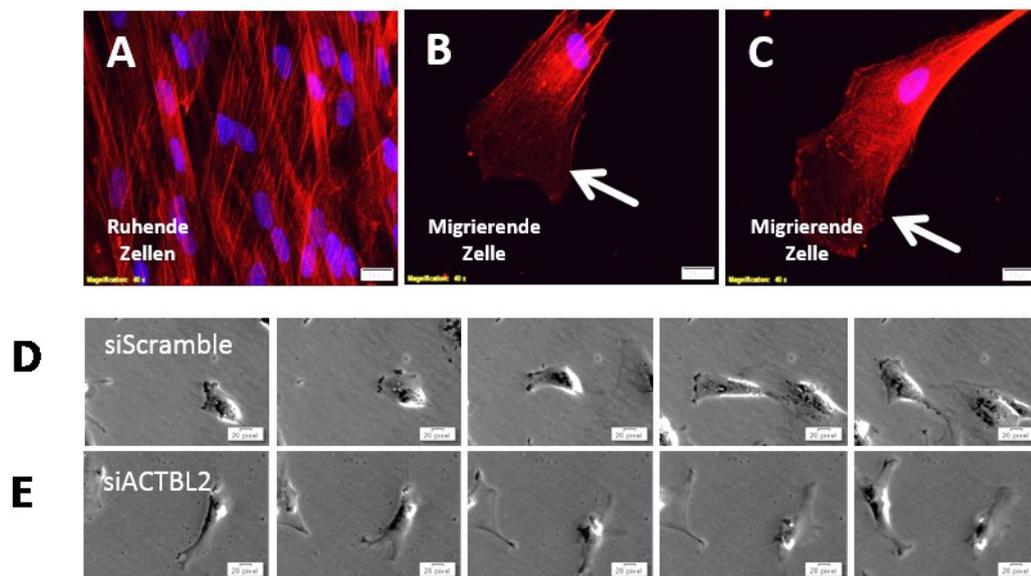


Abb. 17: **Untersuchung der Bedeutung von κ -Aktin für die Zellmigration.** Die Lokalisation von κ -Aktin in ruhenden und migrierenden Zellen wurde mithilfe der Immunfluoreszenz bestimmt (A-C, rote Fluoreszenz: κ -Aktin, blaue Fluoreszenz: Kerne, Maßbalken: 20 μ m). Repräsentative Bilder einer Migrationsanalyse (*Live-Cell-Imaging*, 16 h) von HUASMCs, die zuvor mit Kontroll-siRNA (siScramble) oder *ACTBL2*-spezifischer siRNA (siACTBL2) behandelt wurden. (D, E, Vergrößerung: 10 x).

κ -Aktin wurde in Stressfasern im Hinterende der migrierenden Zellen detektiert, in den Protrusionen dagegen war die κ -Aktin Expression gering (Abb. 17A-C). Um die funktionelle Rolle von κ -Aktin bei der Migration von HUASMCs zu adressieren, wurde die *ACTBL2*-mRNA bzw. die κ -Aktin Proteinexpression durch siRNA inhibiert (Abb. 7A, B) und die Zellen mithilfe des *Live-Cell-Imaging* hinsichtlich ihrer migratorischen Eigenschaften untersucht. Die Zellen wiesen nach *knockdown* von κ -Aktin gegenüber den Kontrollzellen eine gestörte, langsamere und z.T. ungerichtete Migration auf (Abb. 17D, E). Der Anteil der nicht migrierenden Zellen lag bei den Kontrollzellen bei 4 %, während der Anteil nach *knockdown* von κ -Aktin auf 16 % anstieg.

6.3 Untersuchung der Expression und Funktion von NFAT5-Isoformen in biomechanisch stimulierten Gefäßmuskelzellen

Für NFAT5 sind sechs Spleiß-Varianten bekannt (Spleiß-Variante 1-6), die zu 4 verschiedenen Proteinisoformen führen (A-D)⁴⁹. Es ist weder bekannt, welchen Einfluss die Dehnungsstimulation auf die Expression der Spleiß-Varianten in HUASMCs besitzt,

Kapitel 6

noch, ob es Unterschiede hinsichtlich der dehnungsinduzierten Kerntranslokation gibt; dies sollte im Folgenden untersucht werden.

6.3.1 Regulation der NFAT5-Spleiß-Varianten bei biomechanischer Belastung

Wie bereits beschrieben, wurde eine erhöhte Neusynthese der NFAT5-mRNA in dehnungsstimulierten HUASMCs beobachtet (Abb. 12A). Dabei wurde nicht zwischen den möglichen Spleiß-Varianten unterschieden. Mithilfe der PCR, die mit speziellen NFAT5-Primern durchgeführt wurde⁸⁵, konnte aufgrund der Größe der PCR-Produkte die Spleiß-Varianten-Expression von Isoform A und Isoform C unterschieden werden. Während die relative Menge an mRNA der Spleiß-Variante 1 (die für Isoform A kodiert) in HUASMCs nach deren Dehnung signifikant verringert war, waren die relativen mRNA-Spiegel der Variante 3 (kodiert für Isoform C) signifikant erhöht (Abb. 18).

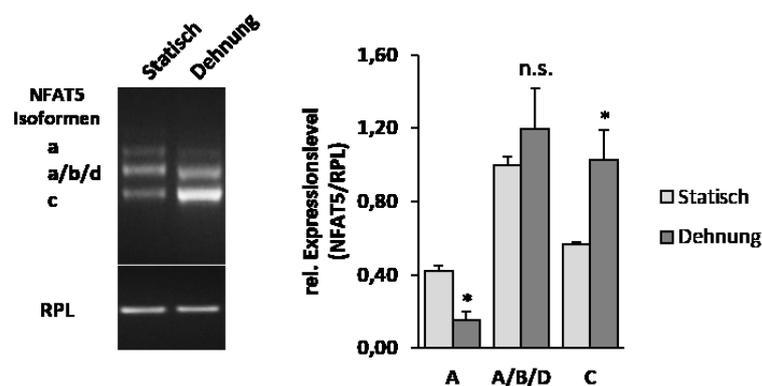


Abb. 18: Expressionsanalyse der NFAT5 Spleiß-Varianten in gedehnten HUASMCs. Die Analyse der mRNA Expression der NFAT5-Spleiß-Varianten in gedehnten und unter statischen Bedingungen kultivierten Zellen erfolgte mittels PCR. Die Quantifizierung der Bandenintensität wurde mit der Image J Software durchgeführt. Aufgrund der Größe der PCR-Produkte wurde zwischen NFAT5a, NFAT5c und NFAT5a/b/d unterschieden (* $p < 0,05$, n.s. = nicht signifikant, Dehnung vs. Statisch, $n=3$). Um die relative Genexpression zu bestimmen, wurde die Expression der Isoformen auf die des housekeeping Gens RPL normalisiert).

6.3.2 Analyse der Kerntranslokation der NFAT5-Isoformen in HUASMCs nach biomechanischer Dehnung

Nach Dehnungsstimulation wurden unterschiedliche Expressionsniveaus der NFAT5-Spleiß-Varianten beobachtet (Abb. 18). Mithilfe der Plasmid-vermittelten Überexpression der NFAT5 Isoform A (NFAT5a) und C (NFAT5c) in HUASMC sollte nun geklärt werden, ob eine biomechanische Stimulation der Zellen die Kerntranslokation dieser Isoformen beeinflusst. Durch Detektion der Proteinmarkierung (DDK-Tag) konnte die Lokalisation der überexprimierten Proteine ermittelt werden.

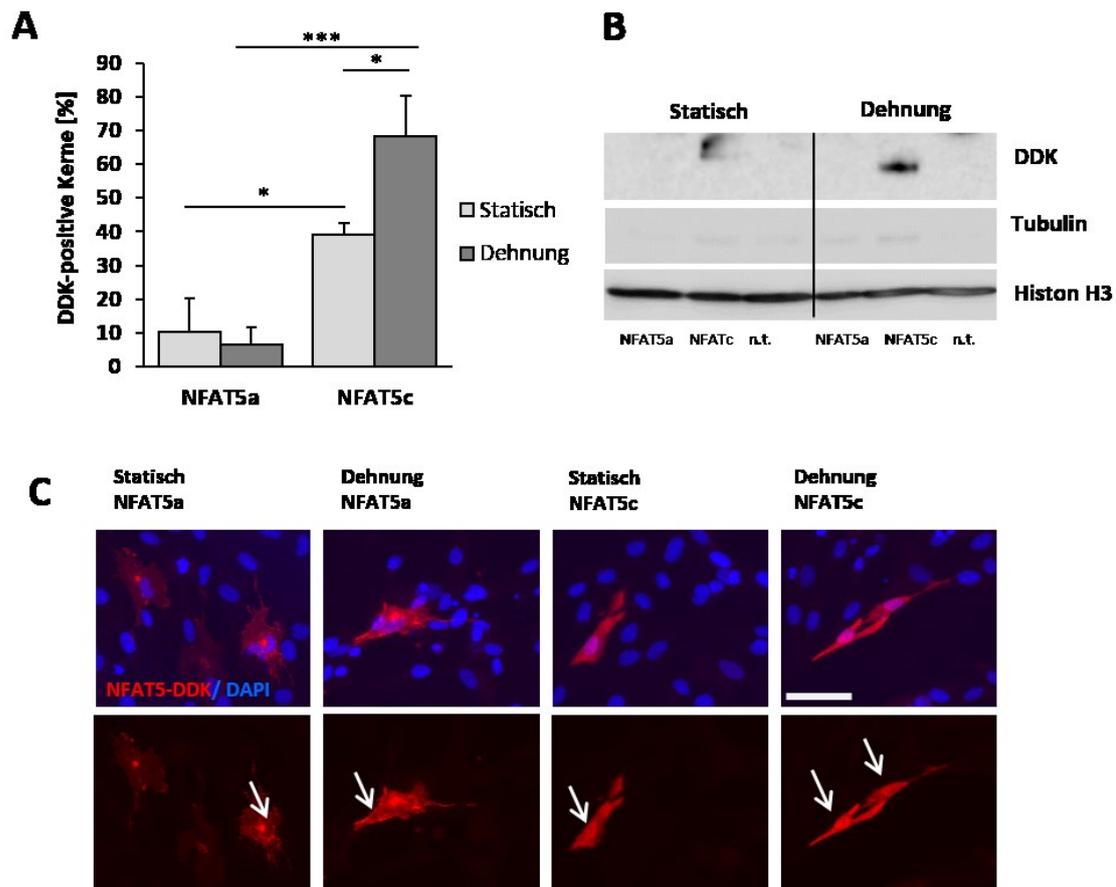


Abb. 19: **Überexpression von NFAT5-Isoformen in HUASMCs.** HUASMCs wurden mit Plasmiden transfiziert, die für NFAT5 Isoform A bzw. C kodieren. Die DDK-Proteinmarkierung ermöglichte es, die überexprimierten Proteine spezifisch nachzuweisen. Nach 24 h wurden die Zellen zyklisch gedehnt (13 % Elongation, 0,5 Hz, 24 h) und mittels Immunfluoreszenz (C, rote Fluoreszenz: DDK, blaue Fluoreszenz: Kerne, weiße Pfeile zeigen die DDK-positiven Kerne) wurde der prozentuale Anteil transfizierter Zellen bestimmt, bei denen die überexprimierten Proteine im Kern lokalisiert waren (A, * $p < 0,05$ Statisch NFAT5a vs. Statisch NFAT5c, * $p < 0,05$ Dehnung NFAT5c vs. Statisch NFAT5c *** $p < 0,001$ Dehnung NFAT5a vs. Dehnung NFAT5c, $n = 3$, Maßbalken 50 μm). In einem zweiten Ansatz wurden die Kernproteine der transfizierten HUASMCs nach Dehnung isoliert und mittels Westernblot-Verfahren analysiert (B, n.t. = nicht transfiziert, repräsentativer Westernblot).

Es zeigte sich, dass NFAT5a-DDK unter statischen Kontrollbedingungen exklusiv im Zytoplasma vorliegt und nach Dehnungsstimulation nicht in den Zellkern transloziert. Im Gegensatz dazu wurde in 40 % der Zellkerne der transfizierten Zellen unter statischen Bedingungen NFAT5c detektiert. Nach Dehnung der Zellen wurde NFAT5c-DDK in etwa 70 % der Zellkerne nachgewiesen (Abb. 19).

6.4 Analyse des Einflusses von posttranslationalen Modifikationen auf die dehnungsinduzierte Kerntranslokation von NFAT5

Für die Kerntranslokation von NFAT5 könnte sowohl die Phosphorylierung als auch die Palmitoylierung dieses Transkriptionsfaktors eine bedeutende Rolle spielen⁶⁷. Zur generellen Einschätzung posttranslationaler Modifikationen wurden daher zunächst

Kapitel 6

mittels isoelektrischer Fokussierung die isoelektrischen Punkte von nukleärem und zytosolischem NFAT5 in gedehnten HUASMCs bestimmt.

6.4.1 Identifikation der isoelektrischen Punkte von nukleärem und zytosolischem NFAT5 in gedehnten glatten Gefäßmuskelzellen

Der isoelektrische Punkt von NFAT5c besitzt einen berechneten Wert von 5,12. Die 2D-Gelelektrophorese wurde durchgeführt, um den IEP von zytosolischem und nukleärem NFAT5 in biomechanisch gedehnten HUASMCs zu bestimmen. Die experimentelle Bestimmung des IEPs von NFAT5 konnte unter basalen Bedingungen nicht durchgeführt werden, da die Expression in nicht-gedehnten HUASMCs für die Detektion mit der 2D-Gelelektrophorese-Methode zu gering war. Daher wurde die Analyse nur in fraktionierten Kern- und zytosolischen Proteinlysaten von gedehnten Zellen bestimmt.

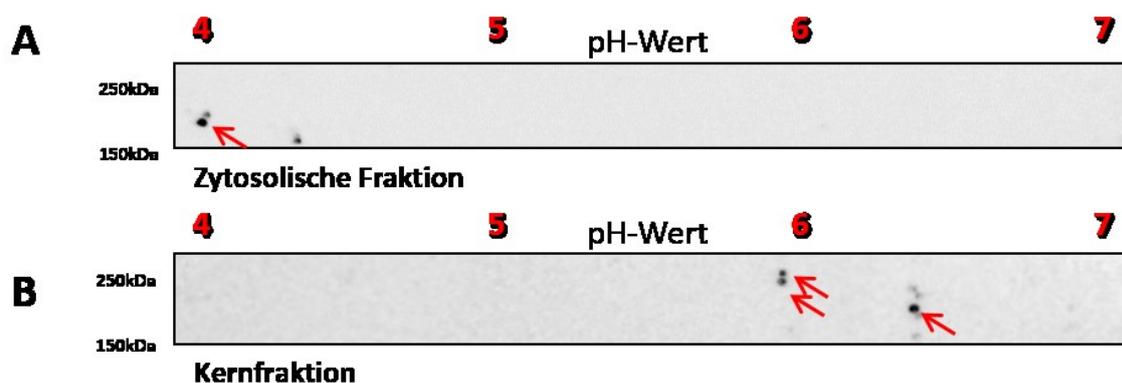


Abb. 20: **Analyse von NFAT5 nach isoelektrischer Fokussierung.** Für die 2 D-Gelelektrophorese wurden die nukleären und zytosolischen Proteine der HUASMCs nach zyklischer Dehnung (13 % Elongation, 0,5 Hz, 24 h) isoliert und mittels isoelektrischer Fokussierung per pH-Gradienten-Gel aufgetrennt (1.Dimension). In der nachfolgenden zweiten Dimension wurden die Proteine durch die SDS-Gelelektrophorese nach ihrer Größe getrennt und NFAT5 nach Immunblotting unter Verwendung des monoklonalen NFAT5-Antikörpers (ab56997) dargestellt und mit Pfeilen markiert. Der Wert der isoelektrischen Punkte wurde mithilfe der pH-Skalierung aus der ersten Dimension ermittelt (A, B). Der Proteinmarker wurde nur zur relativen Orientierung verwendet und wurde daher nicht zur Bestimmung der Proteinmasse genutzt.

Zytosolisches NFAT5 wies einen IEP von 4 auf der Höhe von etwa 170 kDa auf (Abb. 20A), nukleäres NFAT5 konnte bei 6,4 detektiert werden, sowie zwei weitere Punkte bei einem IEP von 5,9 mit einer geringen Differenz ihrer Molekularmasse (Abb. 20B).

6.4.2 Untersuchung der Bedeutung der Phosphorylierung von NFAT5 an Serin-1197 für die dehnungsinduzierte Kerntranslokation

Nachfolgend sollte geklärt werden, ob die dehnungsinduzierte Verschiebung des IEPs um mehr als eine pH-Einheit von zytosolischem NFAT5 durch eine erhöhte

Phosphorylierung des Proteins bedingt ist. Dazu wurde zunächst die Position Serin-1197 untersucht, die im Zusammenhang mit osmotischem Stress die Aktivität von NFAT5 kontrollieren soll⁸⁶.

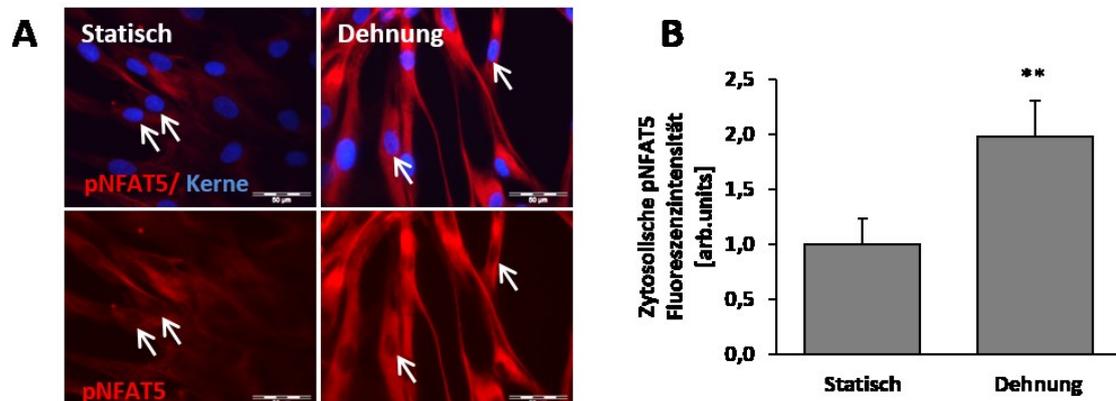
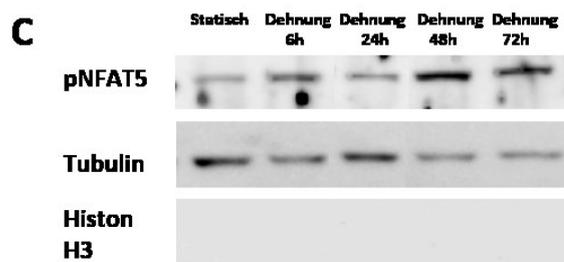


Abb. 21: Analyse der Phosphorylierung von Serin an Position 1197 in gedehnten HUASMCs. Nach zyklischer Dehnung der HUASMCs (13 % Elongation, 0,5 Hz, 24 h) wurde die Menge an zytosolischem NFAT5-p1197 durch Quantifizierung der Immunfluoreszenz bestimmt (A, rote Fluoreszenz: pNFAT5, blaue Fluoreszenz: Kerne, Maßbalken 50 μ m). Die Grauwerte wurden dabei mit der Cell[^]D-Software in arbiträren Größeneinheiten (arb.units) gemessen (B, **p<0,01, n=3). Die Dynamik der dehnungsinduzierten Phosphorylierung an Serin1197 wurde mithilfe einer Zeitreihe von 6-72 h und anschließend im Westernblot-Verfahren dargestellt (C, repräsentativer Westernblot, n=3).



Im Vergleich zu statischen HUASMCs konnte in dehnungsstimulierten Zellen eine zweifache Erhöhung von phosphoryliertem NFAT5 detektiert werden. Dabei wurde nur zytosolisches NFAT5 an Serin-1197 phosphoryliert, im Zellkern konnte weder unter Kontrollbedingungen noch nach Dehnung ein entsprechendes Fluoreszenzsignal detektiert werden. Die Dynamik der Phosphorylierung wurde zusätzlich in einem zeitabhängigen Versuch nach Isolation der zytosolischen Proteinfraktion analysiert. Das Ergebnis zeigt, dass die Menge von phosphoryliertem NFAT5 nach 48 Stunden erhöht war (Abb. 21).

Die Methodik der zielgerichteten Mutation von Plasmiden wurde nun genutzt, um die Aminosäure Serin-1197 des NFAT5c-Plasmids spezifisch gegen Alanin bzw. Glutaminsäure auszutauschen. Der Austausch von Serin zu Alanin (NFAT5c_1197A) ist eine *loss-of-function* Mutation (Inhibition der Phosphorylierung von S1197). Durch den

Kapitel 6

Austausch von Serin zu Glutaminsäure (NFAT5c-1197E) wurde eine Mutante generiert, die durch die negative Ladung der Aminosäure eine (dauerhafte) Phosphorylierung an Position 1197 nachahmt (*gain-of-function*-Mutante).

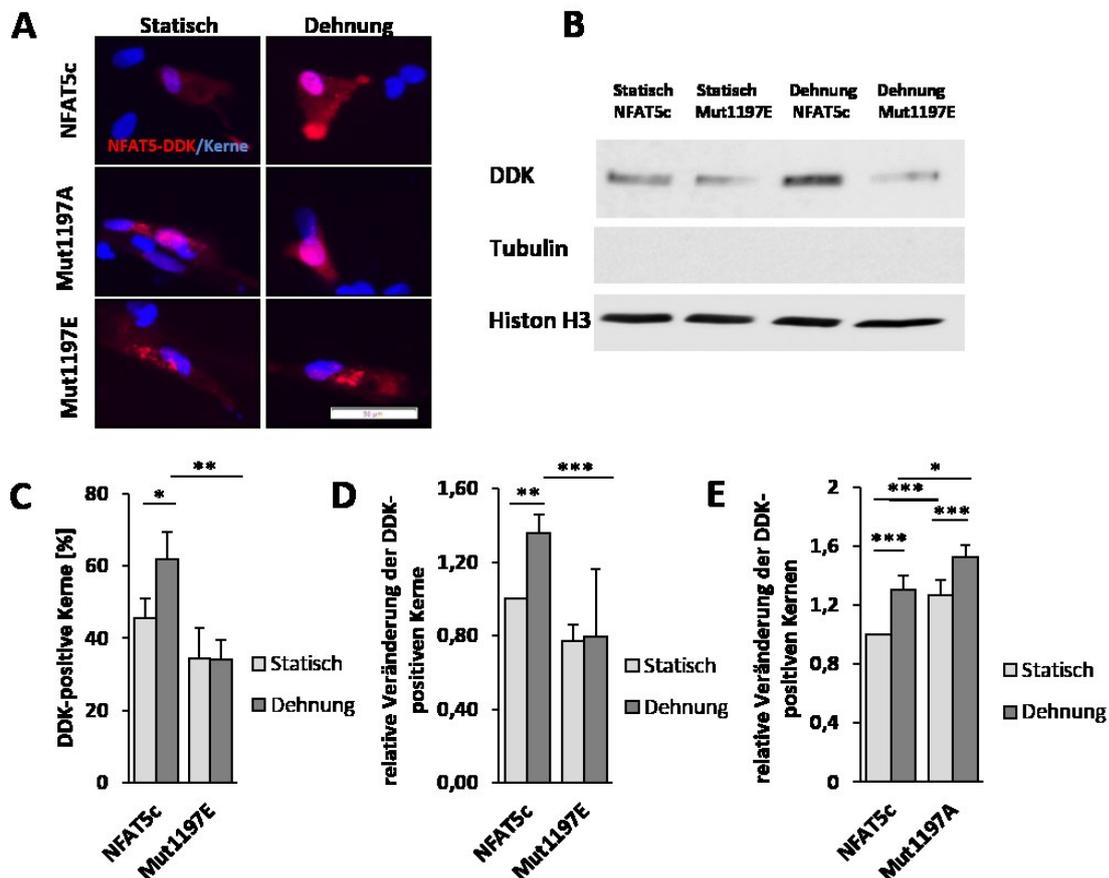


Abb. 22: **Untersuchung der Kerntranslokation von NFAT5c-Mut1197E und NFAT5c-Mut1197A in glatten Muskelzellen.** HUASMCs wurden nach der Transfektion mit Plasmid NFAT5c, Mut1197E bzw. Mut1197A zyklisch gedehnt (13 % Elongation, 0,5 Hz, 24 h). Zellen unter statischen Kulturbedingungen dienten als Kontrollen. Die Lokalisation der überexprimierten Proteine erfolgte jeweils durch Visualisierung des *DDK-Tags* mithilfe der Immunfluoreszenz (A, rote Fluoreszenz: NFAT5-DDK, blaue Fluoreszenz: Kerne, Maßbalken 50 μm) oder des Westernblot-Verfahrens nach Isolation der Kernproteine (B, repräsentativer Westernblot). Die Anzahl von transfizierten Zellen, die ein positives DDK-Signal im Zellkern zeigten, wurden anschließend prozentual berechnet (C, * $p < 0,05$ Dehnung NFAT5c Dehnung vs. NFAT5c Statisch, ** $p < 0,01$ Dehnung NFAT5c vs. Dehnung Mut1197E, $n=3$). Zusätzlich wurde die relative Veränderung von DDK-positiven Zellen nach Dehnung berechnet ((D), ** $p < 0,01$ Statisch NFAT5c vs. Dehnung NFAT5c, *** $p < 0,001$ Dehnung NFAT5c vs. Dehnung Mut1197E, $n=3$, (E) * $p < 0,05$ Dehnung NFAT5c vs. Dehnung Mut1197A, *** $p < 0,001$ Dehnung NFAT5c vs. Statisch NFAT5c, *** $p < 0,001$ Statisch NFAT5c vs. Statisch Mut1197A, *** $p < 0,001$ Dehnung Mut1197a vs. Statisch Mut1197A, $n=5$).

Nach Überexpression der Plasmide in statischen und gedehnten GMZ konnte im Vergleich zum NFAT5c keine dehnungsinduzierte Translokation der Mutante 1197E festgestellt werden (Abb. 22A-D). Der prozentuale Anteil von NFAT5c-DDK-positiven Kernen blieb mit 35 % auf dem Niveau der statischen Kontrolle. Auch nach Bestimmung der relativen Veränderung der NFAT5c-DDK-positiven Kerne nach Dehnung war die

Kerntranslokation der Mutante 1197E im Vergleich zu NFAT5c signifikant verringert. Die Mutante 1197A war bereits unter statischen Bedingungen verstärkt im Kern lokalisiert (Abb. 22A, E). Der Wert dabei lag auf dem Niveau des NFAT5c-Proteins nach Dehnung (1,3-facher Anstieg zu statischen NFAT5c-Kontrolle). Nach Dehnung war die Kerntranslokation der Mutante 1197A im Vergleich zu NFAT5c signifikant erhöht.

6.4.3 Analyse des Einflusses der Aminosäure Tyrosin-143 auf die dehnungsinduzierte Translokation von NFAT5

Die Aktivierung und Translokation von NFAT5 bei osmotischem Stress ist unter anderem von der Phosphorylierung des Tyrosins an Position 143 abhängig⁵⁸. Nachfolgend wurde daher untersucht, ob die Phosphorylierung dieses Tyrosins die Kerntranslokation von NFAT5 auch unter Dehnung beeinflusst. Mithilfe einer gezielten Mutagenese wurde eine *loss-of-function*-Mutante von NFAT5 generiert, indem an Position 143 Tyrosin durch Alanin ersetzt wurde (Mut143A).

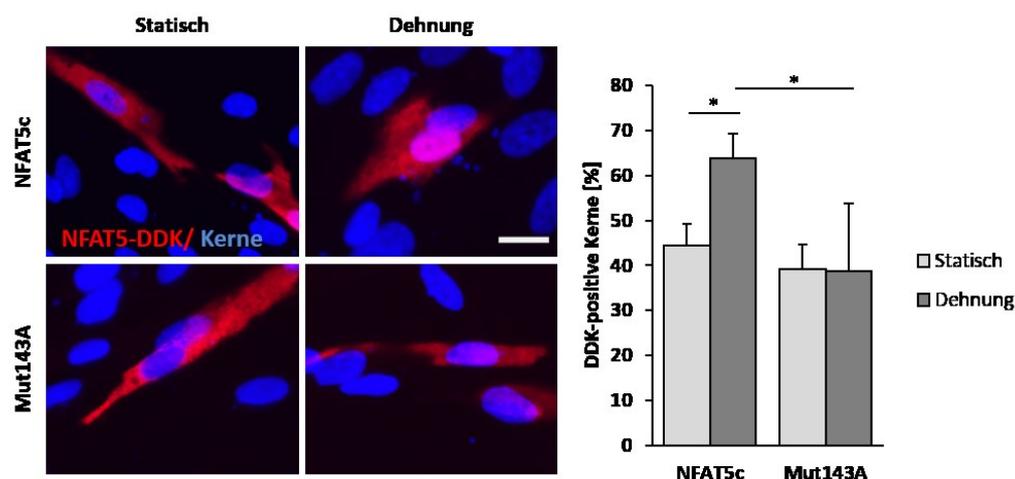


Abb. 23: Lokalisation der überexprimierten NFAT5 Mutante 143A in HUASMCs nach biomechanischer Dehnung. HUASMCs wurden mit Plasmid NFAT5c bzw. NFAT5c-Mut143A transfiziert und zyklisch gedehnt (13 % Elongation, 0,5 Hz, 24 h) bzw. statisch kultiviert. Anschließend wurde NFAT5 per Immunfluoreszenz über die C-terminale DDK-Sequenz detektiert (A, rote Fluoreszenz: NFAT5-DDK bzw. Mut143A-DDK, blaue Fluoreszenz: Kerne, Maßbalken 50 μ m) (B, * $p < 0,05$, Dehnung vs. Statisch, $n=3$).

Unter statischen Kulturbedingungen wurde kein Unterschied hinsichtlich der Kernlokalisierung von NFAT5c und NFAT5c-mut143 festgestellt. Im Vergleich zu NFAT5c war die Translokation der Mutante 143A nach Dehnung signifikant verringert (Abb. 23).

Kapitel 6

6.4.4 Bedeutung der Kinase c-Abl für die Kerntranslokation von NFAT5

Die Kinase c-Abl spielt eine wichtige Rolle in der durch osmotischen Stress bedingten Aktivierung und Kerntranslokation von NFAT5⁵⁷. Bei osmotischem Stress wird NFAT5 durch c-Abl an Tyrosin-143 phosphoryliert. Die Rolle von c-Abl in dehnungsstimulierten HUASMCs wurde daher nachfolgend exemplarisch analysiert, indem die c-Abl-Expression zuvor mithilfe RNA-Interferenz-Methode (siRNA) reduziert wurde (Abb. 24C). Der prozentuale Anteil von Zellen, in denen NFAT5 nach spezifischer Immunfluoreszenzfärbung im Zellkern detektiert werden konnte, war nach Dehnung in den c-Abl-defizienten Zellen verringert (Abb. 24A,B).

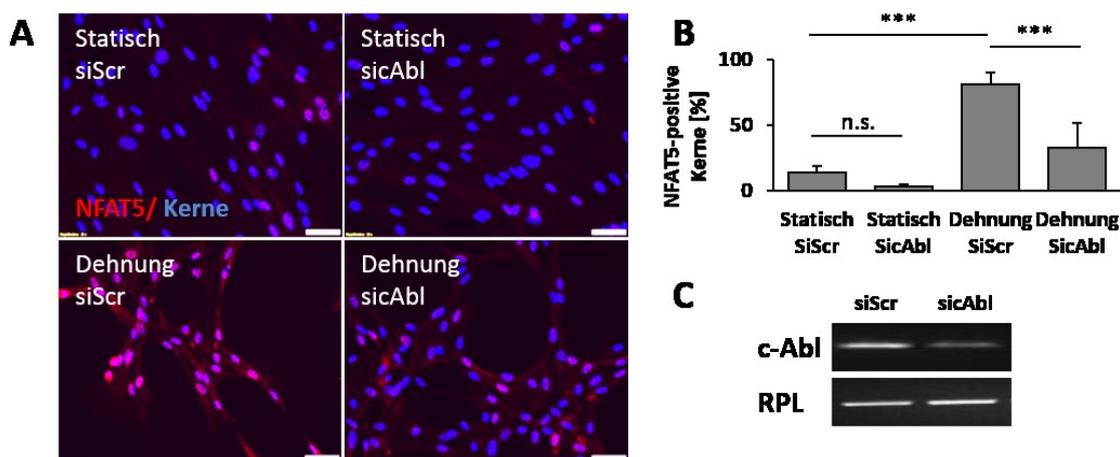


Abb. 24: **Analyse der NFAT5-Kerntranslokation nach knockdown der Kinase c-Abl.** Mithilfe spezifischer siRNA wurde die Expression von c-Abl in HUASMCs inhibiert. Scramble-siRNA wurde als Kontrolle verwendet. Nach 48 h wurden die Zellen zyklisch gedehnt (13 % Elongation, 0,5 Hz, 24 h). Die Bestimmung des prozentualen Anteils NFAT5-positiver Zellkerne erfolgte nach NFAT5-spezifischer Immunfluoreszenzfärbung (A, rote Fluoreszenz: NFAT5, blaue Fluoreszenz: Kerne, Maßbalken 20 μm) (B, *p<0,05 Statisch siScr vs. Dehnung siScr, *p<0,05 Dehnung siScr vs. Dehnung siAbl, n.s. Statisch siScr vs. Statisch siAbl, n=1; die Auswertung erfolgte in Triplikaten). Der Nachweis der verringerten Genexpression von c-Abl erfolgte mithilfe der RT-PCR (C, exemplarische Darstellung).

6.4.5 Untersuchung der dehnungsinduzierten Kerntranslokation von NFAT5 in glatten Gefäßmuskelzellen nach Behandlung mit dem Multikinase-Inhibitor Dasatinib

Das vorige Ergebnis deutet darauf hin, dass die Translokation von NFAT5 in gedehnten glatten Muskelzellen von der Aktivität der Kinase c-Abl abhängig ist (Abb. 24). Die Inhibition von c-Abl *in vitro* kann durch die Stimulation mit dem Multikinase-Inhibitor Dasatinib erreicht werden, der die Tyrosinkinase c-Abl, c-Kit und Src hemmt. Der Einfluss von Dasatinib auf die Kerntranslokation von NFAT5 in gedehnten HUASMCs sollte nach spezifischer NFAT5-Immunfluoreszenzfärbung analysiert werden.

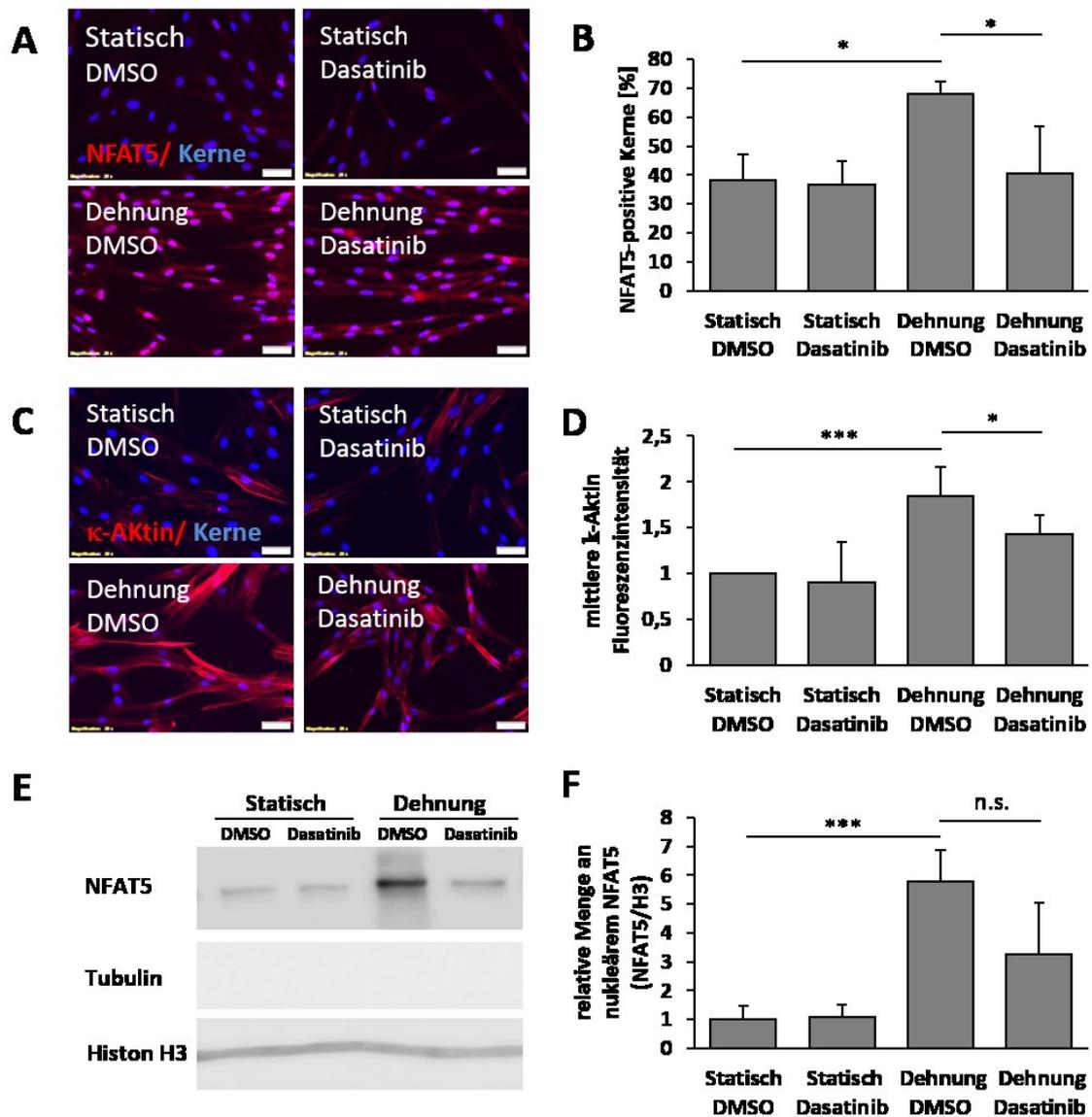


Abb. 25: Analyse der dehnungsinduzierten NFAT5 Translokation nach Stimulation mit Dasatinib. HUASMCs wurden mit Dasatinib (5 nM) oder DMSO (0,05 %, v/v) für 1 h vorinkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen für 24 h zyklisch gedehnt (13 % Elongation, 0,5 Hz) und NFAT5 (A) bzw. κ -Aktin (C) mittels Immunfluoreszenzfärbung dargestellt (A, NFAT5= rote Fluoreszenz: NFAT5, C, rote Fluoreszenz: κ -Aktin, blaue Fluoreszenz: Kerne, Maßbalken 50 μ m). Der prozentuale Anteil NFAT5-positiver Zellkerne (A) wurde bestimmt. Die Expressionsanalyse von κ -Aktin (C) erfolgte durch die Messung der mittleren Fluoreszenzintensität. Die Grauwerte wurden dabei mit der Cell[^]D-Software in arbiträren Größeneinheiten (arb.units) gemessen ((B) * p <0,05 Dehnung DMSO vs. Statisch DMSO, * p <0,05 Dehnung DMSO vs. Dehnung Dasatinib, (D), *** p <0,001 Dehnung DMSO vs. Statisch DMSO, * p <0,05 Dehnung DMSO vs. Dehnung Dasatinib, n=5). Kernlysate der entsprechenden Zellen wurden zudem per Westernblot analysiert (E, F, *** p <0,001 Dehnung DMSO vs. Statisch DMSO, n.s. = Dehnung DMSO vs. Dehnung Dasatinib, n=3). Die Quantifizierung der Bandenintensität erfolgte mithilfe der Image J-Software.

Im Vergleich zu DMSO behandelten gedehnten Kontrollzellen war die Anzahl der als NFAT5-positiv gewerteten Zellkerne nach Dehnung signifikant verringert (Abb. 25A, B). Zur Verifizierung der Beobachtung wurde die Menge von nukleärem NFAT5 zudem mithilfe des Westernblot-Verfahrens bestimmt. Die Stimulation mit Dasatinib verringerte tendenziell die dehnungsinduzierte Kerntranslokation (Abb. 25E, F). Die

Kapitel 6

Analyse der κ -Aktin-spezifischen Immunfluoreszenzintensität war in den Dasatinib-stimulierten Zellen im Vergleich zu den gedehnten DMSO-Kontrollen nach Dehnung signifikant vermindert (Abb. 25C, D).

6.4.6 Bedeutung der Palmitoylierung für die Kerntranslokation von NFAT5-Isoform C bei Dehnung

Vorangegangene Ergebnisse deuteten darauf hin, dass die Palmitoylierung von NFAT5 eine Rolle für dessen dehnungsinduzierte Kerntranslokation spielt. Entsprechend war der Anteil von NFAT5c-DDK-positiven Zellkernen nach Blockade der Palmitoylierung mittels 2-Bromopalmitat im Vergleich zu dem in gedehnten Kontrollzellen signifikant verringert (Abb. 26).

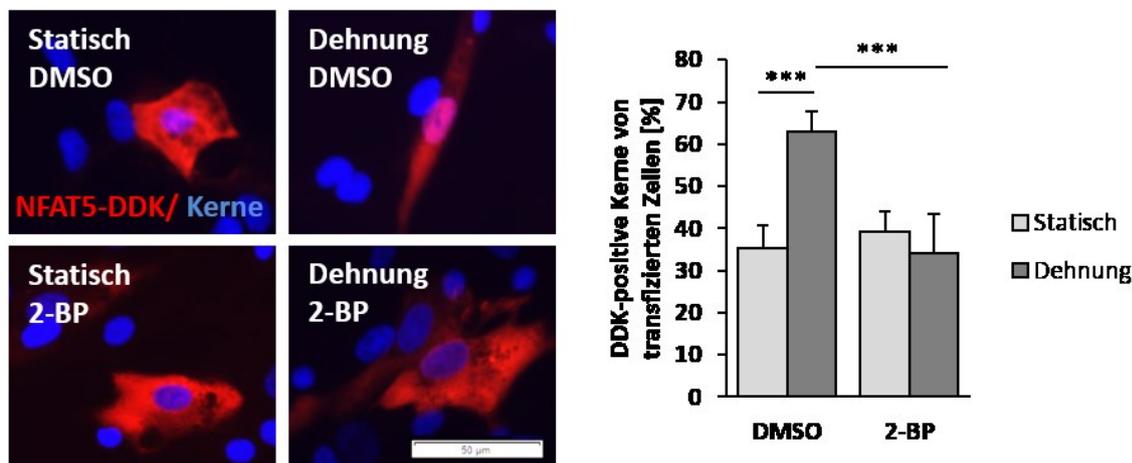


Abb. 26: **Analyse der Kerntranslokation von NFAT5c nach Behandlung mit 2-Bromopalmitat.** HUASMCs wurden mit 2-Bromopalmitat (100 μ M) oder DMSO 0,1 % (v/v) eine Stunde vorinkubiert und anschließend zyklisch gedehnt (13 % Elongation, 0,5 Hz, 24 h) bzw. statisch kultiviert. Der prozentuale Anteil der DDK-positiven Zellkerne wurde mithilfe der DDK-spezifischen Immunfluoreszenz bestimmt (A, rote Fluoreszenz: NFAT5c-DDK, blaue Fluoreszenz: Kerne, Maßbalken 50 μ m) (B*** p <0,001 Dehnung DMSO vs. Statisch DMSO, *** p <0,001 Dehnung DMSO vs. Dehnung 2-BP, n =4).

6.4.7 Nachweis von palmitoyliertem NFAT5 in nukleären und zytosolischen Lysaten

Basierend auf den Ergebnissen sollte nun geklärt werden, ob NFAT5 als Protein der direkten Palmitoylierung unterliegt oder ob die Palmitoylierung die Kerntranslokation von NFAT5 indirekt beeinflusst. Eine CLICK-Reaktion zeigte, dass NFAT5 in statisch kultivierten und gedehnten Zellen sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern palmitoyliert vorliegt. Die Proteine Histon H3 und Tubulin konnten dabei nicht wie üblich als Referenzmarker zur Quantifizierung der relativen Proteinmengen verwendet werden, da beide Proteine ebenfalls palmitoyliert werden und der Einfluss der Dehnung auf die Palmitoylierung dieser Proteine nicht bekannt ist (Abb. 27).

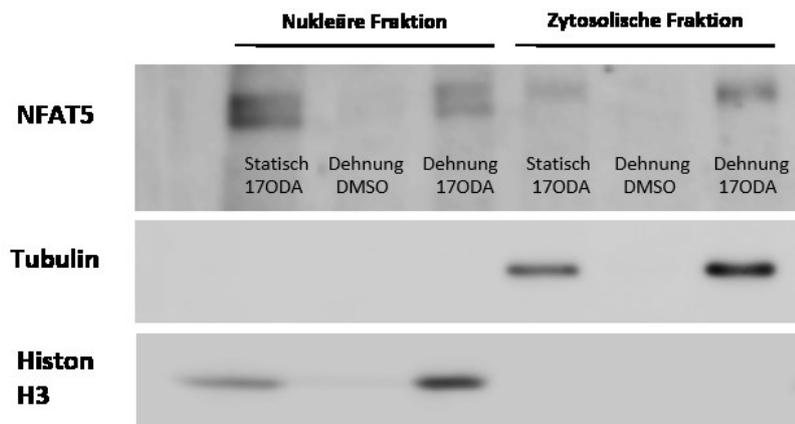


Abb. 27: **Analyse der Palmitoylierung von NFAT5.** HUASMCs wurden eine Stunde vor Versuchsstart mit 17-Octadecansäure (17-OCA) stimuliert, die Kontrollzellen mit DMSO (0,1% (v/v)). Nach zyklischer Dehnung (13 % Elongation, 0,5 Hz, 24 h) wurden die Kernproteine sowie die zytosolischen Proteine isoliert und mittels Methanol-Chloroform-Extraktion aufgereinigt. Die Markierung der palmitoylierten Proteine erfolgte durch die Reaktion von Biotinazid mit dem reaktiven 17-OCA und anschließender Fällung mittels Streptavidin. Die Detektion von NFAT5 erfolgte nach Separation im SDS-Polyacrylamidgel und nachfolgendem Immunoblotting (repräsentativer Westernblot). Da die CLICK-Reaktion nur als qualitativer Nachweis diente, wurde die Menge an palmitoyliertem NFAT5 in den Proben nicht quantifiziert.

6.4.8 Bedeutung der Aminosäure Cystein-81 für die dehnungsvermittelte Kerntranslokation der NFAT5-Isoform C

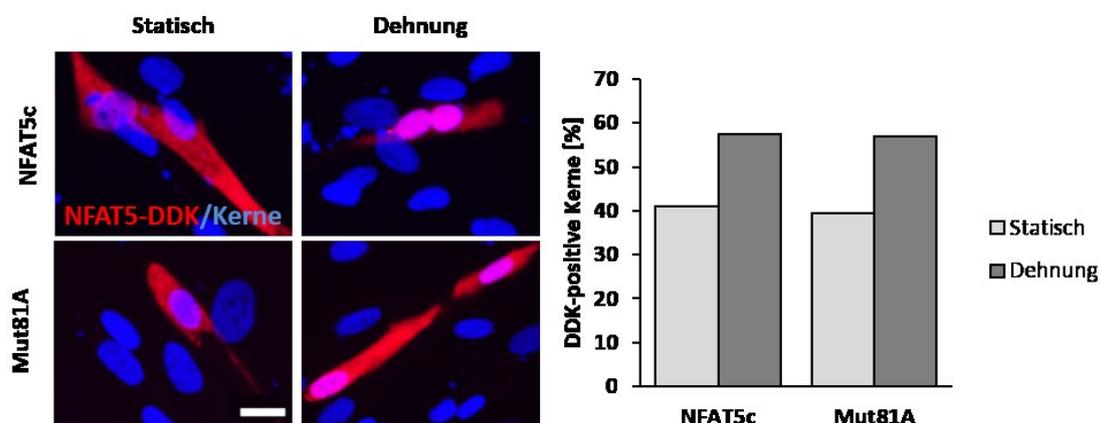


Abb. 28: **Analyse der Kerntranslokation der NFAT5-Mutante 81A nach Überexpression.** HUASMCs wurden mit dem Plasmid NFAT5c bzw. Mut81A transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen zyklisch gedehnt (13 % Elongation, 0,5 Hz, 24 h). Der prozentuale Anteil der DDK-positiven Zellkerne wurde mithilfe der DDK-spezifischen Immunfluoreszenz bestimmt (A, rote Fluoreszenz: NFAT5-DDK, blaue Fluoreszenz: Kerne, Maßbalken 20 μ m, repräsentatives Ergebnis).

Bei der Palmitoylierung von Proteinen wird Palmitinsäure mithilfe von Palmitoyltransferasen kovalent an Cysteinreste von Proteinen gebunden⁸⁷ und dient im Wesentlichen der Lipidverankerung in der Membran. NFAT5a kann unter isoosmolaren Bedingungen sowohl palmitoyliert und somit Membran-verankert vorliegen, als auch nicht-palmitoyliert diffus im Zytoplasma. NFAT5a wird dabei am Cystein an Position 5 palmitoyliert⁸⁸. Um zu untersuchen, ob die Palmitoylierung des entsprechenden Cysteins

Kapitel 6

(Position 81 der Isoform C) für die dehnungsinduzierte Kerntranslokation von NFAT5c von Bedeutung ist, wurde eine *loss-of-function*-Mutante des Transkriptionsfaktors (NFAT5c-Mut81A-DDK) generiert, indem das Cystein an Position 81 gegen Alanin ausgetauscht wurde, um somit die mutmaßliche Palmitoylierung zu verhindern. Nach Überexpression von NFAT5c-DDK bzw. NFAT5c-Mut81A-DDK in HUASMCs konnte in statisch kultivierten und gedehnten Zellen kein Unterschied zwischen beiden Proteinen hinsichtlich der Kerntranslokation detektiert werden (Abb. 28).

6.4.9 Untersuchung des Einflusses der Carnitin-Palmitoyltransferase-Familie 1 (CPT1) auf die dehnungsinduzierte Kerntranslokation von NFAT5

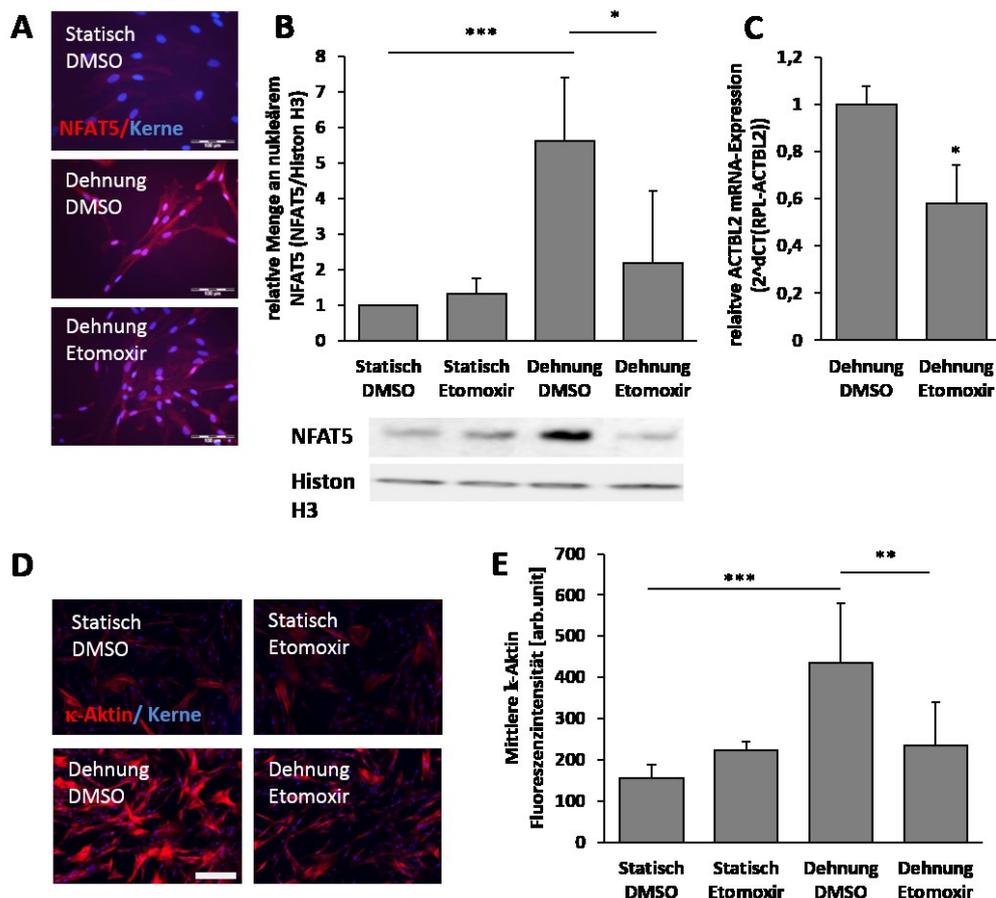


Abb. 29: Analyse der Kerntranslokation von NFAT5 und der NFAT5-abhängigen κ -Aktin-Expression nach Stimulation mit Etomoxir. HUASMCs wurden mit dem Carnitin-Palmitoyltransferase-1-Inhibitor Etomoxir (40 μ M) stimuliert und nach einstündiger Inkubationszeit zyklisch gedehnt (13 % Elongation, 0,5 Hz, 24 h). Nukleäres NFAT5 wurde im Westernblot dargestellt und die Bandenintensität mit Image J quantifiziert (B, *p<0,05 Dehnung DMSO vs. Dehnung Etomoxir, ***p<0,001 Dehnung DMSO vs. Statisch DMSO, n=5) bzw. mittels NFAT5-spezifischer Immunfluoreszenz dargestellt (A, rote Fluoreszenz: NFAT5, blaue Fluoreszenz: Kerne, Maßbalken 100 μ m, n=4, repräsentative Aufnahmen). Die Analyse der ACTBL2-Genexpression erfolgte mithilfe der qPCR. Die Expression von ACTBL2 wurde auf die des housekeeping Gens RPL normalisiert (C, *p<0,05 DMSO vs. Etomoxir, n=3). Die Expressionsanalyse von κ -Aktin (D) erfolgte durch Messung der mittleren Fluoreszenzintensität. Die Grauwerte wurden mit der Cell[^]D-Software in arbiträren Größeneinheiten (arb.units) gemessen (D, rote Fluoreszenz: κ -Aktin, blaue Fluoreszenz: Kerne, E, **p<0,01 Dehnung DMSO, ***p<0,001 Dehnung DMSO vs. Statisch DMSO, n=3, Maßbalken 200 μ m).

Im menschlichen Körper sind etwa 23 verschiedene Palmitoyltransferasen bekannt, die alle durch ein gemeinsames DHHC-Motiv (Aspartat-Histidin-Histidin-Cystein) in einer Cystein-reichen Domäne (etwa 50 Cysteine) charakterisiert werden⁸⁹. Die Familie der Carnitin-Palmitoyltransferasen 1 (CPT1) gehört zu den Palmitoyltransferasen und besteht aus 3 Unterguppen (A, B und C) und kann *in vitro* durch Etomoxir inhibiert werden. Die Blockade der CPT1-Familie führte zu einer verringerten dehnungsinduzierten Kerntranslokation von NFAT5 (Abb. 29A, B). Die relative ACTBL2-mRNA-Expression war in den Etomoxir-behandelten und gedehnten Zellen um den Faktor 2 verringert (Abb. 29C). Auch die NFAT5 abhängige κ -Aktin-Proteinmenge war unter diesen Bedingungen signifikant vermindert (Abb. 29D, E).

6.5 Untersuchung zur Entwicklung von pulmonaler Hypertonie in NFAT5^{-/-}-Mäusen

Zusammengefasst wiesen die *in vitro* Ergebnisse auf eine mögliche Bedeutung von NFAT5 während dehnungsinduzierter Remodellierungsprozesse von arteriellen Blutgefäßen hin. Um die Relevanz von NFAT5 für eine entsprechende pathophysiologische Situationen nachzuweisen, wurden induzierbare glattmuskelspezifisch NFAT5-defiziente Mäuse (nachfolgend als SMC-NFAT5^{-/-} bezeichnet) generiert. Auf Grund der Bedeutung des NFAT5-Zielgens Tenascin-C für die Remodellierung von Pulmonalarterien im Rahmen von pulmonaler arterieller Hypertonie (PAH)⁷⁴ wurde zunächst der Einfluss von NFAT5 in diesem Kontext untersucht.

6.5.1 Darstellung der Proteinexpression von NFAT5 in Pulmonalarterien von SMC-NFAT5^{fl/fl}- und SMC-NFAT5^{-/-}-Mäusen mit pulmonaler Hypertonie

NFAT5 wurde mittels immunhistochemischer Methoden (DAB-Färbung) in Mauslungen detektiert. Während NFAT5 in Endothelzellen der Pulmonalgefäße unabhängig von den experimentellen Bedingungen sporadisch detektiert werden konnte (Abb. 30B und D), war NFAT5 in den glatten Muskelzellen der Pulmonalarterien nach Hypoxie-induziertem pulmonalem Hochdruck in SMC-NFAT5^{fl/fl}-, nicht aber in SMC-NFAT5^{-/-}-Mäusen verstärkt nachweisbar (Abb. 30C,E). Unter Kontrollbedingungen war das Expressionsniveau von NFAT5 in den glatten Gefäßmuskeln der Pulmonalarterien der SMC-NFAT5^{fl/fl}-Mäuse stets gering (Abb. 30A).

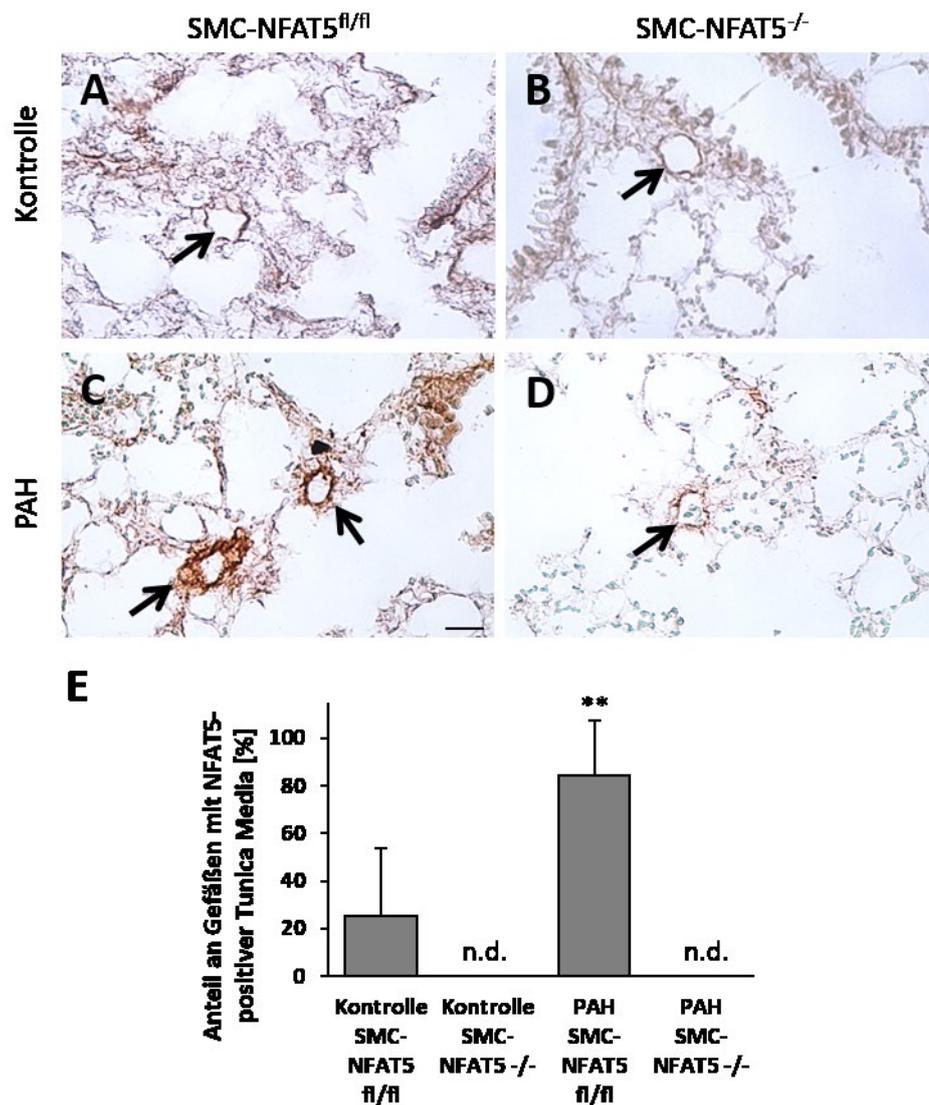


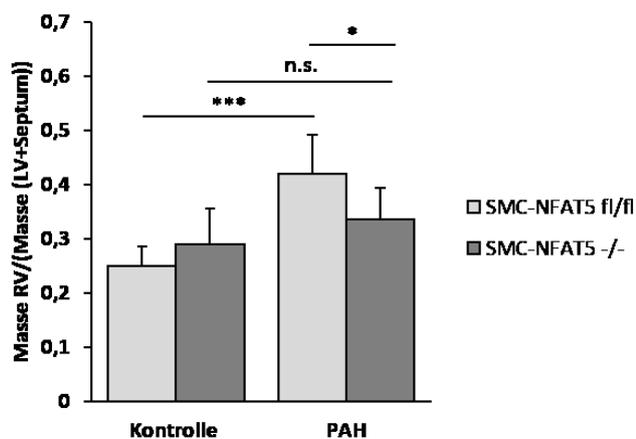
Abb. 30: Darstellung der NFAT5-Proteinmenge in Pulmonalarterien von SMC-NFAT5^{-/-}- und SMC-NFAT5^{fl/fl}-Mäusen mit pulmonaler Hypertonie. Um einen pulmonalen Bluthochdruck in SMC-NFAT5^{fl/fl} und SMC-NFAT5^{-/-}-Mäusen zu induzieren, wurden die Tiere unter hypoxischen Bedingungen gehalten (21 Tage bei 10 % O₂, PAH), die normoxischen Kontrollmäuse bei Raumluft. In Querschnitten der in Zink-fixierten und in Paraffin eingebetteten Lungen wurde die Proteinmenge von NFAT5 mittels DAB-Färbung (3,3'-Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid) visualisiert (A-D, F, braune Färbung = NFAT5, repräsentative Aufnahmen, Pfeile markieren die Pulmonalarterien, Maßbalken: 50 µm, n=5) und der Anteil an Pulmonalarterien bestimmt, bei denen NFAT5 in der *Tunica media* detektiert werden konnte (E, **p<0,01 Kontrolle SMC-NFAT5^{fl/fl} vs. PAH SMC-NFAT5^{fl/fl}). Das Alter der Mäuse betrug bei Beginn des Experiments (Start der Hypoxie) 15 Wochen, bei Versuchsende 18 Wochen.

6.5.2 Bestimmung des Fulton-Indexes als Maß für die Entwicklung einer Rechtsherzhypertrophie

Die PAH führt durch den Blutdruckanstieg in den Lungenarterien zu einer erhöhten Nachlast der rechten Ventrikels²⁰ und langfristig zu einer Rechtsherzhypertrophie. Um in dem angewendeten PAH-Modell das Ausmaß der Hypertrophie des rechten Ventrikels der Tiere zu bestimmen, wurde das Gewichtsverhältnis zwischen rechtem Ventrikel (RV)

und linkem Ventrikel (LV) plus Septum (Fulton Index, FI) in SMC-NFAT5^{fl/fl}- und SMC-NFAT5^{-/-}-Mäusen berechnet.

Abb. 31: **Bestimmung des Fulton Indexes.** Der Fulton Index (Masse (RV))/(Masse LV+Septum)) wurde in SMC-NFAT5^{fl/fl}- und SMC-NFAT5^{-/-}-Mäusen mit pulmonaler Hypertonie sowie in den Kontrolltieren bestimmt (*p<0,05 PAH SMC-NFAT5^{fl/fl} vs. PAH SMC-NFAT5^{-/-}, ***p<0,001 Kontrolle SMC-NFAT5^{fl/fl} vs. PAH SMC-NFAT5^{fl/fl}, n.s., Kontrolle SMC-NFAT5^{-/-} vs. PAH SMC-NFAT5^{-/-}. n.s.= nicht signifikant, n=7-10).



Im Vergleich zu den unter Kontrollbedingungen gehaltenen SMC-NFAT5^{fl/fl}-Mäusen war der FI in den SMC-NFAT5^{fl/fl}-Mäusen mit pulmonaler Hypertension signifikant erhöht. Es konnte kein signifikanter Anstieg des FIs in den SMC-NFAT5^{-/-}-Mäusen mit PAH detektiert werden. Nach PAH war der FI in den SMC-NFAT5^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu den SMC-NFAT5^{fl/fl}-Mäusen jedoch signifikant verringert (Abb. 31).

6.5.3 Untersuchung des Einflusses von NFAT5 auf die Zunahme der arteriellen Wanddicke im PAH-Modell

Bei der pulmonalen Hypertonie proliferieren die glatten Muskelzellen in den kleinen peripheren Pulmonalarterien. Dies führt zu einer Verdickung der *Tunica media* und nachfolgend zu einer Verringerung des Gefäßdurchmessers²⁰. Um die Dicke der Media in den Lungenarterien der SMC-NFAT5^{fl/fl}- bzw. SMC-NFAT5^{-/-}-Mäuse bestimmen zu können, wurde die glatte Muskelzellschicht zunächst mit Hilfe des Markers Calponin per Immunfluoreszenz dargestellt. Die Bestimmung der Dicke der Media zeigte, dass unter Kontrollbedingungen kein Unterschied zwischen SMC-NFAT5^{-/-}-Mäusen und den Kontrolltieren (SMC-NFAT5^{fl/fl}) besteht. Die Mediadicke stieg in den SMC-NFAT5^{fl/fl}-Mäusen mit pulmonaler Hypertonie im Vergleich zu den Kontrolltieren signifikant an. Zwischen SMC-NFAT5^{-/-}-Tieren (PAH- sowie Kontrolltiere) konnte kein signifikanter Unterschied detektiert werden. Nach PAH war die Zunahme der Wanddicke in den SMC-NFAT5^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu den SMC-NFAT5^{fl/fl}-Mäusen jedoch signifikant verringert (Abb. 32).

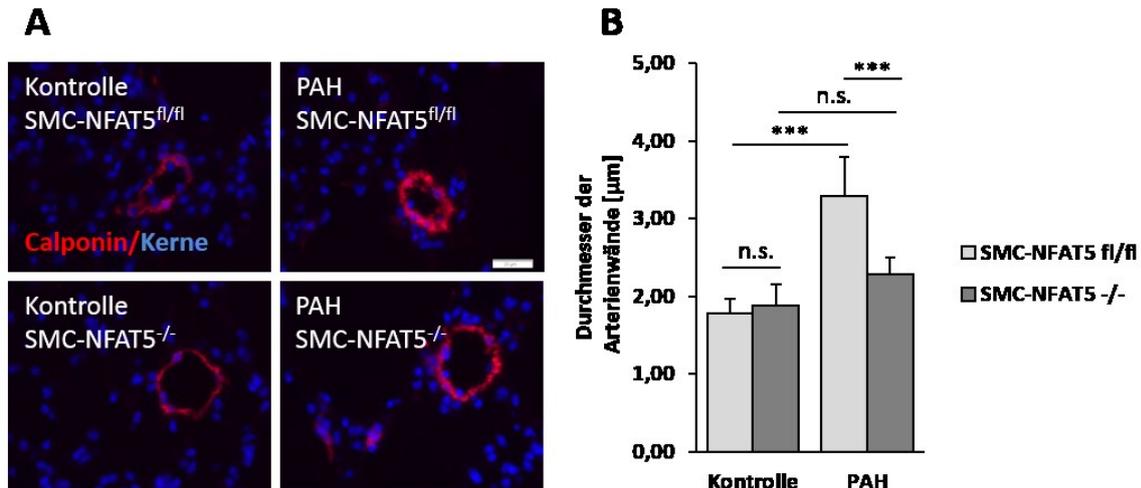


Abb. 32: **Analyse der pulmonalarteriellen Mediadicke bei SMC-NFAT5^{fl/fl}- und SMC-NFAT5^{-/-}-Mäusen mit PAH.** Die glatten Muskelzellen im Lungengewebe von SMC-NFAT5^{fl/fl} bzw. SMC-NFAT5^{-/-}-Mäusen mit pulmonaler Hypertonie sowie von Kontrolltieren wurden mittels Calponin-spezifischer Immunfluoreszenz dargestellt (A, rote Fluoreszenz: Calponin, blaue Fluoreszenz: Kerne, repräsentative Aufnahmen wurden gezeigt, Maßbalken 50 µm). Die Bestimmung der Wanddicke erfolgte mithilfe der Cell[^]D-Software (B, ***p<0,001 Kontrolle SMC-NFAT5^{fl/fl} vs. PAH SMC-NFAT5^{fl/fl}, ***p<0,001 PAH SMC-NFAT5^{fl/fl} vs. PAH SMC-NFAT5^{-/-}, n.s.= Kontrolle SMC-NFAT5^{-/-} vs. PAH SMC-NFAT5^{-/-}. N.s. = nicht signifikant, n=5).

6.5.4 Expressionsanalyse von κ -Aktin in den Pulmonalarterien NFAT5-defizienter Mäuse im PAH-Modell

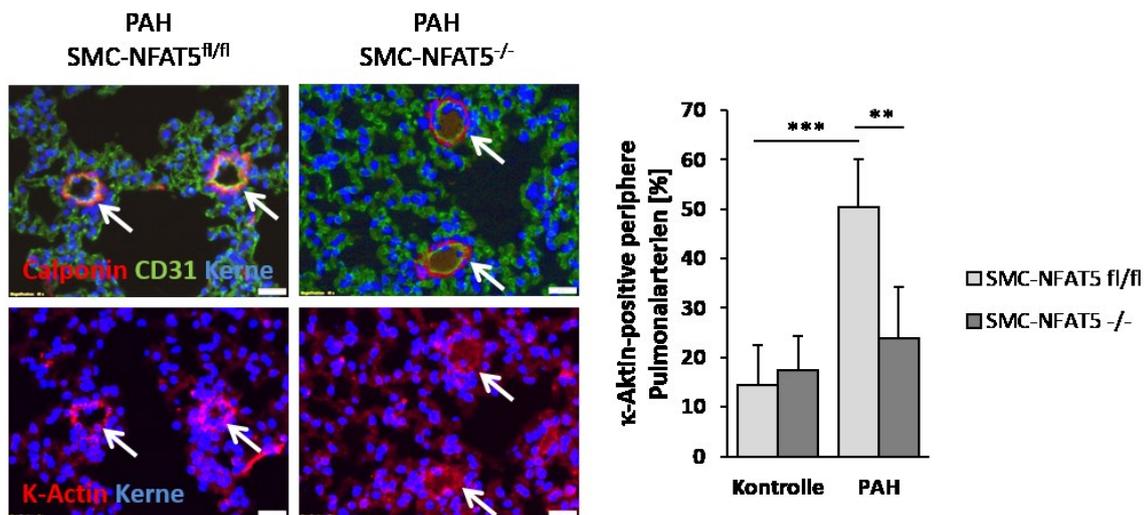


Abb. 33: **Analyse des Einflusses von NFAT5 auf die κ -Aktin Expression in Pulmonalarterien bei PAH.** Lungengewebe von SMC-NFAT5^{fl/fl}- bzw. SMC-NFAT5^{-/-}-Mäusen mit PAH wurde hinsichtlich der Proteinexpression von κ -Aktin immunhistologisch untersucht (A, rote Fluoreszenz (oben): Calponin, rote Fluoreszenz (unten): κ -Aktin, grüne Fluoreszenz: CD31, blaue Fluoreszenz: Kerne. Weiße Pfeile markieren die Arterien, Maßbalken 20 µm). Basierend auf der κ -Aktin-spezifischen Immunfluoreszenz wurde der Anteil der κ -Aktin-positiven Pulmonalarterien bestimmt und in Prozent angegeben. (B, **p<0,01 PAH SMC-NFAT5^{fl/fl} vs. PAH SMC-NFAT5^{-/-}, ***p<0,001 Kontrolle SMC-NFAT5^{fl/fl} vs. PAH SMC-NFAT5^{fl/fl}, n=5).

Die zuvor gezeigten Ergebnisse deuteten darauf hin, dass die Expression von κ -Aktin *in vitro* von der Expression und Aktivität von NFAT5 abhängt. Entsprechend wurde dieses

transkriptionelle Zielgenprodukt von NFAT5 in peripheren Lungengefäßen der PAH-Mäuse (SMC-NFAT5^{fl/fl} und SMC-NFAT5^{-/-}) dargestellt, um indirekt einen Hinweis auf die NFAT5-Aktivität zu bekommen. Das Ergebnis zeigt, dass der prozentuale Anteil von Pulmonalarterien, in denen κ -Aktin mittels Immunfluoreszenz detektiert werden konnte, in den NFAT5-defizienten Tieren signifikant verringert war (Abb. 33).

6.5.5 Untersuchung der Tenascin C-Akkumulation in den Lungen der SMC-NFAT5^{fl/fl}- bzw. SMC-NFAT5^{-/-}-Mäuse

Die Expression von TNC, das als Biomarker der pulmonalen Hypertonie gilt²³, sollte in Abhängigkeit von NFAT5 im PAH-Modell untersucht werden.

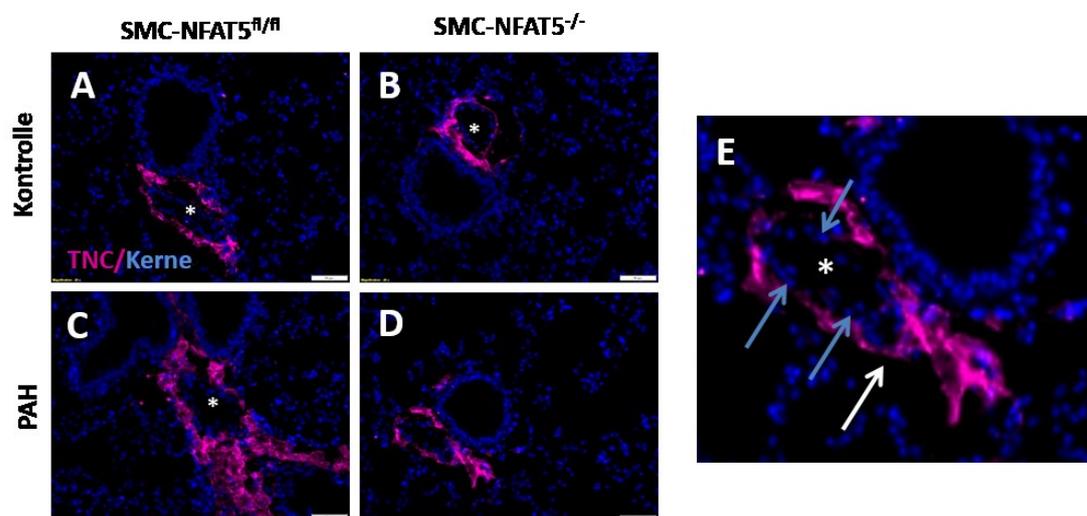
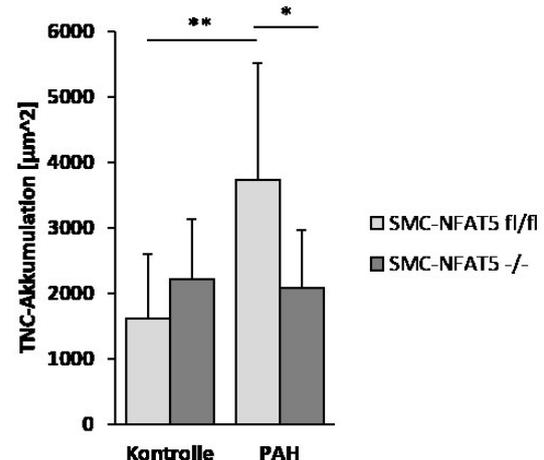


Abb. 34: Analyse der vaskulären TNC-Akkumulation bei PAH in NFAT5-defizienten und Kontrolltieren. Die Menge an extrazellulärem TNC wurde nach spezifischer Immunfluoreszenz in Lungengewebe der SMC-NFAT5^{fl/fl} bzw. SMC-NFAT5^{-/-}-Mäuse untersucht (bei PAH und Kontrollen)(A-D, rote Fluoreszenz: TNC, blaue Fluoreszenz: Kerne, Maßbalken 50 μ m). Die blauen Pfeile der in (E) vergrößerten Aufnahme zeigen die durch DAPI-dargestellten Zellkerne der Arterien, der weiße Pfeil die extrazelluläre TNC-Akkumulation um die Gefäße, *= Lumen). Basierend auf der Fluoreszenzmessung mithilfe der Cell[^]D-Software wurde die TNC-Akkumulation als Fläche in μ m² berechnet (F, *p<0,05 PAH NFAT5^{fl/fl} vs. PAH NFAT5^{-/-}, **p<0,01 Kontrolle NFAT5^{fl/fl} vs. PAH NFAT5^{fl/fl}, n=5).



Die Akkumulation von TNC blieb in den Lungen der SMC-NFAT5^{-/-}-Mäuse mit PAH auf dem Niveau der Kontrollbedingungen. Die gemessene Fläche von vaskulärem TNC stieg in den Lungen der SMC-NFAT5^{fl/fl}-Tiere mit PAH im Vergleich zu den Kontrollen

Kapitel 6

signifikant an. SMC-NFAT5^{-/-}-Mäuse mit PAH wiesen dagegen eine signifikant geringere Akkumulation von TNC auf als die SMC-NFAT5^{fl/fl}-Mäuse (Abb. 34).

6.5.6 Analyse des Einflusses von Hypoxie auf die NFAT5-mRNA-Expression und die Kerntranslokation von NFAT5

Um einen pulmonalen Bluthochdruck in den SMC-NFAT5^{fl/fl}- und SMC-NFAT5^{-/-}-Mäusen zu induzieren, wurden die Tiere im Alter von 15 Wochen für 3 Wochen unter hypoxischen Bedingungen gehalten. Nachfolgend sollte daher untersucht werden, ob die Expression von *NFAT5* sowie die NFAT5-Translokation unter Hypoxie verändert ist. HUASMCs, die für 6 h unter hypoxischen Bedingungen kultiviert wurden, zeigten im Vergleich zu den Kontrollzellen, die unter Standardbedingungen kultiviert wurden, keine Veränderung hinsichtlich der als NFAT5-positiv gewerteten Zellkerne (Abb. 35A). Die relative Menge an NFAT5-mRNA war nach Hypoxie ebenfalls nicht signifikant verändert (Abb. 35B).

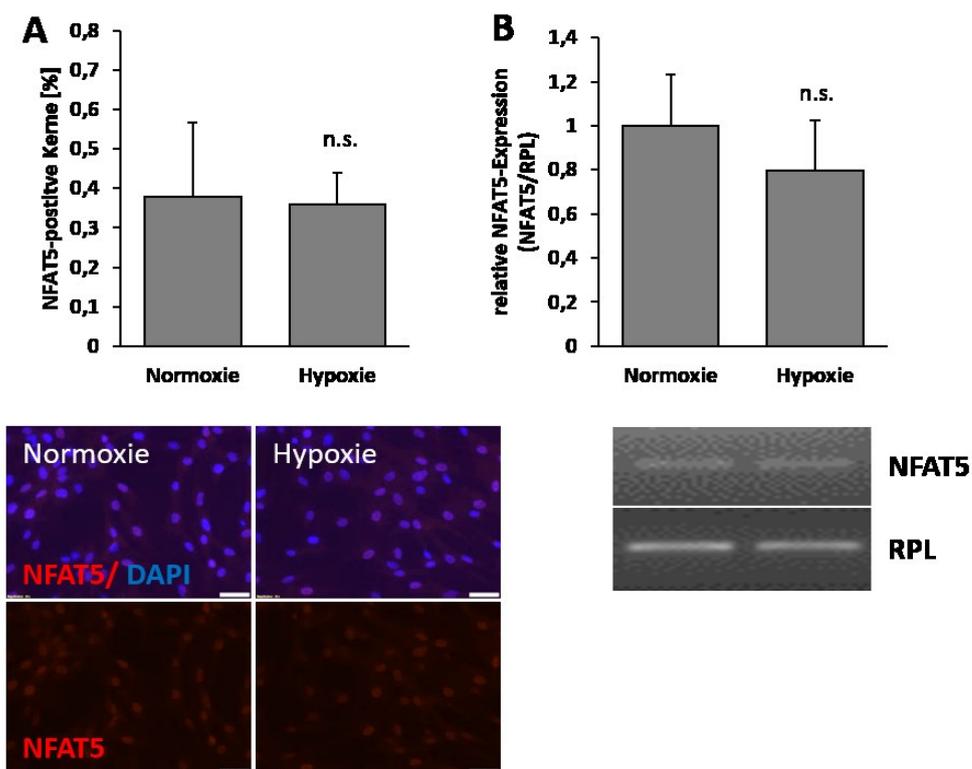


Abb. 35: Analyse der NFAT5-mRNA-Expression und NFAT5-Kerntranslokation unter Hypoxie. HUASMCs wurden 6 h unter hypoxischen Bedingungen (1 % O₂) kultiviert. Anschließend wurde NFAT5 mittels Immunfluoreszenzfärbung dargestellt und der prozentuale Anteil NFAT5-positiver Zellkerne bestimmt (A, NFAT5= rote Fluoreszenz; blaue Fluoreszenz: Kerne, Maßbalken 50 µm, n.s., p>0,05 Normoxie vs. Hypoxie, n=3). Die Analyse der *NFAT5*-Genexpression erfolgte mithilfe der semiquantitativen PCR. Die NFAT5-mRNA-Menge wurde auf die des *housekeeping* Gens *RPL* normalisiert (B, n.s.= nicht signifikant, Normoxie vs. Hypoxie, n=3).

6.6 Analyse einer experimentell induzierten arteriellen Hypertonie in SMC-NFAT5^{-/-}-Mäusen

Die bisher gezeigten Resultate ließen vermuten, dass NFAT5 bei pulmonaler Hypertonie den Gefäßumbau und die Verdickung der pulmonalarteriellen Gefäße fördert. Somit wurde die Hypothese aufgestellt, dass NFAT5 auch für die Pathogenese anderer Bluthochdruckerkrankungen wie z.B. der arteriellen Hypertonie von Bedeutung sein könnte. Daher sollte in den nachfolgenden Untersuchungen geklärt werden, ob der Verlust von NFAT5 die Bluthochdruck-induzierte vaskuläre Remodellierung beeinflusst und nachfolgend die Steigerung des systolischen und diastolischen Blutdrucks.

6.6.1 Analyse des Einflusses von NFAT5 auf den systolischen und diastolischen Blutdruckanstieg im DOCA-Salz-Hypertoniemodell

Zunächst wurde der basale Blutdruck der SMC-NFAT5^{fl/fl}- bzw. SMC-NFAT5^{-/-}-Mäuse mittels Radiotelemetrie ermittelt. Das Ergebnis zeigt keine signifikanten Unterschiede in den systolischen und diastolischen Blutdruckwerten der entsprechenden Tiergruppen. Auch der mittlere arterielle Druck (MAD) beider Tiergruppen wies keinen signifikanten Unterschied auf. Anschließend wurde das DOCA/Salz-Model verwendet, um den arteriellen Blutdruck in den NFAT5-defizienten und Kontrollmäusen zu steigern. Über die gesamte Zeit wurde der Blutdruck kontinuierlich durch die zuvor implantierten Telemetriesonden gemessen. Zusammenfassend zeigt sich, dass sowohl der systolische als auch der diastolische Blutdruck sowie der berechnete mittlere arterielle Druck (MAD) in den SMC-NFAT5^{fl/fl}- und SMC-NFAT5^{-/-}-Tieren unter DOCA/Salz-Behandlung zunahm. Der diastolische Blutdruck der hypertensiven SMC-NFAT5^{-/-}-Tiere blieb dabei auf einem leicht geringeren Niveau (Abb. 36A).

Des Weiteren wurde die dehnungsabhängige myogene Antwort der Mesenterialarterien und somit Kontraktilität der GMZ von SMC-NFAT5^{fl/fl}- und SMC-NFAT5^{-/-}-Tieren *ex vivo* untersucht. Bei steigender transmuraler Druckdifferenz, die auf die Mesenterialarterien wirkte, war die relative Zunahme des Gefäßdurchmessers in beiden Tiergruppen vergleichbar und wies keine signifikanten Unterschiede auf (Abb. 36B).

Kapitel 6

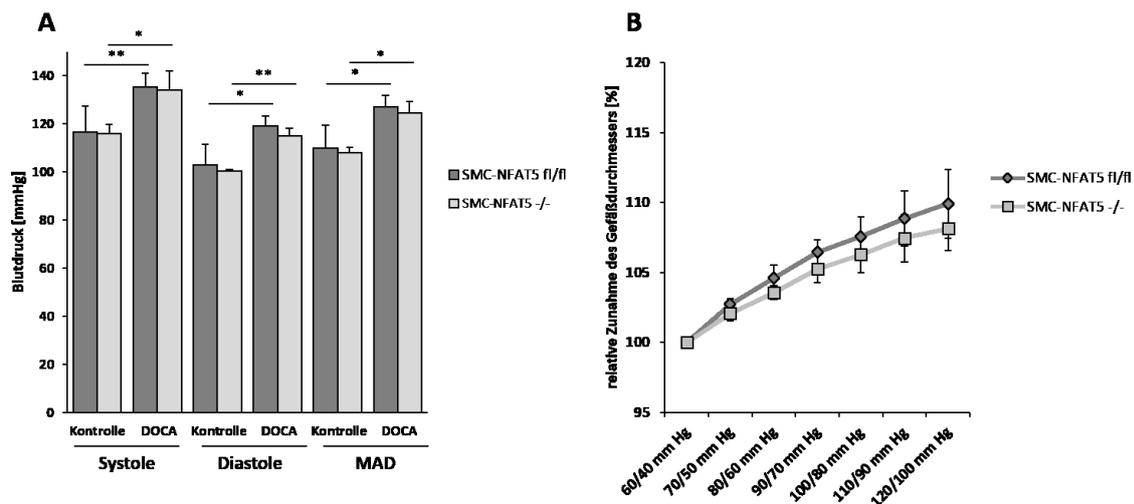


Abb. 36: **Messung des systolischen und diastolischen Blutdrucks im DOCA/Salz-Hypertoniemodell und Bestimmung der Kontraktionsfähigkeit von Widerstandsgefäßen.** Nach Implantation von Radiotelemetrieesonden erfolgte die Messung des basalen Blutdrucks in NFAT5^{fl/fl}- und NFAT5^{-/-}-Mäusen über 5 Tage (jeweils zwölfstündiger Tag und Nachtrhythmus) sowie nach subkutaner Implantation der DOCA-Pellets kontinuierlich über einen Zeitraum von 10 Tagen. Dabei wurden die systolischen und diastolischen Blutdruckwerte alle 30 Min. für 5 Min. aufgezeichnet und der mittlere arterielle Druck (MAD) berechnet. Die basale Herzfrequenz lag bei $517 \pm 20 \text{ min}^{-1}$ (SMC-NFAT5^{fl/fl}) bzw. bei $514 \text{ bpm} \pm 25 \text{ min}^{-1}$ (SMC-NFAT5^{-/-})(A, ** $p < 0,01$ Systole Kontrolle SMC-NFAT5^{fl/fl} vs. Systole DOCA SMC-NFAT5^{fl/fl}, * $p < 0,05$ Systole Kontrolle SMC-NFAT5^{-/-} vs. Systole DOCA SMC-NFAT5^{-/-}; * $p < 0,05$ Diastole Kontrolle SMC-NFAT5^{fl/fl} vs. Diastole DOCA SMC-NFAT5^{fl/fl}, ** $p < 0,01$ Diastole Kontrolle SMC-NFAT5^{-/-} vs. Diastole DOCA SMC-NFAT5^{-/-}, * $p < 0,05$ MAD Kontrolle SMC-NFAT5^{fl/fl} vs. MAD DOCA SMC-NFAT5^{fl/fl}, * $p < 0,05$ MAD Kontrolle SMC-NFAT5^{-/-} vs. MAD DOCA SMC-NFAT5^{-/-}. Alle statistischen Vergleiche zwischen NFAT5-defizienten und Kontrolltieren waren nicht signifikant, $n = 3$ (SMC-NFAT5^{-/-}), $n = 5$ (SMC-NFAT5^{fl/fl}). Mesenterialarterien von SMC-NFAT5^{fl/fl}- bzw. SMC-NFAT5^{-/-}-Mäusen wurden *ex vivo* perfundiert und der transmurale Druck kontinuierlich erhöht. Nach jeder Druckerhöhung wurde der Gefäßdurchmesser bestimmt und die relative Zunahme, der sich auf den Startwert bezieht, dargestellt (B, $n = 5$).

6.6.2 Bestimmung der Bluthochdruck-induzierten Proliferation von glatten Gefäßmuskelzellen der Femoralarterie im DOCA/Salz-Hypertonie -Modell

Der Umbau der arteriellen Gefäße bei Bluthochdruck ist unter anderem durch eine Proliferation der glatten Muskelzellen in der *Tunica media* charakterisiert⁹⁰. Als Marker für die Proliferation der Gefäße wurde PCNA gewählt, das in proliferierenden Zellen im Kern lokalisiert werden kann. In den Femoralarterien der hypertensiven SMC-NFAT5^{fl/fl}-Tiere konnten im Vergleich zu Kontrollen signifikant mehr PCNA-positive Zellkerne gezählt werden. Im Vergleich dazu war die Zunahme der PCNA-positiven Zellkerne in den Femoralarterien der hypertensiven SMC-NFAT5^{-/-}-Mäuse signifikant verringert. In den behandelten (DOCA) SMC-NFAT5^{-/-}-Tieren konnte im Vergleich zu unbehandelten SMC-NFAT5^{-/-}-Tieren zwar tendenziell eine Erhöhung der PCNA-positiven Zellen beobachtet werden, es wurde jedoch keine statistische Signifikanz erreicht (Abb. 37).

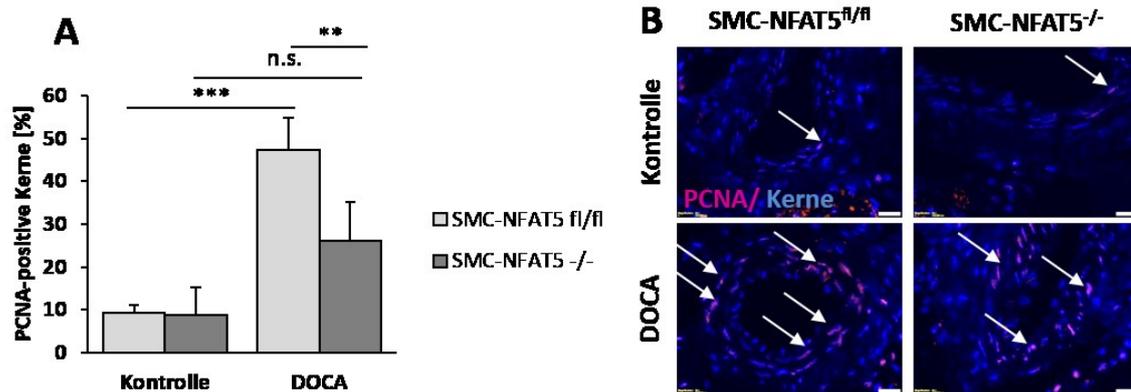


Abb. 37: Expressionsanalyse des Proliferationsmarkers PCNA in Femoralarterien von hypertensiven SMC-NFAT5^{fl/fl}- und SMC-NFAT5^{-/-}-Mäusen. 10 Tage nach Beginn der DOCA/Salz-Behandlung in SMC-NFAT5^{fl/fl}- und SMC-NFAT5^{-/-}-Mäusen wurden die Femoralarterien der Tiere entnommen und hinsichtlich ihres Proliferationsverhaltens untersucht. Die Anzahl von PCNA (Proliferationsmarker)- positiven Zellkernen (B, rote Fluoreszenz: PCNA, blaue Fluoreszenz: Kerne, weiße Pfeile markieren PCNA-positive Zellkerne, Maßbalken 20 μ m), wurde ermittelt und prozentual dargestellt (A, **p<0,01 DOCA SMC-NFAT5^{fl/fl} vs. DOCA SMC-NFAT5^{-/-}, ***p<0,001 Kontrolle SMC-NFAT5^{fl/fl} vs. DOCA SMC-NFAT5^{fl/fl}, n.s Kontrolle NFAT5^{-/-} vs. DOCA NFAT5^{-/-}, n=5).

Kapitel 7

7 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss des Transkriptionsfaktors NFAT5 auf Bluthochdruck-induzierte arterielle Gefäßumbauprozesse untersucht. Zu diskutieren sind dabei biomechanisch stimulierte Mechanismen, die auf der Ebene der Expression/Synthese, der Lokalisation und Proteinmodifikation die Aktivierung von NFAT5 regulieren. Darüber hinaus soll im Folgenden die physiologische Bedeutung der durch NFAT5-Aktivierung bedingten funktionellen Veränderungen des glattmuskulären Phänotyps betrachtet werden.

7.1 Regulation der Aktivität von NFAT5 in glatten Gefäßmuskelzellen nach biomechanischer Belastung

NFAT5 dient als essentieller Transkriptionsfaktor der zellulären Osmoprotektion⁴⁹. Osmotischer Stress führt zu einer erhöhten NFAT5-mRNA Menge und einer verstärkten Proteinsynthese⁹¹, sowie zu dessen Translokation in den Zellkern^{55,92}. Genprodukte wie die Aldose-Reduktase oder der Taurintransporter, die durch NFAT5 reguliert werden, dienen der Osmoadaption und somit der Protektion der Zellen. Es ist bereits bekannt, dass NFAT5 auch in GMZ exprimiert wird⁶⁶ und dort unter anderem durch biomechanische Dehnung der Zellen aktiviert wird⁶⁷. Die genauen Mechanismen, die zu dieser Art von Aktivierung führen, sind noch weitgehend unerforscht. Sie weisen jedoch Unterschiede zur Regulation von NFAT5 unter osmotischem Stress auf, auf die im Folgenden eingegangen werden soll.

7.1.1 Regulation der Aktivität von NFAT5 durch Expression, Synthese bzw. Abbau

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass biomechanische Dehnung von vaskulären GMZ im Vergleich zu statisch kultivierten Kontrollzellen zu einer zweifach erhöhten Menge der NFAT5-mRNA führt. Der Grad des Anstiegs der mRNA-Menge nach hyperosmolarer Stimulation ist vergleichbar⁹³. Dieser Beobachtung liegt eine Stabilisierung der NFAT5-mRNA zugrunde⁹¹, u.a. vermittelt durch die bei osmotischen Stress aktivierte *focal-adhesion-kinase* (FAK). Diese stabilisiert die NFAT5-mRNA an der 3' untranslationierten Region (3'UTR)⁹³. Im Gegensatz dazu postulieren Cai *et al.*, dass die NFAT5-mRNA unter osmotischem Stress im Bereich der 5'UTR stabilisiert wird, wohingegen Adenylat/Uridylat-reiche Elemente (ARE) in der 3'UTR der mRNA destabilisierend wirken, in der Summe jedoch die Stabilisierung in der 5'UTR überwiegt.

Obwohl die FAK auch in biomechanisch aktivierten GMZ aktiviert wird⁹⁴, konnte in diesem Kontext in eigenen Untersuchungen keine Beeinflussung der Stabilität der NFAT5-mRNA nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

In arteriellen GMZ führte die Dehnungsstimulation neben einer vermehrten NFAT5-mRNA- auch zu einer erhöhten NFAT5-Proteinsynthese. Dies wurde auch unter hyperosmolarer Stimulation beobachtet⁹⁵. Des Weiteren scheint die Proteinstabilität von NFAT5 in arteriellen GMZ von der proteasomalen Aktivität abhängig zu sein. Das Proteasom dient dem gerichteten proteolytischen Abbau von Proteinen^{79,96,97}, die zuvor über mehrere Teilschritte mithilfe der Ligasen E1-E3 durch eine kovalente Isopeptidbindung mehrfach an Lysinresten ubiquitiniert werden⁹⁷⁻⁹⁹. Die bioinformatische Analyse der möglichen Ubiquitinierungsstellen des NFAT5-Proteins mithilfe des UbPred-Programms¹⁰⁰ sagte eine Gesamtzahl von 8 Lysinen vorher, die ubiquitiniert werden können. Entsprechend führte die Inhibition des 26S-Proteasoms in arteriellen GMZ sowohl zu einer Erhöhung der Proteinmenge von NFAT5 im Zytoplasma als auch im Zellkern. Da üblicherweise nur wenig NFAT5 in unstimulierten arteriellen GMZ detektiert werden konnte, deutet dieses Ergebnis darauf hin, dass NFAT5 konstant dem proteasomalen Abbau unterliegt. Diese Hypothese wird zusätzlich durch die Beobachtung gestützt, dass die NFAT5-mRNA unter den verwendeten experimentellen Bedingungen ebenfalls ständig neu synthetisiert wird.

Die erhöhte nukleäre Proteinmenge nach Inhibition des Proteasoms war jedoch nicht mit einer erhöhten transkriptionellen Aktivität von NFAT5 verbunden, wie exemplarische Analysen der mRNA-Expression von NFAT5-Zielgenen wie *TNC* zeigten (Daten nicht gezeigt). Eine Studie, in der mit Hilfe von *Madin-Darby canine kidney epithelial cells (MDCK)* unter isotonen Bedingungen eine Erhöhung der Proteinmenge von NFAT5 nachgewiesen wurde, zeigte ebenfalls keine Veränderung der transkriptionellen Aktivität¹⁰¹. Jedoch wurde in diesem Zusammenhang beobachtet, dass sich die durch osmotischen Stress induzierte Translokation von NFAT5 in den Zellkern nach Inhibition des Proteasoms verminderte¹⁰². Auch Studien in Kardiomyozyten belegen die Abhängigkeit von NFAT5 von der Aktivität des Proteasoms, da dessen Aktivierung durch Doxorubizin zu einer erhöhten Degradation von NFAT5 führt¹⁰³.

Kapitel 7

7.1.2 *Regulation der Aktivität von NFAT5 durch Lokalisation*

Neben den zuvor erwähnten Mechanismen wurde im Rahmen der Arbeit eine deutliche Akkumulation von NFAT5 in Kernen dehnungsstimulierter GMZ nachgewiesen. Ebenso wurde gezeigt, dass NFAT5 unter hyperosmolaren Bedingungen verstärkt im Zellkern vorliegt⁹⁵. Eigene Untersuchungen in unstimulierten arteriellen GMZ zeigen zunächst, dass NFAT5 unter basalen Bedingungen im Zytoplasma als auch im Zellkern vorliegt. Dies lässt darauf schließen, dass NFAT5 in arteriellen GMZ einem Gleichgewicht zwischen Kernimport und Kernexport unterliegt. Der Export aus dem Kern scheint hierbei insbesondere durch das N-terminale nukleäre Exportsignal (NES) reguliert zu werden. Dafür spricht auch das Ergebnis einer exemplarischen Untersuchung, die zeigte, dass NFAT5 nach Stimulation mit Leptomycin B (einem NES-Inhibitor) nahezu exklusiv im Zellkern detektiert wird (Daten nicht gezeigt). Auch in anderen Zelltypen wie z.B. in *inner medullary collecting duct cells* (IMCD) wurde NFAT5 sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma lokalisiert¹⁰⁴. Für NFAT5 wird in diesen Zellen ein bidirektionaler Transport vermutet, bei dem der Export durch das NES gesteuert wird⁵⁵. Das nukleäre Lokalisationssignal (NLS) gilt dabei als erforderliche Erkennungssequenz für die Kerntranslokation. Tong *et al.* postulieren zudem einen NES-unabhängigen Export von NFAT5 aus dem Zellkern unter hypoosmolaren Bedingungen. In diesem Kontext scheint eine *auxiliary export domain* (AED) Voraussetzung für den Export zu sein. Unklar ist dabei jedoch, ob die AED unter hypoosmolarer Stimulation modifiziert wird (z.B. durch Phosphorylierung) und so das NLS durch eine Konformationsänderung des Proteins nachfolgend sterisch blockiert oder aber zugänglich gemacht wird für Proteine, die den Export von NFAT5 aus dem Zellkern bewirken⁵⁵.

Wie eigene Untersuchungen zeigen konnten, differieren auch die Isoformen (Spleißvarianten) von NFAT5 hinsichtlich ihrer Lokalisation und Expression in GMZ. Es ist bekannt, dass alternatives Spleißen der prä-mRNA zu mRNA-Varianten mit unterschiedlichen Basensequenzen führt¹⁰⁵. Somit können aus einem Gen nach der Translation dieser Spleißvarianten Proteinisoformen entstehen, die sich sowohl in der Struktur als auch in der Funktion und Regulation unterscheiden können. Man spricht in diesem Zusammenhang von Proteindiversität¹⁰⁶. Durch alternatives Spleißen können vier unterschiedliche Proteinisoformen von NFAT5 (Isoform A – D) gebildet werden¹⁰⁷.

Lee *et al.* verneinen zwar die Expression der Isoform B in humanen Zellen, es werden jedoch in der entsprechenden Publikation selbst keine dies bestätigenden Daten gezeigt⁹². Die Funktionen der einzelnen Isoformen sind bislang weitestgehend ungeklärt. Während das basale Expressionsniveau der Isoformen A und C in arteriellen GMZ vergleichbar war, stieg in gedehnten GMZ die relative Menge der mRNA der Isoform C fast zweifach an, während die der Isoform A deutlich abfiel. Es wurde bereits gezeigt, dass auch im murinen fetalen und adulten Gehirn eine Diskrepanz hinsichtlich des Expressionsniveaus der Isoform A besteht¹⁰⁸. Im fetalen Gehirn wird die Isoform A auf mRNA-Ebene dominant exprimiert, wohingegen diese Variante im adulten Gehirn nicht zu detektieren ist. Die Expressionsniveaus in anderen Geweben wie Lunge oder Niere zeigen dagegen keinen Unterschied zwischen fetalem und adultem Gewebe.

Die Überexpression von NFAT5a und NFAT5c in HeLa-Zellen zeigt, dass beide Isoformen zwischen Zellkern und Zytoplasma verteilt vorliegen und bei osmotischem Stress verstärkt in den Zellkern wandern⁸⁵. Im Gegensatz dazu postulieren Eisenhaber *et al.*, dass NFAT5c (und auch NFAT5b) diffus im Zytoplasma vorliegt und durch osmotischen Stress eine erhöhte nukleäre Translokation induziert wird⁸⁸. NFAT5a wurde sowohl an der Plasmamembran, im endoplasmatischen Retikulum als auch im Golgi-Apparat lokalisiert. Interessanterweise unterliegt nur membrangebundenes NFAT5a einer durch Hyperosmolarität induzierten Kerntranslokation. Eisenhaber *et al.* weisen darauf hin, dass die Membranverankerung somit auch begrenzend auf den Import von NFAT5 in den Zellkern wirken könnte. In arteriellen GMZ ist NFATc diffus im Zytoplasma sowie partiell und unter Dehnung verstärkt im Zellkern lokalisiert. Im Gegensatz dazu konnte NFAT5a unter allen experimentellen Bedingungen exklusiv im Zytoplasma detektiert werden. Dieses Ergebnis deutet auf eine unterschiedliche Regulation von NFAT5a und NFAT5c bei Dehnung hin, die sich auch von der osmotischen Regulation von NFAT5 unterscheidet.

Die Proteinsequenzen von NFAT5a und NFAT5c differieren in der N-terminalen Sequenz, die bei NFAT5a um 76 Aminosäuren verkürzt ist⁹². In dieser Sequenz befindet sich jedoch das zuvor beschriebene nukleäre Exportsignal, das somit bei der Isoform A fehlt. So ist es denkbar, dass eine dehnungsstimulierte Inhibition des NES von NFAT5c an dessen nukleärer Lokalisation beteiligt sein könnte, während NFAT5a unter diesen Bedingungen im Zytoplasma verbleibt. Osmotischer Stress führt zu einer Aktivierung von

Kapitel 7

Nukleoporin 88 (Nup88), das durch eine hemmende Wirkung auf den *chromosomal maintenance 1* (CRM1)-vermittelten Protein-Export¹⁰⁹ zu einer Retention NFAT5 im Zellkern führt. Eine Inhibition von Nup88 reduziert zudem die Kernlokalisierung von NFAT5 unter osmotischem Stress¹¹⁰. Diese Ergebnisse basieren auf der Analyse eines überexprimierten verkürzten NFAT5-Proteins, welche das NES, die AED sowie das NLS von NFAT5 (Isoform B-D) aufweisen. Die Expression von Nup88 in glatten Muskelzellen – vor allem im hypertensiven Kontext - wurde bislang nicht untersucht. Neben der Bedeutung des NES der Isoform C könnte zudem die Bindung an die Zellmembran der Isoform A die Unterschiede hinsichtlich der Kerntranslokation beider Isoformen erklären.

7.1.3 *Regulation der Aktivität von NFAT5 durch Proteinmodifikation*

Die Kerntranslokation von Proteinen wird u.a. durch posttranslationale Proteinmodifikationen wie z.B. Palmitoylierung oder Phosphorylierung reguliert. Eine entsprechende, insbesondere für NFAT5c relevante Modifikation scheint aufgrund der in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse eine Palmitoylierung zu sein, die für die Kerntranslokation von NFAT5 nach biomechanischer Dehnung essentiell zu sein scheint. Die Inhibition der Palmitoylierung in vaskulären GMZ beeinflusste hingegen das basale Gleichgewicht von NFAT5c zwischen Kern- und Zytoplasmalokalisation nicht. Nach Eisenhaber *et al.* scheint eine klassische N-terminale Lipidmodifikation von NFAT5a (Myristylierung an Glycin-2 und nachfolgender Palmitoylierung von Cystein-5) Bedingung für die Verankerung von NFAT5a an die Plasmamembran zu sein. Nur plasmamembrangebundenes NFAT5a könne demnach nach hyperosmolarer Stimulation in den Kern translozieren. Eine entsprechende Mutation des Cystein-81, das aufgrund der zusätzlichen 76 Aminosäuren am N-Terminus von NFAT5c dem Cystein-5 im NFAT5a-Protein entspricht, beeinflusste die dehnungsinduzierte Kerntranslokation von NFAT5c jedoch nicht.

Weitere *in silico*-Analysen zur Identifizierung von Palmitoylierungsstellen im NFAT5c-Protein durch das CSS-Palm 2.0 Programm¹¹¹ ergaben, dass eine klassische N-terminale Lipidmodifikation an dieser Position aus sterischen Gründen womöglich auch nicht gegeben ist, da die dafür benötigten Aminosäuren Cystein und Glycin nicht wie bei NFAT5a am N-terminalen Ende von NFAT5c lokalisiert sind. Hingegen wurde eine hohe

Palmitoylierungswahrscheinlichkeit an Cystein-5 sowie an Cystein-96 für NFAT5a bzw. Cystein-172 für NFAT5c (Cystein-96 der Isoform A entspricht Cystein-172 der Isoform C) errechnet (Daten nicht gezeigt). Grundsätzlich konnte jedoch durch die CLICK-Reaktion^{112,113} direkt nachgewiesen werden, dass NFAT5 in GMZ sowohl unter basalen Bedingungen als auch nach Dehnung im Kern und im Zytoplasma palmitoyliert vorliegt. Obwohl durch die CLICK-Reaktion nicht hinsichtlich der möglichen Isoformen von NFAT5 unterschieden werden konnte, kann jedoch - basierend auf der vorherigen Analysen - angenommen werden, dass es sich bei nukleärem palmitoyliertem NFAT5 hauptsächlich um die Isoform C handelt. Ausgehend von den kalkulierten Daten, die für NFAT5c nur eine relevante Palmitoylierungsstelle vorhersagen, ist es wahrscheinlich, dass NFAT5c an Cystein-172 konstant palmitoyliert vorliegt.

Neben der klassischen Funktion der Palmitoylierung als Voraussetzung für eine Membranverankerung⁸⁷ sind mittlerweile weitere Funktionen einer Palmitoylierung von Proteinen in Zellen bekannt^{112,114,115}. So wurde beispielsweise nachgewiesen, dass palmitoyliertes Cystein den Zugang von Proteinkinasen zu umliegenden Phosphorylierungsstellen verbessern oder begrenzen kann. Entsprechend führt z.B. die Mutation des sonst palmitoylierten Cysteins im C-terminalen Ende des β 2-Adrenorezeptors zu einer verstärkten basalen Phosphorylierung, was zur Inaktivierung des Rezeptors führt¹¹⁶. Da Cystein-172 von NFAT5c auf beiden Seiten von einem Serin flankiert ist (...SEQSCSMWME...), ist es möglich, dass die Palmitoylierung des NFAT5c-Proteins den Phosphorylierungsstatus der umliegenden Serin-Aminosäuren beeinflusst.

Eine Voraussetzung für die Protein-Palmitoylierung ist die Aktivität der Palmitoyltransferasen. Tatsächlich wurde in biomechanisch stimulierten arteriellen GMZ eine erhöhte Menge der mRNA der Carnitin-Palmitoyltransferase 1A gezeigt⁶⁷. Davon ausgehend wurde hier ermittelt, ob insbesondere diese Enzymfamilie (CPT1A-C) relevant für die Palmitoylierung von NFAT5 ist. Die Inhibition der CPT1 durch Etomoxir verringerte die dehnungsinduzierte Kerntranslokation von NFAT5 sowie als Konsequenz die NFAT5-abhängige *ACTBL2*-Expression. Da eine direkte Wirkung von CPT1 auf die NFAT5-Aktivität auf Basis dieses Ansatzes noch nicht zweifelsfrei gezeigt wurde, ist ebenfalls ein indirekter metabolisch bedingter Einfluss zu diskutieren, da die Enzyme der CPT1-Familie, die in der äußeren mitochondrialen Membran verankert sind, als essentiell

Kapitel 7

für die mitochondriale β -Oxidation gelten und die mitochondriale Aufnahme von langkettigem Acyl-CoA regulieren. In diesem Zusammenhang wurde beispielsweise in pulmonalen glatten Muskelzellen gezeigt, dass die Aktivität der CPT1-Enzyme in der mitochondrialen Membran die Fettsäure-Oxidation steigert und bei pulmonalem Bluthochdruck zu einer metabolischen Dysfunktion führt¹¹⁷.

Als weitere entscheidende posttranslationale Modifikation, um die Kerntranslokation von Proteinen zu beeinflussen, gilt die reversible Proteinphosphorylierung¹¹⁸⁻¹²⁰. Die Aminosäuren Serin, Tyrosin und Threonin können spezifisch von Proteinkinasen phosphoryliert sowie von Phosphatasen dephosphoryliert werden¹¹⁹. Mit Hilfe der 2D-Gelelektrophorese konnte nachgewiesen werden, dass die Nettoladung von NFAT5 beim Vergleich von zytosolischen und nukleären Proteinlysaten in dehnungsstimulierten arteriellen GMZ unterschiedlich ist (Verschiebung des isoelektrischen Punkts). Aufgrund vorangegangener Analysen kann hier angenommen werden, dass es sich hauptsächlich um die Isoform C handelt. So war der isoelektrische Punkt des zytosolischen NFAT5 niedriger als der des nukleären NFAT5, was auf eine verstärkte Phosphorylierung des zytosolischen Proteins hindeutet. Für nukleäres NFAT5 wurden in diesem Zusammenhang drei Proteinspots detektiert, die sich um etwa 10 kDa in ihrer Molekülmasse unterscheiden. Entsprechend wurden auch im Rahmen anderer proteinbiochemischer Untersuchungen (z.B. CLICK-Reaktion) mehrere Banden für NFAT5 detektiert. Eine generelle Erhöhung der Molekülmasse von nukleärem NFAT5 konnte von unserer Arbeitsgruppe in dehnungsstimulierten arteriellen GMZ bereits nachgewiesen werden⁶⁷. Auf welcher posttranslationalen Modifikation diese Unterschiede in der Molekülmasse beruhen, konnte allerdings nicht geklärt werden.

Bezüglich der Phosphorylierung von NFAT5c wurde in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der 2D-Gelelektrophorese im Zytosol der dehnungsstimulierten arteriellen GMZ ein Anstieg von an Serin-1197 phosphoryliertem NFAT5 beobachtet. Das so modifizierte NFAT5 befand sich ausschließlich im Zytosol, nicht aber im Zellkern. Demnach schien die Kerntranslokation von NFAT5 durch diese Phosphorylierung unterbunden zu werden. Mithilfe der Überexpression einer NFAT5c-1197E-Mutante (Phosphomimetikum) konnte diese Vermutung bestätigt werden. Umgekehrt zeigte die phosphorylierungsdefiziente NFAT5c-1197A-Mutante eine verstärkte Kernlokalisierung

bereits unter Kontrollbedingungen, was auf eine leichte Verschiebung des Gleichgewichts zwischen zytosolischem und nukleärem NFAT5c bereits unter statischen Bedingungen hinweist. Insofern scheint die Phosphorylierung von NFAT5c am Serin-1197 ein Kontrollmechanismus zu sein, um den dehnungsinduzierten Kernimport von NFAT5c zu begrenzen.

Dieser Befund steht jedoch in einem gewissen Gegensatz zu Beobachtungen, die in *Human Embryonic Kidney* (HEK293)-Zellen hinsichtlich der Funktion der 1197-Serinphosphorylierung von NFAT5c bei osmotischem Stress gemacht wurden⁸⁶. Hier wurde postuliert, dass ein Austausch des Serins an Position 1197 durch ein Alanin zu einem Verlust der transkriptionellen Aktivität bei osmotischem Stress führt. Eine verstärkte Phosphorylierung von NFAT5 am Serin-1197 bei osmotischem Stress wurde jedoch nicht untersucht. Andererseits wird durch eine Phosphorylierung von NFAT5c an Serin-155 durch eine noch unbekannte Kinase und nachfolgend an Serin-158 durch die Casein Kinase-1⁵⁴ unter hypoosmolaren Bedingungen der Export aus dem Zellkern verstärkt. Bei den anderen Mitgliedern der NFAT-Familie (NFAT1-4) wird die Translokation in den Zellkern durch eine Proteinphosphorylierung dagegen (ebenso wie Phosphorylierung von NFAT5c am Serin-1197) vermindert. Das NLS von NFAT1-4 wird dabei durch Phosphorylierung maskiert und die Transkriptionsfaktoren verbleiben im Zytoplasma¹²¹. Für den nukleären Import bedarf es einer Demaskierung des NLS, d.h. einer Dephosphorylierung durch Calcineurin, einer Calcium-abhängigen Serinphosphatase. Die Kerntranslokation von NFAT5 findet jedoch Calcineurin-unabhängig statt, da dieses keine Bindestelle für Calcineurin aufweist^{52,67}. Es ist jedoch denkbar, dass bei Dehnung eine bislang noch unbekannte Phosphatase das im Zytoplasma lokalisierte NFAT5c dephosphoryliert und so dessen Kerntranslokation ermöglicht wird.

Obwohl zunächst vermutet, ist in gedehnten glattmuskulären Zellen die Aktivität der *c-Jun-N-terminal kinase* (JNK) nicht für die Phosphorylierung von NFAT5c an Serin-1197 verantwortlich⁶⁷. Demzufolge führte eine spezifische Hemmung der Kinase in gedehnten arteriellen GMZ auch nicht zu einer verstärkten Kerntranslokation des DDK-markierten NFAT5c (Daten nicht gezeigt). De facto führte die Inhibition der JNK aber zu einer Reduktion der Gesamtmenge des NFAT5-Proteins sowie zu einer verminderten mRNA-

Kapitel 7

Expression des Zielgens *TNC*, sodass von einer indirekten Beeinflussung der Phosphoserin-1197-NFAT5-Menge in den GMZ auszugehen ist. In der Literatur gibt es sowohl Studien, die eine erniedrigte Aktivität von NFAT5 nach Inhibition der JNK bzw. eine JNK-unabhängige Regulation der NFAT5-Aktivität belegen^{122,123}, sodass es weiterer Untersuchungen zur vollständigen Aufklärung eines JNK-abhängigen Regulationsmechanismus bedarf.

Hingegen zeigen die weiteren Mutationsstudien dieser Arbeit, dass die Phosphorylierung von NFAT5c am Tyrosin-143 für dessen dehnungsinduzierten Kernimport benötigt wird. Bei osmolarem Stress wird Tyrosin-143 durch die c-Abl-Kinase phosphoryliert⁵⁷, Phospholipase- γ 1 wird dabei als möglicher Bindungspartner des an dieser Position phosphorylierten NFAT5c beschrieben⁵⁸. Entsprechend war der Kernimport von NFAT5 in den gedehnten arteriellen GMZ nach *knockdown* von *c-Abl* deutlich reduziert. Aufgrund der Grundlage der hier erzielten Daten ist hier ebenfalls anzunehmen, dass es sich dabei vorrangig um die Isoform C handelt. In ähnlicher Weise konnte der Multikinase-Inhibitor Dasatinib^{124,125} aufgrund seiner inhibitorischen Effekte auf die aktive c-Abl-Kinase *in vitro* die Kerntranslokation von NFAT5 und die dehnungsstimulierte, NFAT5-abhängige Transkription von *ACTBL2* vermindern. Anzumerken ist jedoch, dass Dasatinib neben der Inaktivierung von cAbl auch die Kinase c-Kit¹²⁶ und Src-Kinasen^{126,127} inhibiert. Da bereits beschrieben wurde, dass Src die Aktivierung von NFAT5 beeinflussen kann¹²⁸, kann auch eine mögliche Beteiligung der oben genannten Kinasen am dehnungsinduzierten Kernimport von NFAT5 generell nicht ausgeschlossen werden. Jedoch wurde in dieser Studie keine Unterscheidung zwischen den einzelnen NFAT5-Isoformen vorgenommen.

7.2 Funktionelle Bedeutung der transkriptionellen Ziele von NFAT5 in glatten Gefäßmuskelzellen

Dem Bluthochdruck-induzierten Gefäßumbau liegt eine Aktivierung der arteriellen GMZ zugrunde¹¹. Die glatten Muskelzellen verlieren dabei ihren kontraktile Zustand, gekennzeichnet durch einen Verlust der Expression kontraktiler Markergene wie *SM-MHC*^{26,129} und verändern ihren Phänotyp in Richtung eines synthetischen Zustands mit verstärkter Migration und Proliferation⁹⁰.

Vorangegangene mRNA-Analysen identifizierten *TNC* und *ACTBL2* als Zielgene des Transkriptionsfaktors NFAT5 in dehnungsstimulierten arteriellen GMZ⁶⁷. So interagiert Tenascin C über dessen Bindung an Integrin $\alpha_v\beta_3$ mit dem PDGF-Rezeptor, das nach Bindung von PDGF-BB¹³⁰ zu einer erhöhten Proliferation^{131,132} und Migration⁶⁷ von glatten Muskelzellen führt. Zudem resultiert ein Verlust von TNC in vaskulären glatten Muskelzellen zu einer erhöhten Apoptose der Zellen¹³³. Vermittelt wird dies ebenfalls über die Bindung an $\alpha_v\beta_3$ und führt zu einer Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts durch die Akkumulation von F-Aktin an den fokalen Adhäsionspunkten. Diese strukturellen Veränderungen werden zudem mit einer Anhäufung von an Tyrosin-phosphorylierten Proteinen und des EGF-Rezeptors assoziiert¹³¹. So können nachfolgend Signalkaskaden induziert werden, die über die Aktivierung von ERK proliferativ¹³⁴ bzw. über die Aktivierung von AKT antiapoptotisch¹³⁵ auf glatte Muskelzellen wirken. Auch eine Interaktion von TNC mit dem an der Zelloberfläche exprimierten Annexin II wird diskutiert¹³⁶, die FGF-2-abhängig die Proliferation von Endothelzellen vermittelt¹³².

Eigene Untersuchungen zeigten auf verschiedenen Ebenen, dass die Expression von *TNC* in GMZ unter biomechanischer Belastung direkt von NFAT5 und abhängig von dessen nukleärer Lokalisation reguliert wird. Eine verstärkte Expression von *TNC* nach Dehnungsstimulation aortaler GMZ der Ratte¹³⁷ oder auch nach Stimulation mit PDGF-BB unter statischen Bedingungen¹³⁸ wurde bereits gezeigt. Beide Faktoren gelten als Stimulus des synthetischen Phänotyps glattmuskulärer Zellen. Auch *in vivo* besteht ein Zusammenhang zwischen einer verstärkten Expression von *TNC* und dem synthetischen Phänotyp der GMZ. So wird TNC beim Menschen nach perkutaner transluminaler koronarer Angioplastie verstärkt in der sich postinterventionell entwickelnden Neointima gebildet¹³⁹ ebenso wie nach einer Ballonverletzung z.B. der *A. carotis* in der Maus¹⁴⁰. Dabei gelten die synthetischen GMZ in der Neointima als Hauptquelle für das vermehrt gebildete TNC¹⁴⁰.

Als weiteres direkt und dehnungsabhängig durch NFAT5 reguliertes Zielgen wurde *ACTBL2* mit Hilfe von *in silico* und *in vitro*-Analysen identifiziert. Das *ACTBL2*-Gen kodiert für κ -Aktin, ein Mitglied der Aktinfamilie. Die Dynamik des Aktin-Zytoskeletts spielt neben der Zellteilung bei der Zellmigration eine bedeutende Rolle¹⁴¹; Vorgänge, die ebenfalls mit einem synthetischen Phänotyp glatter Muskelzellen assoziiert sind. Aktin

Kapitel 7

kann in der Zelle in zwei Formen vorliegen, zum einen als Monomer (G-Aktin) oder als Aktinfilament (F-Aktin)¹⁴². Die der initialen Polarisierung der Zelle folgende Aktinpolymerisation führt zur Ausbildung von Protrusionen (Zellfortsätzen) in Migrationsrichtung. Diese werden mithilfe sich ausbildender neuer fokaler Adhäsionen über Transmembranproteine mit Komponenten der extrazellulären Matrix verankert und somit stabilisiert⁸². Die Myosin-vermittelte Kontraktion bei gleichzeitiger Trennung der fokalen Adhäsionen am hinteren Ende der Zelle ermöglicht ein Nachziehen des hinteren Zellabschnitts in Migrationsrichtung¹⁴³. Vor diesem Hintergrund störte ein *knockdown* der κ -Aktin Expression das Migrationsverhalten der GMZ. Die Zellen bildeten zwar Protrusionen aus, jedoch abwechselnd an beiden Enden der Zelle, was die gerichtete Migration beeinträchtigte. Untersuchungen, die sich mit der Rolle von κ -Aktin in Leberkarzinomzellen beschäftigen, deuten darauf hin, dass κ -Aktin das Wachstumsverhalten und das Langzeitüberleben dieser Zellen verändert. Patienten mit Leberzellkarzinom, bei denen κ -Aktin sowohl in hepatischen Tumorzellen als auch in Nicht-Tumorzellen detektiert werden konnte, besaßen eine schlechtere postoperative Prognose hinsichtlich des tumorfreien Überlebens¹⁴⁴.

Bezieht man auch die Literatur mit ein, die sich mit der Rolle von NFAT5 hinsichtlich des Einflusses auf die Migration von Zellen beschäftigt, wird die eigene Aussage bestärkt, dass NFAT5 die Migration von Zellen beeinflusst. So verstärkt NFAT5 die Expression von S100A4 in Nierenkarzinomzellen¹²². S100A4 inhibiert dabei unter anderem den Tumorsuppressor p53¹⁴⁵ und erhöht die Expression und Aktivität von MMPs wie MMP-9¹⁴⁶ und fördert so die Migration und Proliferation der Zellen. Zudem wird in Lungen-Adenomzellen NFAT5-vermittelt die Expression von Aquaporin-5 verstärkt¹⁴⁷, welche ebenfalls eine migrationsfördernde Wirkung besitzen. Dies wird zum einen mit der Regulation der Wasserpermeabilität der Zellmembran assoziiert, wodurch die Zellform und das Zellvolumen¹⁴⁸ und somit die Beweglichkeit der Zelle beeinflusst wird. Zum anderen wird z.B. in endometrialen Adenomzellen Aquaporin-5-vermittelt die Expression von Annexin-II erhöht, welches als Regulator der F-Aktin-Remodellierung gilt¹⁴⁹.

Obwohl im Rahmen dieser Doktorarbeit gezeigt wurde, dass NFAT5 den synthetischen Phänotyp von arteriellen GMZ fördert, so könnte NFAT5 auch unter bestimmten

Umständen an der Kontrolle der Expression einiger Gene des kontraktile Apparats beteiligt sein⁶⁶. Dies wurde nach Stimulation von GMZ mit Angiotensin II beobachtet, welches die Translokation in und die Aktivität von NFAT5 im Zellkern verstärkte und eine Steigerung der Expression von SM α A zur Folge hatte. Nach Stimulation mit PDGF-BB erhöhte sich dagegen die Proteinmenge von NFAT5. Ein Verlust von NFAT5 führt dagegen zu einer Inhibition der PDGF-BB-induzierten Migration von GMZ⁶⁶. Die dadurch postulierte duale Rolle von NFAT5 hinsichtlich der Regulation des glattmuskulären Phänotyps ist jedoch fraglich, da zum einen eine langfristige Stimulation glattmuskulärer Zellen mit Angiotensin II nicht mit einer Stabilisierung des glattmuskulären Phänotyps assoziiert werden kann, da diese zu einer Hypertrophie der Zellen¹⁵⁰, einer verstärkten DNA-Synthese¹⁵¹ sowie zu einer Aktivierung des PDGF-BB-Signalwegs¹⁵² führt. Zum anderen wurden in der genannten Publikation als Beweis der Angiotensin II-vermittelten NFAT5-abhängigen SM α A-Expression nur Promoteraktivitäts- sowie Daten zum mRNA-Gehalt nicht aber Analysen der Proteinmenge gezeigt.

7.3 Funktion von NFAT5 im Rahmen von vaskulären Remodellierungsprozessen

Die bisherige Diskussion unterstreicht die Bedeutung von NFAT5 für den Übergang der GMZ vom kontraktile zum synthetischen Phänotyp, der als Voraussetzung für einen (mal)adaptiven Umbau der Arterienwand nach biomechanischer Belastung gilt. Um die entsprechende Relevanz der bisher erörterten Befunde *in vivo* zu überprüfen, wurden Mausmodelle verwendet, die eine chronisch erhöhte Wandspannung als Auslöser für Umbauprozesse in Arterien gemeinsam haben, wie sie bei verschiedenen Arten von Bluthochdruck beim Menschen vorkommen. Für die Analyse der funktionellen Bedeutung von NFAT5 *in vivo* wurden induzierbare, glatte Muskelzell-spezifische NFAT5^{-/-}-Mäuse genutzt.

Eine chronische Erhöhung des Blutdrucks im Lungenkreislauf (pulmonale Hypertension, PAH) führt durch die kompensatorische Verdickung der medialen Gefäßwand der kleinen Pulmonalarterien zu einer erhöhten Nachlast des rechten Ventrikels und somit als Spätfolge zu einer Rechtsherzhypertrophie, die zu einem Rechtsherzversagen führen kann^{20,22,153}. Zur Untersuchung der pulmonalen Hypertonie wurde das Hypoxie-induzierte pulmonale Bluthochdruck-Modell verwendet^{73,154}. In diesem Modell wird die Rechtsherzbelastung nach einer initialen Vasokonstriktion insbesondere auf die

Kapitel 7

strukturellen Veränderungen der kleinen Lungenarterien zurückgeführt, wodurch deren Widerstand sukzessive erhöht wird⁷⁴. Der Verlust von NFAT5 führte bei Mäusen im PAH-Belastungsmodell zu einem reduzierten „Fulton-Index“, der die relative Zunahme der Masse des rechten gegenüber dem linken Ventrikel, d.h. die Ausbildung einer Rechtsherzhypertrophie, beschreibt^{155–157}. Demnach ist in den SMC-NFAT5^{-/-}-Tieren die Entwicklung einer Rechtsherzhypertrophie als Charakteristikum einer manifesten PAH verringert. Um diese Schlussfolgerung zu bestätigen, wird in einer weiteren Studie die Rechtsherzfunktion bei diesen Tieren echokardiographisch analysiert.

Darüber hinaus war die insbesondere von der Proliferation der GMZ abhängige Zunahme der pulmonalarteriellen Wanddicke sowie die Expression von κ -Aktin und TNC nach PAH-Induktion in den NFAT5-defizienten Tieren signifikant verringert. Dies untermauert die Hypothese, dass NFAT5 bei der Pathogenese der PAH eine essentielle Rolle spielt. Eine verstärkte Expression des mitogen wirkenden TNC in GMZ bei PAH wurde in weiteren Studien gezeigt^{158,159}. PAH-Studien zeigen jedoch auch, dass eine Inhibition von TNC *in vivo* zwar zu einer verstärkten Apoptose der GMZ führt, aber nur einen schwachen antiproliferativen Effekt hat. Dieser wurde in dem Kontext auf eine verstärkte Aktivität von Osteopontin zurückgeführt, das funktionell z.T. das Fehlen von TNC kompensieren kann¹³³. Da die Zunahme der arteriellen Wanddicke u.a. von der Proliferation der GMZ abhängt, lässt die verminderte Zunahme der arteriellen Wanddicke bei PAH in den SMC-NFAT5^{-/-}-Tieren darauf schließen, dass NFAT5 seine Funktion bei der Pathogenese der PAH nicht nur über TNC realisiert, sondern auch weitere durch NFAT5-regulierte Genprodukte involviert sind, die es in diesem Kontext zu identifizieren gilt.

Im Rahmen des hier verwendeten PAH-Modells ist auch eine Beeinflussung der NFAT5-Expression durch Hypoxie zu diskutieren. Es gibt Studien, die belegen, dass moderate bis schwere Hypoxie (0-2,5 % O₂) in HEK293 Zellen sowie in IMCD-Zellen zu einer *hypoxia-inducible factor-1- α* (HIF-1- α)-unabhängigen Aktivierung von NFAT5 führt¹⁶⁰. Milde Hypoxie (5 % O₂) bewirkt dagegen keine Veränderung der NFAT5-Proteinsynthese. Eigene Studien konnten zeigen, dass weder die NFAT5-mRNA-Expression noch die nukleäre Akkumulation von NFAT5 in GMZ bei schwerer Hypoxie (1 % O₂) verändert ist. Daher ist davon auszugehen, dass eine generelle Hypoxie-bedingte Aktivierung von

NFAT5 in GMZ unter den in dieser Arbeit gewählten experimentellen Bedingungen eher unwahrscheinlich ist. Wahrscheinlicher ist im Rahmen des arteriellen Umbauprozesses eine Aktivierung von NFAT5 über die Hypoxie-bedingte Vasokonstriktion der kleinen peripheren Lungenarterien und der daraus resultierenden Blutdruckerhöhung im Lungenkreislauf.

Während PAH einen seltenen Sonderfall einer Bluthochdruckerkrankung darstellt, ist der idiopathische arterielle Bluthochdruck gerade in Deutschland ein allgegenwärtiges Problem. Um eine grundsätzliche Einschätzung der Bedeutung von NFAT5 für solche Bluthochdruck-induzierten arteriellen Remodellierungsprozesse vornehmen zu können, wurde ein renal induziertes, Hypervolämie-vermitteltes Hochdruckmodell (Aldosteron-Applikation bei gleichzeitiger Salzüberladung) in der Maus verwendet. Hier führte der Verlust von NFAT5 zu keiner veränderten Reaktion der druckbelasteten Arterien, da die systolischen und diastolischen Blutdruckwerte in hypertensiven SMC-NFAT5^{fl/fl}- sowie in NFAT5^{-/-}-Tieren vergleichbar anstiegen. Dieses Ergebnis wurde durch *ex vivo*-Befunde unterstützt, indem isolierte perfundierte Mesenterialarterien von SMC-NFAT5^{fl/fl}- sowie NFAT5^{-/-}-Tieren mit einer nahezu identischen myogenen Antwort auf eine erhöhte transmurale Druckdifferenz reagierten. Der Verlust von NFAT5 in den GMZ der hypertensiven Mäuse führte jedoch zu einer verringerten Proliferation in der Media der Femoralarterien. Dies deutet darauf hin, dass das Ausbleiben NFAT5-abhängiger Genexpression die Remodellierung der arteriellen Gefäßwand verlangsamt. Die Auswirkung einer reduzierten Proliferation der arteriellen GMZ auf die Blutdruckentwicklung bzw. die Mediadicke in den Femoralarterien müsste jedoch nach längerer DOCA/Salz-Behandlung (21 Tage) überprüft werden.

Frühere Untersuchungen von isolierten, druck-perfundierten murinen Femoralarterien zeigten bereits erhöhte Expressionsniveaus von NFAT5 und TNC⁶⁷. Auch an den Verzweigungen der Aorta, d.h. an Stellen, die einer erhöhten Druckbelastung ausgesetzt sind, konnten erhöhte Mengen an TNC in der subendothelialen Membran detektiert werden¹⁶¹. Zudem wurde in Wildtyp-Tieren im DOCA/Salz-Modell nach 10 Tagen eine verstärkte Expression von TNC bei gleichzeitiger Reduktion von Fibronectin beobachtet (persönliche Mitteilung von Prof. Dr. Thomas Korff). Des Weiteren zeigen Ratten, die spontan Bluthochdruck entwickeln (SHR, *spontaneously hypertensive rats*) eine

Kapitel 7

verstärkte TNC-Expression in der *Tunica media*, die mit dem Beginn der Bluthochdruck-Entwicklung assoziiert ist und somit eine Regulation von TNC im Zuge der initialen Hypertonie nahelegt¹⁶¹. Die Beteiligung von TNC an der vaskulären hypertrophen Remodellierung in Mesenterial-Arterien im DOCA/Salz-Modell wurde bereits beschrieben¹⁶².

Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass auch in diesem Modell neben der Druckbelastung auch weitere Faktoren - wie z.B. das schon zuvor genannte PDGF-BB - an einer Aktivierung von NFAT5 beteiligt sein könnten. So konnte bereits gezeigt werden, dass eine Stimulation von GMZ mit PDGF-BB zu einer erhöhten NFAT5-Proteinmenge führt⁶⁶. Nach DOCA/Salz-induziertem Bluthochdruck konnte eine dreifach erhöhte Genexpression des PDGF-B-Rezeptors in der Aorta hypertensiver Ratten detektiert werden, ebenso wie in spontan hypertensiven Tieren (SHR) im Vergleich zu normotensiven Kontrollen¹⁶³. Eine Beteiligung von PDGF-BB bei der Aktivierung von NFAT5 über den PDGF-B-Rezeptor im DOCA/Salz-Modell wäre daher durchaus möglich, zumal *in vitro* in GMZ eine erhöhte TNC-Expression nach PDGF-BB-Stimulation detektiert werden konnte¹⁶¹. Die bereits diskutierte Angiotensin II-abhängige Regulation von NFAT5 kann hier ausgeschlossen werden, da bereits gezeigt wurde, dass in Ratten nach DOCA/Salz-Behandlung die Plasmakonzentration von Angiotensin II sogar vermindert ist. Dagegen ist die Angiotensin II-Konzentration in der Cerebrospinalflüssigkeit erhöht, was mit einer verstärkten Aktivität des Renin-Angiotensin-Systems im Gehirn und einer erhöhten Vasopressinfreisetzung assoziiert zu sein scheint⁷⁰.

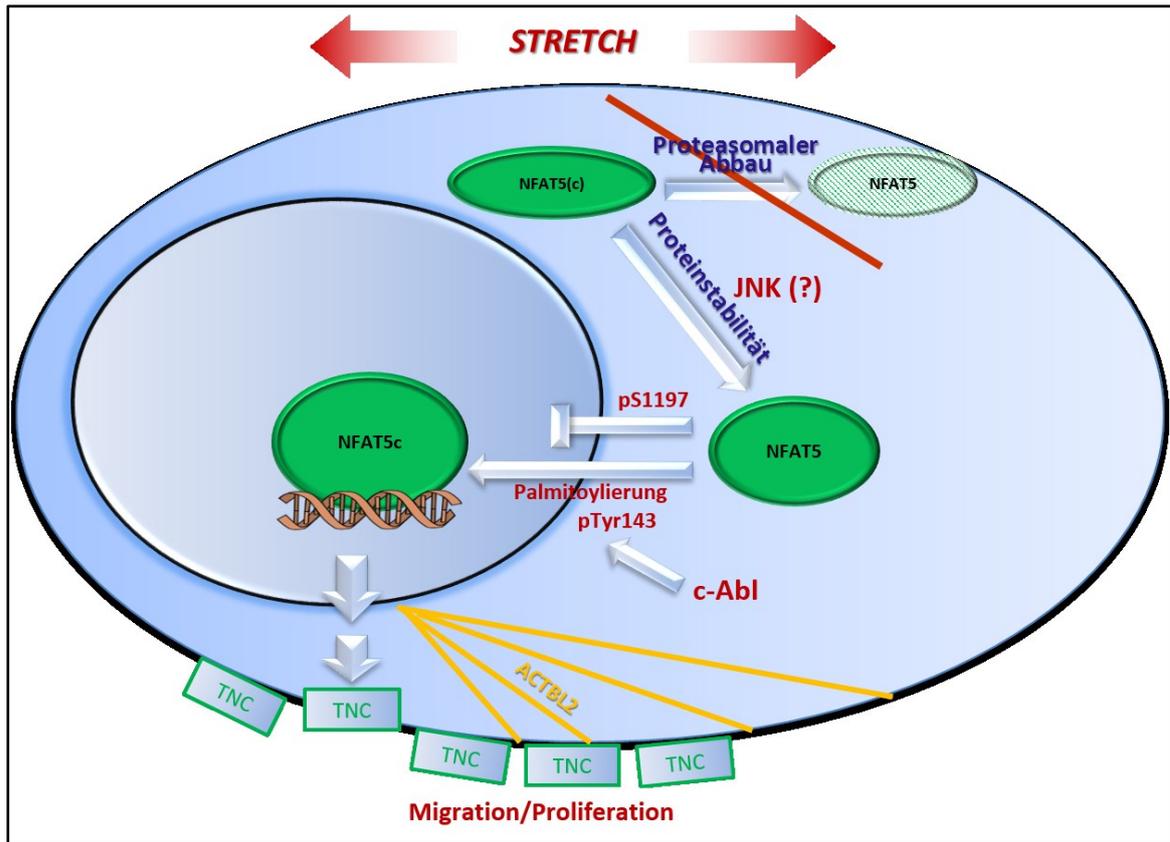


Abb. 38: Zusammenstellung der Regulation von NFAT5 in biomechanisch aktivierten glatten Muskelzellen. Die Proteinexpression von NFAT5 Isoform C wird unter Dehnung verstärkt. Stabilisiert wird NFAT5 vermutlich von der c-Jun-N-terminalen Kinase (JNK). Die dehnungsinduzierte Kerngängigkeit von NFAT5c wird sowohl von der Phosphorylierung an Serin1197 als auch an Tyrosin-143 kontrolliert. Tyrosin-143 wird dabei durch die Kinase c-Abl phosphoryliert. Eine Palmitoylierung gilt als Voraussetzung für den Kernimport von NFAT5c. Im Zellkern bindet NFAT5c als Transkriptionsfaktor an den Promoter von Tenascin C (*TNC*) und *ACTBL2* und verstärkt dessen Gentranskription. *TNC* fördert die Proliferation, κ -Aktin (*ACTBL2*) die Migration von glatten Muskelzellen.

8 Limitation der Arbeit

Die erhobenen Daten zeigen erstmalig einen Zusammenhang zwischen der Aktivierung von NFAT5 und einer Bluthochdruck-induzierten Gefäßremodellierung. So wurde *in vitro* in biomechanisch stimulierten arteriellen GMZ eine erhöhte Proteinexpression sowie ein verstärkter Kernimport von NFAT5 beobachtet. Durch die Expression von TNC und κ -Aktin fördert NFAT5 die migratorische Eigenschaft der arteriellen GMZ, welche mit einer phänotypischen Veränderung assoziiert wird. Es wurde experimentell belegt, dass der Verlust von κ -Aktin in glatten Muskelzellen zu einer gestörten Migration führen kann. Es ist jedoch zu beachten, dass durch einen siRNA-vermittelten *knockdown* eines bestimmten Gens *in vitro* zwar die potentielle Funktionsweise eines Proteins analysiert werden kann, dies aber keinen direkten Beweis für dessen *in vivo*-Relevanz liefert. In welchem Maße TNC und κ -Aktin die Migration der glatten Muskelzellen funktionell jeweils *in vivo* beeinflussen, kann daher nur angenommen werden. Durch eine differentielle Genexpressionanalyse *in vivo* (z.B durch einen DNA-Microarray) könnten vor diesem Hintergrund weitere NFAT5-abhängige Genprodukte identifiziert werden, die an der Remodellierung der Gefäße bei Bluthochdruck beteiligt sind. *In vitro*-Analysen zeigten neben den hier untersuchten Zielgenen bereits eine Regulation der Expression des Retinsäure-Rezeptor- β (RAR β) durch biomechanisch aktiviertes NFAT5⁶⁷. Während für Retinsäure sowohl eine fördernde als auch inhibitorische Wirkung auf die Proliferation von GMZ diskutiert wird¹⁶⁴, stehen funktionelle Analysen in dehnungsstimulierten GMZ *in vitro* in diesem Kontext noch aus.

Der im Rahmen dieser Arbeit untersuchte Mechanismus der Regulation der dehnungsinduzierten Kerntranslokation von NFAT5 zeigt, dass an Serin-1197 phosphoryliertes NFAT5c keinem dehnungsstimulierten Kernimport unterliegt. Die Kinase(n), die für die Phosphorylierung bzw. die Phosphatase(n), die für die Dephosphorylierung verantwortlich ist (sind) und somit die Kerntranslokation von NFAT5c kontrolliert(en), konnte(n) noch nicht eindeutig identifiziert werden. Des Weiteren lassen die erzielten Ergebnisse darauf schließen, dass die Proteinexpression und Kerntranslokation von NFAT5 von der proteasomalen Aktivität abhängig sind. Um eindeutig zu belegen, dass diese Beobachtungen nicht durch indirekte Effekte begründet sind, muss anlehnend an die zuvor durchgeführten Experimente ubiquitiniertes NFAT5

zusätzlich direkt nachgewiesen werden. Auch die Bedeutung der proteasomalen Aktivität für den dehnungsinduzierten Kernimport von NFAT5 bedarf weiterer Untersuchungen.

Ferner konnte zwar gezeigt werden, dass der Verlust von NFAT5 in GMZ hypertensiver Mäuse zu einer verringerten Proliferation in der Media der Femoralarterien führt, jedoch steht ein direkter Nachweis einer verstärkten NFAT5-Expression in diesen Blutgefäßen bei arterieller Hypertonie noch aus. Weitere Untersuchungen dazu, die den Gefäßumbau in DOCA/Salz-behandelten SMC-NFAT5^{-/-}-Tieren charakterisieren, sind geplant. So wird u.a. in Mesenterialarterien hypertensiver SMC-NFAT5^{fl/fl}- und SMC-NFAT5^{-/-}-Mäuse die Zunahme der medialen Gefäßwanddicke bestimmt, die als wichtiger Parameter der hypertensiven Gefäßremodellierung dient. Zudem werden die GMZ in den Mesenterial- und Femoralarterien hypertensiver SMC-NFAT5^{fl/fl}- und SMC-NFAT5^{-/-}-Mäuse hinsichtlich ihres phänotypischen Zustands untersucht, da noch nicht geklärt ist, ob durch ein Fehlen von NFAT5 auch die Expression von Genen beeinflusst wird, die mit dem kontraktiven Phänotyp glatter Muskelzellen assoziiert sind (u.a. SM-MHC, Myocardin)²⁶. Zudem konnte im DOCA/Salz-Modell nach 10 Tagen keine signifikante Veränderung der diastolischen Blutdruckwerte gemessen werden, sodass eine Studie, bei der die DOCA/Salz-Behandlung über einen Zeitraum von 21 Tagen durchgeführt wird, erfolgen sollte. Somit können wichtige Erkenntnisse gewonnen werden, in welchem Maße NFAT5 die Druck-induzierte Gefäßremodellierung beeinflusst.

Bezüglich der physiologischen Relevanz deuten die erzielten Ergebnisse an, dass NFAT5 an der Entstehung und Progression der pulmonalen Hypertonie beteiligt ist. In diesem Zusammenhang stehen allerdings weitere Studien aus, die die Auswirkung des Fehlens von NFAT5 bei der Entwicklung von PAH auf kardiale Funktionen untersuchen. Der Anstieg des rechten systolischen Ventrikeldrucks (*RVSP*) bei PAH kann durch Applikation eines Rechtsherzkatheters bestimmt werden. Des Weiteren liefert die Echokardiographie wichtige Erkenntnisse hinsichtlich der bei PAH-veränderten kardialen Funktionsparameter. So führt PAH u.a. zu einem beschleunigten Pulmonalklappenregurgitationsjet (Hinweis auf eine Triskuspidalinsuffizienz), zu einer vergrößerten rechten Herzhöhle und zu einer verkürzten rechtsventrikulären Verkürzungsgeschwindigkeit.

9 Ausblick

Berücksichtigt man die im Rahmen der Arbeit vorgestellten Mechanismen, die für die Aktivierung von NFAT5 entscheidend sind und in Abb. 38 zusammenfassend dargestellt sind, ergeben sich möglicherweise neue Therapieoptionen, die hier kurz erörtert werden sollen.

Es konnte gezeigt werden, dass eine Inhibition der Kinase c-Abl *in vitro* zu einer verminderten Akkumulation von dehnungsstimuliertem NFAT5 sowie zu einer verringerten Proteinsynthese von κ -Aktin führt. Dies lässt auf einen möglichen therapeutischen Nutzen von c-Abl-Inhibitoren (Multikinase-Inhibitoren Dasatinib und Imatinib) bei pulmonaler Hypertonie schließen. Jedoch wurde mehrfach in Studien belegt, dass Patienten, die wegen chronischer myeloischer Leukämie mit Dasatinib behandelt werden, pulmonalen Bluthochdruck entwickeln können^{165,166}. Dieser Effekt wird auf die inhibitorische Wirkung auf Src-Kinasen zurückgeführt^{166,167}, die über eine Hemmung von spannungsabhängigen Kaliumkanälen zu einer Konstriktion der Pulmonalarterien beitragen. Jedoch ist die Rolle von Src-Kinasen bei der Pathogenese der pulmonalen Hypertonie noch unklar, da es sowohl Studien gibt, die eine Hemmung oder aber eine Aktivierung der Src-Kinasen mit der Entstehung einer PAH assoziieren¹⁶⁸. Dagegen wird Imatinib bereits als mögliche Therapieoption für PAH angesehen^{169,170}. Hierbei wird die proliferationsinhibierende Wirkung von Imatinib u.a. mit einer Hemmung des PDGF-Rezeptors assoziiert.

Imatinib inhibiert zudem die durch osmotischen Stress induzierte NFAT5-Aktivität durch Hemmung der c-Abl-Kinase⁵⁷. Es kann somit davon ausgegangen werden, dass die Multikinase-Inhibitoren Dasatinib und Imatinib NFAT5 über den gleichen Mechanismus inhibieren. Die c-Abl-Kinase steht bereits im Zusammenhang mit der Kontraktion von glatten Gefäßmuskelzellen, da es die Aktin-Dynamik bzw. Polymerisation beeinflusst. Dabei katalysiert c-Abl die *Crk-associated substrate* (CAS)-Phosphorylierung und dient der Weitergabe von externen Signalen an das Aktinzytoskelett¹⁷¹. Eine weitere Studie beschreibt zudem die Abhängigkeit der c-Abl-induzierten Aktinpolymerisation als essentiell für die Zellmigration¹⁷². Eine Beteiligung von κ -Aktin, das unter c-Abl-Inhibition wegen fehlender NFAT5-Aktivierung vermindert gebildet wird, wäre denkbar. Die

Inhibition der c-Abl-vermittelten Effekte auf NFAT5 könnte somit additiv an der Wirkung von Imatinib bei PAH beteiligt sein. Eine durch Imatinib-induzierte Inhibition von NFAT5 bei PAH durch die Beeinflussung der c-Abl-Kinase *in vivo* sollte daher zusätzlich in Betracht gezogen werden.

Sollte sich die Bedeutung von NFAT5 bestätigen, könnten perspektivisch spezifische NFAT5-Decoy-Oligo-Desoxynukleotide (ODN) entwickelt werden, um die Aktivität von NFAT5 zu inhibieren und somit in der Therapie der pulmonalen Hypertonie Anwendung finden. In eigenen Untersuchungen konnte durch den Einsatz von NFAT5-Decoy-ODN die NFAT5-induzierte TNC-Expression in dehnungsstimulierten arteriellen GMZ prinzipiell verringert werden. Um dabei die potentiellen Nebenwirkungen einer systemischen NFAT5-Inhibition (z.B. Probleme bei der renalen Osmoadaption⁴⁹) zu verringern, sollte eine lokale Wirkung z.B durch Inhalation der Decoy-ODN angestrebt werden. Obwohl auch Etomoxir als CPT1-Inhibitor über die Verminderung des NFAT5-Kernimports einen therapeutischen Nutzen in der Therapie der PAH haben könnte, belegen Studien jedoch dessen hohe Toxizität¹⁷³. Zudem wurde gezeigt, dass der Verlust von CPT1B in Mäusen zu einer erhöhten Lipotoxizität im Herzen führt, wenn diese pathologischem Stress ausgesetzt sind¹⁷⁴.

10 Literaturverzeichnis

1. Klinker, Pape, Kurtz, Silbernagel. *Physiologie*. 6. überarb. Georg Thieme Verlag; 2010.
2. Schwegler. *Der Mensch: Anatomie Und Physiologie*. Thieme Verlag; 2006.
3. Mutschler. *Arzneimittelwirkungen: Lehrbuch Der Pharmakologie Und Toxikologie*. 9. Ausgabe. Wiss. Verlag Ges.; 2008.
4. Aumüller. *Duale Reihe: Anatomie*. 3. Auflage. Thieme Verlag; 2014.
5. Kolloch. *Arterielle Hypertonie*. 4. Auflage. Springer-Verlag; 2004.
6. Lifton R, Gharavi A, Geller D. Molecular Mechanisms of Human Hypertension. *Cell*. 2001;104:545-556. doi:10.1016/S0092-8674(01)00241-0.
7. Hick. *Mediskript: Kurzlehrbuch Physiologie*. 7. Auflage. Urban & Fischer Verlag/Elsevier Verlag; 2013.
8. Schiffrin EL. Vascular remodeling in hypertension: Mechanisms and treatment. *Hypertension*. 2012;59(2 SUPPL. 1):367-374. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.187021.
9. Mulvany MJ. Small artery remodeling in hypertension.pdf. 2002.
10. Rizzoni D, Porteri E, Guefi D, et al. Cellular hypertrophy in subcutaneous small arteries of patients with renovascular hypertension. *Hypertension*. 2000;35(4):931-935. doi:10.1161/01.HYP.35.4.931.
11. Baumbach GL, Ghoneim S. Vascular remodeling in hypertension. *Scanning Microsc*. 1993;7(1):137-142; discussion 143. doi:10.1161/hy09t1.096249.
12. Lehoux S, Castier Y, Tedgui a. Molecular mechanisms of the vascular responses to haemodynamic forces. *J Intern Med*. 2006;259(4):381-392. doi:10.1111/j.1365-2796.2006.01624.x.
13. Intengan HD, Schiffrin EL. Structure and mechanical properties of resistance arteries in hypertension: role of adhesion molecules and extracellular matrix determinants. *Hypertension*. 2000;36(3):312-318. doi:10.1161/01.HYP.36.3.312.
14. Rourke MFO, Safar ME. Relationship Between Aortic Stiffening and Microvascular Disease in Brain and Kidney Cause and Logic of Therapy Epidemiological Studies and Clinical Trials. 2010:200-205. doi:10.1161/01.HYP.0000168052.00426.65.

15. Hashimoto J. Central Hemodynamics and Target Organ Damage in Hypertension. 2014;1-8. doi:10.1620/tjem.233.1.Correspondence.
16. Mitchell GF. Arterial stiffness and hypertension. *Hypertension*. 2014;64(1):13-18. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.114.00921.
17. Middeke M. Pulswellenanalyse. *DMW - Dtsch Medizinische Wochenschrift*. 2010;135(S 01):S3-S3. doi:10.1055/s-0030-1249182.
18. Machado RD. The molecular genetics and cellular mechanisms underlying pulmonary arterial hypertension. *Scientifica (Cairo)*. 2012;2012:106576. doi:10.6064/2012/106576.
19. Aepc C, Society I, Uk SG, et al. 2015 ESC / ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension The Joint Task Force for the Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Respiratory Society (ERS). 2016:67-119. doi:10.1093/eurheartj/ehv317.
20. Montani D, Günther S, Dorfmueller P, et al. Pulmonary arterial hypertension. *Orphanet J Rare Dis*. 2013;8(1):97. doi:10.1186/1750-1172-8-97.
21. Jonigk D, Golpon H, Bockmeyer CL, et al. Plexiform Lesions in Pulmonary Arterial Hypertension. *Am J Pathol*. 2011;179(1):167-179. doi:10.1016/j.ajpath.2011.03.040.
22. Archer A, Weir E, Wilkins M. The Basic Science of pulmonary arterial hypertension for clinicians: new concepts and experiemntal therapies. *Circulation*. 2011;121(18):2045-2066. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.108.847707.The.
23. Schumann C, Lepper PM, Frank H, et al. Circulating biomarkers of tissue remodelling in pulmonary hypertension. *Biomarkers*. 2010;15(6):523-532. doi:10.3109/1354750X.2010.492431.
24. Pullamsetti SS, Schermuly R, Ghofrani A, Weissmann N, Grimminger F, Seeger W. Novel and Emerging Therapies for Pulmonary Hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*. 2014;189(4):394-400. doi:10.1164/rccm.201308-1543PP.
25. The SPRINT Study Research. The design and rationale of a multicenter clinical trial comparing two strategies for control of systolic blood pressure: The Systolic Blood Pressure Intervention Trial (SPRINT). *Clin Trials*. 2014;11(5):532-546. doi:10.1177/1740774514537404.
26. Rensen SSM, Doevendans P a FM, van Eys GJJM. Regulation and characteristics of vascular smooth muscle cell phenotypic diversity. *Neth Heart J*. 2007;15(3):100-108. doi:10.1007/BF03085963.

Kapitel 10

27. Owens GK. Regulation of differentiation of vascular smooth muscle cells. *Physiol Rev.* 1995;75(3):487-517.
28. Gittenberger-de Groot a C, DeRuiter MC, Bergwerff M, Poelmann RE. Smooth muscle cell origin and its relation to heterogeneity in development and disease. *Arter Thromb Vasc Biol.* 1999;19(7):1589-1594. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10397674>.
29. Fatigati V, Murphy R a. Actin and tropomyosin variants in smooth muscles. Dependence on tissue type. *J Biol Chem.* 1984;259(1983):14383-14388.
30. Owens GK, Kumar MS, Wamhoff BR. Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease. *Physiol Rev.* 2004;84(3):767-801. doi:10.1152/physrev.00041.2003.
31. Wang Z, Wang D-Z, Pipes GCT, Olson EN. Myocardin is a master regulator of smooth muscle gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(12):7129-7134. doi:10.1073/pnas.1232341100.
32. Wang Z, Wang D-Z, Hockemeyer D, McAnally J, Nordheim A, Olson EN. Myocardin and ternary complex factors compete for SRF to control smooth muscle gene expression. *Nature.* 2004;428(6979):185-189. <http://dx.doi.org/10.1038/nature02382>.
33. Miano JM. Serum response factor: toggling between disparate programs of gene expression. *J Mol Cell Cardiol.* 2015;35(6):577-593. doi:10.1016/S0022-2828(03)00110-X.
34. Mack CCP. Signaling Mechanisms That Regulate Smooth Muscle Cell Differentiation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011;31(7):1495-1505. doi:10.1161/ATVBAHA.110.221135.
35. Mack C. Signaling mechanisms that regulate smooth muscle cell differentiation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011;31(7):1495-1505. doi:10.1161/ATVBAHA.110.221135.Signaling.
36. Milewicz DM, Kwartler CS, Papke CL, Regalado ES, Cao J, Reid AJ. Genetic variants promoting smooth muscle cell proliferation can result in diffuse and diverse vascular diseases: evidence for a hyperplastic vasculomyopathy. *Genet Med.* 2010;12(4):196-203. doi:10.1097/GIM.0b013e3181cdd687.
37. Stegemann JP, Hong H, Nerem RM, Jan P, Mechanical RMN. Mechanical , biochemical , and extracellular matrix effects on vascular smooth muscle cell phenotype. 2005:2321-2327. doi:10.1152/jappphysiol.01114.2004.
38. Lehoux S, Tedgui A. Cellular mechanics and gene expression in blood vessels. *J Biomech.* 2003;36:631-643. doi:10.1016/S0021-9290(02)00441-4.

39. Haga JH, Li Y-SJ, Chien S. Molecular basis of the effects of mechanical stretch on vascular smooth muscle cells. *J Biomech.* 2007;40(5):947-960. doi:10.1016/j.jbiomech.2006.04.011.
40. Iwasaki H, Eguchi S, Ueno H, Marumo F, Hirata Y. Mechanical stretch stimulates growth of vascular smooth muscle cells via epidermal growth factor receptor. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2000;278(2):H521-H529. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10666084>.
41. Hsu HJ, Lee CF, Locke A, Vanderzyl SQ, Kaunas R. Stretch-induced stress fiber remodeling and the activations of JNK and ERK depend on mechanical strain rate, but not FAK. *PLoS One.* 2010;5(8). doi:10.1371/journal.pone.0012470.
42. Ducret T, El Arrouchi J, Courtois A, Quignard J-F, Marthan R, Savineau J-P. Stretch-activated channels in pulmonary arterial smooth muscle cells from normoxic and chronically hypoxic rats. *Cell Calcium.* 2010;48(5):251-259. doi:10.1016/j.ceca.2010.09.011.
43. Sharif-Naeini R, Folgering JH a, Bichet D, et al. Sensing pressure in the cardiovascular system: Gq-coupled mechanoreceptors and TRP channels. *J Mol Cell Cardiol.* 2010;48(1):83-89. doi:10.1016/j.yjmcc.2009.03.020.
44. Mederos y Schnitzler M, Storch U, Meibers S, et al. Gq-coupled receptors as mechanosensors mediating myogenic vasoconstriction. *EMBO J.* 2008;27(23):3092-3103. doi:10.1038/emboj.2008.233.
45. Hogan PG, Hogan PG, Chen L, Chen L. Transcriptional regulation by calcium, calcineurin. *NFAT Genes Dev.* 2003;17(18):2205-2232. doi:10.1101/gad.1102703.GENES.
46. Stroud JC, Lopez-Rodriguez C, Rao A, Chen L. Structure of a TonEBP-DNA complex reveals DNA encircled by a transcription factor. *Nat Struct Biol.* 2002;9(2):90-94. doi:10.1038/nsb749.
47. López-Rodríguez C, Aramburu J, Jin L, Rakeman AS, Michino M, Rao A. Bridging the NFAT and NF-kappaB families: NFAT5 dimerization regulates cytokine gene transcription in response to osmotic stress. *Immunity.* 2001;15(1):47-58. doi:10.1016/S1074-7613(01)00165-0.
48. Falvo J V, Lin CH, Tsytsykova A V, et al. A dimer-specific function of the transcription factor NFATp. 2008;105(50):19637-19642.
49. Cheung CY, Ko BC. NFAT5 in cellular adaptation to hypertonic stress - regulations and functional significance. *J Mol Signal.* 2013;8(1):5. doi:10.1186/1750-2187-8-5.
50. Macián F, López-Rodríguez C, Rao a. Partners in transcription: NFAT and AP-1. *Oncogene.* 2001;20(19):2476-2489. doi:10.1038/sj.onc.1204386.

Kapitel 10

51. Molkentin JD, Lu JR, Antos CL, et al. A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy. *Cell*. 1998;93(2):215-228. doi:10.1016/S0092-8674(00)81573-1.
52. Lopez-Rodríguez C, Aramburu J, Rakeman a S, Rao a. NFAT5, a constitutively nuclear NFAT protein that does not cooperate with Fos and Jun. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(13):7214-7219. doi:10.1073/pnas.96.13.7214.
53. Burg MB, Ferraris JD. Intracellular Organic Osmolytes: Function and Regulation. *J Biol Chem*. 2008;283(12):7309-7313. doi:10.1074/jbc.R700042200.
54. Xu S, Wong CCL, Tong EHY, et al. Phosphorylation by casein kinase 1 regulates tonicity-induced osmotic response element-binding protein/tonicity enhancer-binding protein nucleocytoplasmic trafficking. *J Biol Chem*. 2008;283(25):17624-17634. doi:10.1074/jbc.M800281200.
55. Tong EHY, Guo JJ, Huang AL, et al. Regulation of nucleocytoplasmic trafficking of transcription factor OREBP/TonEBP/NFAT5. *J Biol Chem*. 2006;281(33):23870-23879. doi:10.1074/jbc.M602556200.
56. Gallazzini M, Heussler GE, Kunin M, Izumi Y, Burg MB, Ferraris JD. High NaCl-induced activation of CDK5 increases phosphorylation of the osmoprotective transcription factor TonEBP/OREBP at threonine 135, which contributes to its rapid nuclear localization. *Mol Biol Cell*. 2011;22(5):703-714. doi:10.1091/mbc.E10-08-0681.
57. Gallazzini M, Yu M-J, Gunaratne R, Burg MB, Ferraris JD. c-Abl mediates high NaCl-induced phosphorylation and activation of the transcription factor TonEBP/OREBP. *FASEB J*. 2010;24(11):4325-4335. doi:10.1096/fj.10-157362.
58. Irarrazabal CE, Gallazzini M, Schnetz MP, et al. Phospholipase C-gamma1 is involved in signaling the activation by high NaCl of the osmoprotective transcription factor TonEBP/OREBP. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(2):906-911. doi:10.1073/pnas.0913415107.
59. Halterman J a., Kwon HM, Wamhoff BR. Tonicity-independent regulation of the osmosensitive transcription factor TonEBP (NFAT5). *AJP Cell Physiol*. 2012;302(1):C1-C8. doi:10.1152/ajpcell.00327.2011.
60. Jauliac S, López-Rodríguez C, Shaw LM, Brown LF, Rao A, Toker A. The role of NFAT transcription factors in integrin-mediated carcinoma invasion. *Nat Cell Biol*. 2002;4(7):540-544. doi:10.1038/ncb816.
61. Yoon H-J, You S, Yoo S-A, et al. NF-AT5 is a critical regulator of inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum*. 2011;63(7):1843-1852. doi:10.1002/art.30229.

62. Ranjbar S, Tsytsykova A V., Lee SK, et al. NFAT5 regulates HIV-1 in primary monocytes via a highly conserved long terminal repeat site. *PLoS Pathog.* 2006;2(12):1176-1186. doi:10.1371/journal.ppat.0020130.
63. Trama J, Go WY, Ho SN. The osmoprotective function of the NFAT5 transcription factor in T cell development and activation. *J Immunol.* 2002;169:5477-5488. doi:10.4049/jimmunol.169.10.5477.
64. López-Rodríguez C, Antos CL, Shelton JM, et al. Loss of NFAT5 results in renal atrophy and lack of tonicity-responsive gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(8):2392-2397. doi:10.1073/pnas.0308703100.
65. Mak MC, Lam KM, Chan PK, et al. Embryonic lethality in mice lacking the nuclear factor of activated t cells 5 protein due to impaired cardiac development and function. *PLoS One.* 2011;6(7):1-8. doi:10.1371/journal.pone.0019186.
66. Halterman J a., Kwon HM, Zargham R, Bortz PDS, Wamhoff BR. Nuclear factor of activated T cells 5 regulates vascular smooth muscle cell phenotypic modulation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011;31(10):2287-2296. doi:10.1161/ATVBAHA.111.232165.
67. Scherer C, Pfisterer L, Wagner a. H, et al. Arterial Wall Stress Controls NFAT5 Activity in Vascular Smooth Muscle Cells. *J Am Heart Assoc.* 2014;3(2):e000626-e000626. doi:10.1161/JAHA.113.000626.
68. Chevalier F. Highlights on the capacities of “Gel-based” proteomics. *Proteome Sci.* 2010;8:23. doi:10.1186/1477-5956-8-23.
69. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 2001;29(9):e45. doi:10.1093/nar/29.9.e45.
70. Schenk J, McNeill JH. The pathogenesis of DOCA-salt hypertension. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 1992;27(3):161-170. doi:10.1016/1056-8719(92)90036-Z.
71. Fernandes S, Bruneval P, Hagege a, Heudes D, Ghostine S, Bouby N. Chronic V2 vasopressin receptor stimulation increases basal blood pressure and exacerbates deoxycorticosterone acetate-salt hypertension. *Endocrinology.* 2002;143(7):2759-2766. doi:10.1210/endo.143.7.8918.
72. Wang J, Weigand L, Wang W, Sylvester JT, Shimoda L a. Chronic hypoxia inhibits K v channel gene expression in rat distal pulmonary artery. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2005;21224:L1049-L1058. doi:10.1152/ajplung.00379.2004.
73. Stenmark KR. Hypoxia-Induced Pulmonary Vascular Remodeling: Cellular and Molecular Mechanisms. *Circ Res.* 2006;99(7):675-691. doi:10.1161/01.RES.0000243584.45145.3f.

Kapitel 10

74. Voelkel NF, Tuder RM. Hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling: a model for what human disease? *J Clin Invest.* 2000;106(6):733-738. doi:10.1172/JCI111144.
75. Mandegar M, Yuan JX-J. Role of K⁺ channels in pulmonary hypertension. *Vascul Pharmacol.* 2002;38(1):25-33. doi:10.1016/S1537-1891(02)00123-4.
76. Lin M-J. Chronic Hypoxia-Induced Upregulation of Store-Operated and Receptor-Operated Ca²⁺ Channels in Pulmonary Arterial Smooth Muscle Cells: A Novel Mechanism of Hypoxic Pulmonary Hypertension. *Circ Res.* 2004;95(5):496-505. doi:10.1161/01.RES.0000138952.16382.ad.
77. Hayashi K, Naiki T. Adaptation and remodeling of vascular wall; biomechanical response to hypertension. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2009;2(1):3-19. doi:10.1016/j.jmbbm.2008.05.002.
78. Bensaude O, Bensaude O. Inhibiting eukaryotic transcription. Which compound to choose? How to evaluate its activity? *Transcription.* 2011;2(3):103-108. doi:10.4161/trns.2.3.16172.
79. Gallastegui N, Groll M. The 26S proteasome: assembly and function of a destructive machine. *Trends Biochem Sci.* 2010;35(11):634-642. doi:10.1016/j.tibs.2010.05.005.
80. Chang K-W, Yang P-Y, Lai H-Y, Yeh T-S, Chen T-C, Yeh C-T. Identification of a novel actin isoform in hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res.* 2006;36(1):33-39. doi:10.1016/j.hepres.2006.05.003.
81. Bunnell TM, Burbach BJ, Shimizu Y, Ervasti JM. β -Actin specifically controls cell growth, migration, and the G-actin pool. *Mol Biol Cell.* 2011;22(21):4047-4058. doi:10.1091/mbc.E11-06-0582.
82. Ridley AJ, Schwartz M a, Burridge K, et al. Cell migration: integrating signals from front to back. *Science.* 2003;302(5651):1704-1709. doi:10.1126/science.1092053.
83. William T. Gerthoffer DS. Motility, Survival and Proliferation. *Compr Physiol.* 2012;2(1):255-281. doi:10.1037/a0030561.Striving.
84. Tojkander S, Gateva G, Lappalainen P. Actin stress fibers - assembly, dynamics and biological roles. *J Cell Sci.* 2012;125(Pt 8):1855-1864. doi:10.1242/jcs.098087.
85. Maouyo D, Kim JY, Lee SD, Wu Y, Woo SK, Kwon HM. Mouse TonEBP-NFAT5: expression in early development and alternative splicing. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2002;282(5):F802-F809. doi:10.1152/ajprenal.00123.2001.
86. Irrazabal CE, Liu JC, Burg MB, Ferraris JD. ATM, a DNA damage-inducible kinase, contributes to activation by high NaCl of the transcription factor TonEBP/OREBP. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(23):8809-8814. doi:10.1073/pnas.0403062101.

87. Bijlmakers M-J, Marsh M. The on–off story of protein palmitoylation. *Trends Cell Biol.* 2015;13(1):32-42. doi:10.1016/S0962-8924(02)00008-9.
88. Eisenhaber B, Sammer M, Lua WH, et al. Nuclear import of a lipid-modified transcription factor: Mobilization of NFAT5 isoform a by osmotic stress. *Cell Cycle.* 2011;10(22):3897-3911. doi:10.4161/cc.10.22.18043.
89. Salaun C, Greaves J, Chamberlain LH. The intracellular dynamic of protein palmitoylation. *J Cell Biol.* 2010;191(7):1229-1238. doi:10.1083/jcb.201008160.
90. Haudenschild CC, Grunwald J, Chobanian a. V. Effects of hypertension on migration and proliferation of smooth muscle in culture. *Hypertension.* 1985;7(3_Pt_2):1101-1101. doi:10.1161/01.HYP.7.3_Pt_2.1101.
91. Cai Q, Ferraris JD, Burg MB. High NaCl increases TonEBP/OREBP mRNA and protein by stabilizing its mRNA. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2005;289(4):F803-F807. doi:10.1152/ajprenal.00448.2004.
92. Lee S Do, Colla E, Sheen MR, Na KY, Kwon HM. Multiple Domains of TonEBP Cooperate to Stimulate Transcription in Response to Hypertonicity. *J Biol Chem.* 2003;278(48):47571-47577. doi:10.1074/jbc.M308795200.
93. Neuhofer W, KÄ¼per C, Lichtnekert J, et al. Focal adhesion kinase regulates the activity of the osmosensitive transcription factor TonEBP/NFAT5 under hypertonic conditions. *Front Physiol.* 2014;5(April):1-11. doi:10.3389/fphys.2014.00123.
94. Gunst SJ, Tang DD, Opazo Saez A. Cytoskeletal remodeling of the airway smooth muscle cell: a mechanism for adaptation to mechanical forces in the lung. *Respir Physiol Neurobiol.* 2003;137(2-3):151-168. doi:10.1016/S1569-9048(03)00144-7.
95. Miyakawa H, Woo SK, Dahl SC, Handler JS, Kwon HM. Tonicity-responsive enhancer binding protein, a rel-like protein that stimulates transcription in response to hypertonicity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(5):2538-2542. doi:10.1073/pnas.96.5.2538.
96. Willis MS, Townley-Tilson WHD, Kang EY, Homeister JW, Patterson C. Sent to destroy: The ubiquitin proteasome system regulates cell signaling and protein quality control in cardiovascular development and disease. *Circ Res.* 2010;106(3):463-478. doi:10.1161/CIRCRESAHA.109.208801.
97. Bedford L, Lowe J, Dick LR, Mayer RJ, Brownell JE. Ubiquitin-like protein conjugation and the ubiquitin-proteasome system as drug targets. *Nat Rev Drug Discov.* 2011;10(1):29-46. doi:10.1038/nrd3321.
98. Clague MJ, Urbé S. Ubiquitin: Same molecule, different degradation pathways. *Cell.* 2010;143(5):682-685. doi:10.1016/j.cell.2010.11.012.

Kapitel 10

99. Nguyen LK, Dobrzyński M, Fey D, Kholodenko BN. Polyubiquitin chain assembly and organization determine the dynamics of protein activation and degradation. *Front Physiol.* 2014;5(January):4. doi:10.3389/fphys.2014.00004.
100. Radivojac P, Vacic V, Haynes C, et al. Identification, Analysis and Prediction of Protein Ubiquitination Sites. *Proteins.* 2011;78(2):365-380. doi:10.1002/prot.22555.Identification.
101. Woo SK, Maouyo D, Handler JS, Kwon HM. Nuclear redistribution of tonicity-responsive enhancer binding protein requires proteasome activity. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2000;278(2):C323-C330. <http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=10666027&retmode=ref&cmd=prlinks\papers2://publication/uuid/29AAD97E-4EEA-4059-B9C5-604A54CC8C14>.
102. Lammers PE, Beck JA, Chu S, Kempson SA. Hypertonic upregulation of betaine transport in renal cells is blocked by a proteasome inhibitor. *Cell Biochem Funct.* 2005;23(5):315-324. doi:10.1002/cbf.1241.
103. Ito T, Fujio Y, Takahashi K, Azuma J. Degradation of NFAT5, a transcriptional regulator of osmotic stress-related genes, is a critical event for doxorubicin-induced cytotoxicity in cardiac myocytes. *J Biol Chem.* 2007;282(2):1152-1160. doi:10.1074/jbc.M609547200.
104. Ko BC, Turck CW, Lee KW, Yang Y, Chung SS. Purification, identification, and characterization of an osmotic response element binding protein. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000;270(1):52-61. doi:10.1006/bbrc.2000.2376.
105. Wang Y, Liu J, Huang BO, et al. Mechanism of alternative splicing and its regulation. *Biomed reports.* 2015;3(2):152-158. doi:10.3892/br.2014.407.
106. Lara-Pezzi E, Dopazo a., Manzanares M. Understanding cardiovascular disease: a journey through the genome (and what we found there). *Dis Model Mech.* 2012;5(4):434-443. doi:10.1242/dmm.009787.
107. Dalski A, Schwinger E, Zühlke C. Genomic organization of the human NFAT5 gene: exon-intron structure of the 14-kb transcript and CpG-island analysis of the promoter region. *Cytogenet Genome Res.* 2001;93(3-4):239-241. <http://www.karger.com/DOI/10.1159/000056990>.
108. Dalski A, Wagner H-J, Schwinger E, Zühlke C. Quantitative PCR analysis of different splice forms of NFAT5 revealed specific gene expression in fetal and adult brain. *Mol Brain Res.* 2000;83(1-2):125-127. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0169-328X(00)00202-3.
109. Roth P, Xylourgidis N, Sabri N, Uv A, Fornerod M, Samakovlis C. The Drosophila nucleoporin DNup88 localizes DNup214 and CRM1 on the nuclear envelope and

- attenuates NES-mediated nuclear export. *J Cell Biol.* 2003;163(4):701-706. doi:10.1083/jcb.200304046.
110. Andres-Hernando A, Lanaspa MA, Rivard CJ, Berl T. Nucleoporin 88 (Nup88) Is Regulated by Hypertonic Stress in Kidney Cells to Retain the Transcription Factor Tonicity Enhancer-binding Protein (TonEBP) in the Nucleus. *J Biol Chem.* 2008;283(36):25082-25090. doi:10.1074/jbc.M802381200.
111. Ren J, Wen L, Gao X, Jin C, Xue Y, Yao X. CSS-Palm 2.0: An updated software for palmitoylation sites prediction. *Protein Eng Des Sel.* 2008;21(11):639-644. doi:10.1093/protein/gzn039.
112. Adams MN, Christensen ME, He Y, Waterhouse NJ, Hooper JD. The Role of Palmitoylation in Signalling, Cellular Trafficking and Plasma Membrane Localization of Protease-Activated Receptor-2. *PLoS One.* 2011;6(11):e28018. doi:10.1371/journal.pone.0028018.
113. Martin BR, Wang C, Adibekian A, Tully SE, Cravatt BF. Global profiling of dynamic protein palmitoylation. *Nat Methods.* 2011;9(1):84-89. doi:10.1038/nmeth.1769.
114. Charych EI, Jiang L-X, Lo F, Sullivan K, Brandon NJ. Interplay of palmitoylation and phosphorylation in the trafficking and localization of phosphodiesterase 10A: implications for the treatment of schizophrenia. *J Neurosci.* 2010;30(27):9027-9037. doi:10.1523/JNEUROSCI.1635-10.2010.
115. Linder ME, Deschenes RJ. Palmitoylation: policing protein stability and traffic. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007;8(1):74-84. doi:10.1038/nrm2084.
116. Moffett S, Mouillac B, Bonin H, Bouvier M. Altered phosphorylation and desensitization patterns of a human beta 2-adrenergic receptor lacking the palmitoylated Cys341. *EMBO J.* 1993;12(1):349-356. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=413212&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
117. Lou BK, Writer S. Metabolic origins for pulmonary hypertension. 2010:1-3.
118. Nardozi JD, Lott K, Cingolani G. Phosphorylation meets nuclear import: a review. *Cell Commun Signal.* 2010;8(1):32. doi:10.1186/1478-811X-8-32.
119. Ubersax J a, Ferrell JE. Mechanisms of specificity in protein phosphorylation. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007;8(7):530-541. doi:10.1038/nrm2203.
120. Deribe YL, Pawson T, Dikic I. Post-translational modifications in signal integration. *Nat Struct Mol Biol.* 2010;17(6):666-672. <http://dx.doi.org/10.1038/nsmb.1842>.
121. Ortega-Pérez I, Cano E, Were F, Villar M, Vázquez J, Redondo JM. c-Jun N-terminal kinase (JNK) positively regulates NFATc2 transactivation through phosphorylation

Kapitel 10

- within the N-terminal regulatory domain. *J Biol Chem*. 2005;280(21):20867-20878. doi:10.1074/jbc.M501898200.
122. Küper C, Beck F-X, Neuhofer W. NFAT5-mediated expression of S100A4 contributes to proliferation and migration of renal carcinoma cells . *Front Physiol* . 2014;5 .
http://www.frontiersin.org/Journal/Abstract.aspx?s=573&name=integrative_physiology&ART_DOI=10.3389/fphys.2014.00293.
 123. Roth I, Leroy V, Kwon HM, Martin P-Y, Féraille E, Hasler U. Osmoprotective Transcription Factor NFAT5/TonEBP Modulates Nuclear Factor- κ B Activity. Tansey W, ed. *Mol Biol Cell*. 2010;21(19):3459-3474. doi:10.1091/mbc.E10-02-0133.
 124. Johnson LN. The regulation of protein phosphorylation. *Biochem Soc Trans*. 2009;37(4):627-641. doi:10.1042/BST0370627.
 125. Johnson LN. Protein kinase inhibitors: contributions from structure to clinical compounds. *Q Rev Biophys*. 2009;42(01):1-40.
[href="http://dx.doi.org/10.1017/S0033583508004745](http://dx.doi.org/10.1017/S0033583508004745).
 126. Dos Santos C, McDonald T, Ho YW, et al. The Src and c-Kit kinase inhibitor dasatinib enhances p53-mediated targeting of human acute myeloid leukemia stem cells by chemotherapeutic agents. *Blood*. 2013;122(11):1900-1913.
<http://www.bloodjournal.org/content/122/11/1900.abstract>.
 127. Francini CM, Fallacara AL, Artusi R, et al. Identification of Aminoimidazole and Aminothiazole Derivatives as Src Family Kinase Inhibitors. *ChemMedChem*. 2015;n/a - n/a. doi:10.1002/cmdc.201500428.
 128. Chen M, Sastry SK, O'Connor KL. Src kinase pathway is involved in NFAT5-mediated S100A4 induction by hyperosmotic stress in colon cancer cells. *AJP Cell Physiol*. 2011;300(5):C1155-C1163. doi:10.1152/ajpcell.00407.2010.
 129. Yoshida T, Owens GK. Molecular determinants of vascular smooth muscle cell diversity. *Circ Res*. 2005;96(3):280-291.
doi:10.1161/01.RES.0000155951.62152.2e.
 130. Ishigaki T, Imanaka-Yoshida K, Shimojo N, Matsushima S, Taki W, Yoshida T. Tenascin-C enhances crosstalk signaling of integrin α v β 3/PDGFR- β complex by SRC recruitment promoting PDGF-induced proliferation and migration in smooth muscle cells. *J Cell Physiol*. 2011;226(10):2617-2624. doi:10.1002/jcp.22614.
 131. Jones PL, Crack J, Rabinovitch M. Regulation of Tenascin-C, a Vascular Smooth Muscle Cell Survival Factor that Interacts with the α v β 3 Integrin to Promote Epidermal Growth Factor Receptor Phosphorylation and Growth. *J Cell Biol*. 1997;139(1):279-293.

132. Jones PL, Rabinovitch M. Tenascin-C Is Induced With Progressive Pulmonary Vascular Disease in Rats and Is Functionally Related to Increased Smooth Muscle Cell Proliferation. *Circ Res* . 1996;79 (6):1131-1142. doi:10.1161/01.RES.79.6.1131.
133. Cowan KN, Jones PL, Rabinovitch M. Elastase and matrix metalloproteinase inhibitors induce regression, and tenascin-C antisense prevent progression, of vascular disease. *J Clin Invest*. 2000;105(1):21-34.
134. Zhang, Liu. REVIEW MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. 2002;12:9-18.
135. Portt L, Norman G, Clapp C, Greenwood M, Greenwood MT. Biochimica et Biophysica Acta Anti-apoptosis and cell survival : A review. *BBA - Mol Cell Res*. 2011;1813(1):238-259. doi:10.1016/j.bbamcr.2010.10.010.
136. Chung CY, Erickson HP. Cell surface annexin II is a high affinity receptor for the alternatively spliced segment of tenascin-C. *J Cell Biol*. 1994;126(2):539-548. http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2200039&tool=pmc_entrez&rendertype=abstract.
137. Feng Y, Yang J, Huang H, et al. Transcriptional Profile of Mechanically Induced Genes in Human Vascular Smooth Muscle Cells. 1999:1118-1123.
138. LaFleur, Fagin., Forrester, Rubin, Behrooz, Sharifi. Cloning and Characterization of Alternatively Spliced Isoforms of Rat Tenascin. *J Biol Chem*. 1994;4(9):20757-20763. doi:10.1093/hmg/4.9.1475.
139. Imanaka-Yoshida K, Matsuura R, Isaka N, Nakano T, Sakakura T, Yoshida T. Serial extracellular matrix changes in neointimal lesions of human coronary artery after percutaneous transluminal coronary angioplasty: clinical significance of early tenascin-C expression. *Virchows Arch*. 2001;439(2):185-190.
140. Hedin U, Holm J, Hansson GK. Induction of tenascin in rat arterial injury. Relationship to altered smooth muscle cell phenotype. *Am J Pathol*. 1991;139(3):649-656.
141. Perrin BJ, Ervasti JM. The actin gene family: function follows isoform. *Cytoskeleton (Hoboken, NJ)*. 2010;67(10):630-634. doi:10.1002/cm.20475.
142. Lee SH, Dominguez R. Regulation of actin cytoskeleton dynamics in cells. *Mol Cells*. 2010;29(4):311-325. doi:10.1007/s10059-010-0053-8.
143. Gerthoffer WT. Mechanisms of vascular smooth muscle cell migration. *Circ Res*. 2007;100(5):607-621. doi:10.1161/01.RES.0000258492.96097.47.

Kapitel 10

144. Chang KW, Chou A, Lee CC, et al. Overexpression of κ -actin alters growth properties of hepatoma cells and predicts poor postoperative prognosis. *Anticancer Res.* 2011;31(6):2037-2044.
145. Garrett SC, Varney KM, Weber DJ, Bresnick AR. S100A4 , a Mediator of. 2007;281(2):677-680. doi:10.1074/jbc.R500017200.
146. Saleem M, Kweon M, Johnson JJ, et al. S100A4 accelerates tumorigenesis and invasion of human prostate cancer through the transcriptional regulation of matrix metalloproteinase 9. 2006;103(40).
147. Guo K, Jin F. NFAT5 promotes proliferation and migration of lung adenocarcinoma cells in part through regulating AQP5 expression. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015;465(3):644-649. doi:10.1016/j.bbrc.2015.08.078.
148. Chen Z, Zhang Z, Gu Y, Bai C. Impaired migration and cell volume regulation in aquaporin 5-deficient SPC-A1 cells. *Respir Physiol Neurobiol.* 2011;176(3):110-117. doi:10.1016/j.resp.2011.02.001.
149. Jiang XX, Xu KH, Ma JY, et al. Reduced migration of Ishikawa cells associated with downregulation of aquaporin-5. *Oncol Lett.* 2012;4(2):257-261. doi:10.3892/ol.2012.738.
150. Berk BC, Vekshtein VI, Gordon HM, Tsuda T. Angiotensin II-stimulated protein synthesis in cultured vascular smooth muscle cells. *Hypertension.* 1989;13:305-314.
151. Weber H, Taylor DS, Molloy CJ. Angiotensin II induces delayed mitogenesis and cellular proliferation in rat aortic smooth muscle cells. Correlation with the expression of specific endogenous growth factors and reversal by suramin. *J Clin Invest.* 1994;93(2):788-798. doi:10.1172/JCI117033.
152. Linseman D a, Benjamin CW, Jones D a. Convergence of angiotensin II and platelet-derived growth factor receptor signaling cascades in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem.* 1995;270(21):12563-12568. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7759503>.
153. Archer S, Rich S. *Clinical Cardiology : New Frontiers Primary Pulmonary Hypertension.* 2000:2781-2791. doi:10.1161/01.CIR.102.22.2781.
154. Zhao L. Chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension in rat: the best animal model for studying pulmonary vasoconstriction and vascular medial hypertrophy. *Drug Discov Today Dis Model.* 2010;7(3-4):83-88. doi:10.1016/j.ddmod.2011.02.005.
155. Coste F, Toussaint C, Dubois M, et al. Reversal of experimental severe pulmonary hypertension by NGF inhibition. *Rev Mal Respir.* 2015;32(3):325. doi:10.1016/j.rmr.2015.02.053.

156. Mam V, Tanbe AF, Vitali SH, Arons E, Christou H a, Khalil R a. Impaired Vasoconstriction and Nitric Oxide-Mediated Relaxation in Pulmonary Arteries of Hypoxia- and Monocrotaline-Induced Pulmonary Hypertensive Rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 2010;332(2):455-462. doi:10.1124/jpet.109.160119.
157. Wang Z, Lakes RS, Golob M, Eickhoff JC, Chesler NC. Changes in large pulmonary arterial viscoelasticity in chronic pulmonary hypertension. *PLoS One.* 2013;8(11):e78569. doi:10.1371/journal.pone.0078569.
158. Jones P, Crack J, Rabinovitch M. tenascin-C, a vascular smooth muscle cell survival factor that interacts with the $\alpha\beta3$ integrin to promote epidermal growth factor receptor phosphorylation and growth. *J Cell Biol.* 1997;139(1):279-293. <http://jcb.rupress.org/content/139/1/279.abstract>.
159. Jones PL, Cowan KN, Rabinovitch M. Tenascin-C, proliferation and subendothelial fibronectin in progressive pulmonary vascular disease. *Am J Pathol.* 1997;150(4):1349-1360. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1858188&tool=pmc&rendertype=abstract>.
160. Villanueva S, Suazo C, Santapau D, et al. NFAT5 is activated by hypoxia: role in ischemia and reperfusion in the rat kidney. *PLoS One.* 2012;7(7):e39665. doi:10.1371/journal.pone.0039665.
161. Mackie EJ, Scott-Burden T, Hahn a W, et al. Expression of tenascin by vascular smooth muscle cells. Alterations in hypertensive rats and stimulation by angiotensin II. *Am J Pathol.* 1992;141(2):377-388. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1886597&tool=pmc&rendertype=abstract>.
162. Du Y-H, Guan Y-Y, Alp NJ, Channon KM, Chen a. F. Endothelium-Specific GTP Cyclohydrolase I Overexpression Attenuates Blood Pressure Progression in Salt-Sensitive Low-Renin Hypertension. *Circulation.* 2008;117(8):1045-1054. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.107.748236.
163. Sarzani R, Arnaldi G, Chobanian A V. Hypertension-Induced Changes of Platelet-Derived Growth Factor Receptor Expression in Rat Aorta and Heart.
164. Neuville P, Bochaton-Piallat ML, Gabbiani G. Retinoids and arterial smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20(8):1882-1888.
165. Montani D, Bergot E, Günther S, et al. Pulmonary arterial hypertension in patients treated by dasatinib. *Circulation.* 2012;125(17):2128-2137. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.111.079921.
166. Montani D, Seferian A, Savale L, Simonneau G, Humbert M. Drug-induced pulmonary arterial hypertension: A recent outbreak. *Eur Respir Rev.* 2013;22(129):244-250. doi:10.1183/09059180.00003313.

Kapitel 10

167. Wong WKP, Knowles J a, Morse JH. Bone Morphogenetic Protein Receptor Type II C-Terminus Interacts with c-Src. *Cell Mol Biol*. 2005. doi:10.1165/rcmb.2005-0103OC.
168. Courboulin A, Paulin R, Giguère NJ, et al. Role for miR-204 in human pulmonary arterial hypertension. *J Exp Med*. 2011;208(3):535-548. doi:10.1084/jem.20101812.
169. Ghofrani HA, Morrell NW, Hoeper MM, et al. Imatinib in pulmonary arterial hypertension patients with inadequate response to established therapy. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010;182(9):1171-1177. doi:10.1164/rccm.201001-0123OC.
170. Hatano M, Yao A, Shiga T, Kinugawa K, Hirata Y, Nagai R. Imatinib mesylate has the potential to exert its efficacy by down-regulating the plasma concentration of platelet-derived growth factor in patients with pulmonary arterial hypertension. *Int Heart J*. 2010;51(4):272-276. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20716845>.
171. Jia L, Tang DD. Abl activation regulates the dissociation of CAS from cytoskeletal vimentin by modulating CAS phosphorylation in smooth muscle. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2010;299(3):C630-C637. doi:ajpcell.00095.2010 [pii]r10.1152/ajpcell.00095.2010.
172. Jia L, Wang R, Tang DD. Abl regulates smooth muscle cell proliferation by modulating actin dynamics and ERK1/2 activation. *Am J Physiol - Cell Physiol*. 2012;302(7):C1026-C1034. doi:10.1152/ajpcell.00373.2011.
173. Merrill CL, Ni H, Yoon LW, et al. Etomoxir-induced oxidative stress in HepG2 cells detected by differential gene expression is confirmed biochemically. *Toxicol Sci*. 2002;68(1):93-101. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12075114>.
174. He L, Kim T, Long Q, et al. Carnitine Palmitoyltransferase-1b (CPT1b) Deficiency Aggravates Pressure-Overload-Induced Cardiac Hypertrophy due to Lipotoxicity. *Circulation*. 2012;126(14):1705-1716. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.111.075978.

11 Publikationsliste

1. **Hödebeck M**, Scherer C, Wagner AH, Hecker M, Korff T. TonEBP/NFAT5 regulates ACTBL2 expression in biomechanically activated vascular smooth muscle cells. *Front Physiol.* 2014 Dec 3;5:467. doi: 10.3389/fphys.2014.00467. eCollection 2014.
2. Scherer C, Pfisterer L, Wagner AH, **Hödebeck M**, Cattaruzza M, Hecker M, Korff T. Arterial Wall Stress Controls NFAT5 Activity in Vascular Smooth Muscle Cells. *J Am Heart Assoc.* 2014;3(2):e000626-e000626. doi:10.1161/JAHA.113.000626
3. Arnold C, Feldner A, Pfisterer L, **Hödebeck M**, Troidl K, Genové G, Wieland T, Hecker M, Korff T. RGS5 promotes arterial growth during arteriogenesis. *EMBO Mol Med.* 2014 Jun 27;6(8):1075-89. doi: 10.15252/emmm.201403864.
4. In Vorbereitung: **Zappe M**, Arnold C, Neuhofer W, Kunze R, Hecker M, Korff T. NFAT5 Controls Vessel Wall Remodeling during Pulmonary Artery Hypertension.

Kapitel 12

12 Danksagung

Ich möchte mich an erster Stelle bei Prof. Dr. Markus Hecker für die Möglichkeit bedanken, meine wissenschaftliche Promotion am Institut für Physiologie und Pathophysiologie der Universität Heidelberg durchführen zu können. Aber auch für die finanzielle Unterstützung, für die projektbezogenen Ideen und für die konstruktive Kritik bei allen Treffen und Veranstaltungen.

Ganz besonders möchte ich mich auch bei Prof. Dr. Thomas Korff bedanken, der mich während der Doktorarbeit sowohl gefordert und gefördert hat und immer ein offenes Ohr hatte, wenn die Probleme einem scheinbar über den Kopf wachsen wollten. Nach einem Start mit vielen Hürden im Projekt war es mit seiner Unterstützung möglich, „meinem“ NFAT5 so viele wertvolle Informationen zu entlocken, die auch in Zukunft sicherlich von Bedeutung sein werden. Ich habe in dieser Zeit sehr viel von ihm gelernt, sowohl was das wissenschaftliche Arbeiten betrifft als auch für meine persönliche Entwicklung. Vielen Dank!

Bedanken möchte ich auch bei den Mitgliedern meines Thesis Advisory Committees Prof. Dr. Johannes Backs, Prof. Dr. Felix Wieland und Prof. Dr. Marc Freichel für die interessanten Diskussionen, wertvollen Tipps und die Kritik, die mir dabei geholfen haben, das Projekt in eine spannende Richtung zu lenken.

Auch bei PD. Dr. Wolfgang Neuhofer möchte ich für die gute Zusammenarbeit bedanken, durch die mein Projekt im letzten Jahr viele interessante Aspekte dazugewonnen hat.

Auch bei den technischen Assistenten möchte ich mich ganz herzlich bedanken, die einem stets mit Rat und Tat zur Seite standen. Dabei möchte ich mich besonders bedanken bei: Gudrun Scheib für die tolle Zusammenarbeit und Hilfe bei den vielen histologischen Schnitten, die ich anfertigen musste; Yvonne Feuchter, die mir das tierexperimentelle Arbeiten näher gebracht hat; Maria Harlacher für alle wertvollen Tipps und Tricks beim histologischen Arbeiten und Inge Keller, die bei der zeitintensiven Betreuung der Mäuse geholfen hat; Marie Bartenschlager und Ender Serbest, die leider nicht mehr am Institut arbeiten, aber in ihrer Zeit immer für Zellennachschub sorgten, sowie Franziska Fitzer für die Unterstützung bei der ChIP-Analyse.

Des Weiteren möchte ich mich auch bei den Gruppenleitern und Post-Docs für die gute Zusammenarbeit bedanken. Dabei ist PD Dr. Andreas Wagner besonders zu nennen, der mir bei den bioinformatischen Analysen geholfen hat, sowie Dr. Reiner Kunze für die Unterstützung bei den Hypoxie-Experimenten.

Aber auch bei meinen Kollegen Dr. Caroline Arnold, Ivelina Kadiyska und Eda Demirel möchte ich mich für die fachliche und persönliche Unterstützung während der Zeit am Institut bedanken. Bei Barbara Richards möchte ich mich für all die organisatorische Hilfe ganz besonders bedanken. Bedanken möchte ich mich auch bei Dr. Larissa Pfisterer für die gute fachliche und praktische Einarbeitung und auch bei allen Doktoranden sowie ehemaligen Doktoranden für die freundliche Arbeitsatmosphäre. Hier sind besonders zu nennen: Dr. Subhajit Gosh, Tanja Wiedenmann, Dr. Hannes Schröder, Cheryl Sultan, Felix Trogisch, Hanna Kuk, Maximilian Heiß, Florian Schnitter, Synje Wieber und Dr. Clemens Scherer.

Ich danke meinen Freunden Stefan Till und Dorothee Ströbel für die Zeit, die sie investiert haben, um den Fehlerteufel aus dieser Arbeit zu vertreiben! Auch meinem Patenkind Lina und ihrem Bruder Erik Till danke ich – auch wenn sie noch zu klein sind, um das zu lesen – für die abwechslungsreiche Zeit auf dem Spielplatz, die gegen Schreibblockaden gewirkt hat.

Des Weiteren danke ich meiner Familie für die seelische und moralische Unterstützung während der Doktorarbeit: Meiner Mutter, meiner Schwester Lena, meiner Großmutter und meinem Vater, der meine Promotion leider nicht mehr miterleben durfte. Aber auch meinen Schwiegereltern Hanne und Bernd möchte ich für all die Hilfe im letzten Jahr danken.

Einen großen Dank möchte ich auch meinem Mann Stefan aussprechen, der mich in dieser teils sehr anstrengenden Zeit hervorragend unterstützt hat. Sei es das Abholen spät am Abend, das fertige Essen, das auf dem Tisch stand, wenn ich nach einem langen Labortag nach Hause gekommen bin oder aber einfach nur, dass er für mich da gewesen ist und immer sein wird; all das hat mir immer wieder Aufschwung gegeben, gerade auch dann, wenn nicht immer alles nach Plan verlaufen ist.