

Aus der Medizinischen Klinik m. S. Kardiologie und Angiologie
der Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Alternatives Splicing im Intron 13 der
humanen eNOS: ein potentieller
Mechanismus für die Regulation der
eNOS-Aktivität**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité - Universitätsmedizin Berlin

von
Bernd Hewing
aus Münster

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. K. Stangl

2. Prof. Dr. med. M. Endres

3. Prof. Dr. S. Dimmeler

Datum der Promotion: 19.09.2008

1	EINLEITUNG	1
1.1	RNA-Splicing	1
1.1.1	Konstitutives RNA-Splicing	1
1.1.2	Mechanismus des RNA-Splicings	2
1.1.3	Alternatives Splicing	3
1.2	Die Bedeutung der NO-Synthasen	5
1.2.1	Isoenzyme der NO-Synthasen	5
1.2.2	Endotheliale NO-Synthase (eNOS)	6
1.2.3	Regulation der eNOS	8
1.3	Zielsetzung der Arbeit	10
2	MATERIAL UND METHODEN	11
2.1	Allgemeine Materialien	11
2.1.1	Chemikalien	11
2.1.2	Geräte	13
2.1.3	Kulturmedien	13
2.1.4	DNA-Sequenzanalyse-Programm	14
2.1.5	Primer	14
2.1.6	Gewebeproben	14
2.2	Zellkultur	14
2.3	Zelllyse und Proteinextraktion	16
2.4	Bestimmung der Proteinkonzentration	16
2.5	Isolierung von Gesamt-RNA	17
2.6	Bestimmung der Konzentration und Reinheit von Nukleinsäuren	17
2.7	RT-PCR (Reverse Transkription Polymerase Kettenreaktion)	18
2.7.1	Reverse Transkription	18
2.7.2	5'-RACE und 3'-RACE	19
2.7.3	RT-PCR und RACE-PCR	19
2.8	Realtime RT-PCR (Taqman-PCR)	21
2.9	Agarose-Gelelektrophorese	24
2.10	Polyacrylamid-Gelelektrophorese für Taqman-PCR-Produkte	25
2.11	DNA-Isolierung aus Agarosegelen	25
2.12	DNA-Sequenzierung	26
2.13	Restriktionsverdau	27
2.14	Klonierung	27
2.14.1	Klonierung von PCR-Produkten mittels TOPO-TA-Cloning	27
2.14.2	Klonierung von Plasmid-DNA in pcDNA3.1 Vektor	28
2.15	Plasmidpräparationen mittels Alkalischer Lösung	29
2.16	Transiente Transfektion	31
2.17	Western Blot	32

2.17.1	Präparation der Polyacrylamid-Gele	34
2.17.2	SDS-Polyacrylamidelektrophorese	34
2.17.3	SemiDry-Blotting	35
2.17.4	Blocken & Antikörperbindung	35
2.18	Low-Temperature PAGE (LT-PAGE)	37
2.19	Arginin-Citrullin Konversionsassay mit Proteinextrakt	37
3	ERGEBNISSE	39
3.1	Identifizierung von drei neuen Splice-Varianten der humanen eNOS	39
3.2	Expression eines Proteins der Splice-Variante eNOS13A	41
3.3	Einfluss der Splice-Variante eNOS13A auf die eNOS-Aktivität	44
3.4	Heterodimerbildung von Splice-Variante eNOS13A mit full-length eNOS	45
3.5	Vorzeitiger Abbau der eNOS-Heterodimere durch das Proteasom	49
3.6	Nachweis der mRNA von eNOS Splice-Varianten in Endothelzellen und humanen Geweben	50
4	DISKUSSION	54
4.1	Alternatives Splicing und NO-Synthasen	54
4.2	Heterodimerisierung und eNOS-Aktivität	56
4.3	Expression der eNOS Splice-Varianten in Endothelzellen und humanen Geweben	59
4.4	Splicing-Enhancer im Intron 13	60
4.5	eNOS-assoziierte Erkrankungen und alternatives Splicing	60
4.6	Perspektiven	61
5	ZUSAMMENFASSUNG	62
6	ABSTRACT	63
7	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	64
8	LITERATURVERZEICHNIS	69
9	LEBENS LAUF	76
10	PUBLIKATIONEN	77
11	DANKSAGUNG	78
12	EIDESSTÄTTLICHE ERKLÄRUNG	79
13	ANHANG	80
13.1	Sequenz eNOS13A	80
13.2	Sequenz eNOS13B	82
13.3	Sequenz eNOS13C	84

1 Einleitung

1.1 RNA-Splicing

1.1.1 Konstitutives RNA-Splicing

Die Synthese eines Proteins erfolgt über die Transkription der genetischen Information in RNA und anschließender Translation in eine spezifische Aminosäuresequenz.

Die Transkription findet im Zellkern statt. Hier wird mittels DNA-abhängiger RNA-Polymerasen eine genaue Replika eines Gens in Form einer einzelsträngigen RNA erstellt. Dieses Primärtranskript wird als Präkursor-mRNA (prä-mRNA) bezeichnet und stellt eine Vorstufe der messenger-RNA (mRNA) dar. Durch diverse posttranskriptionelle Modifikationen im Zellkern erfolgt die Umwandlung in die reife mRNA. Dazu wird an das 5'-Ende der prä-mRNA 7-Methylguanosin-Triphosphat angeheftet (capping), das die RNA vor dem Abbau durch Nukleasen schützt, den Transport der mRNA durch die Kernporen und die Anheftung an die Ribosomen ermöglicht. Am 3'-OH Ende der prä-mRNA wird ein Poly-A-Schwanz bestehend aus 50 bis 200 Adenylresten angehängen. Poly-A schützt die mRNA vor enzymatischem Abbau und hat somit einen Einfluss auf die Halbwertszeit der RNA.

Beim Splicing werden die Introns aus der prä-mRNA entfernt und die Exons miteinander verknüpft, so dass die reife mRNA entsteht. Das Splicing findet während oder im Anschluss an die Transkription im Zellkern statt und verläuft unabhängig von den übrigen RNA-Modifikationen.

Zum präzisen Ablauf des Splice-Vorgangs bedarf es einer korrekten Erkennung der Exon-Intron-Grenzen, den so genannten Splice-Sites.

Die 5'-Splice-Site (acceptor-site) markiert den Übergang vom Exon zum Intron, das mit einer hochgradig konservierten Konsensussequenz in Form eines GT-Dinukleotids beginnt. Die 3'-Splice-Site (donor-site) beendet das Intron mit der Konsensussequenz AG (GT-AG-Regel). Das Erkennen der 3'-Splice-Site erfolgt über ein einzelnes A-Nukleotid innerhalb der branch-site. Die branch-site liegt 18-40 Nukleotide upstream der 3'-Splice-Site (Harris et al., 1990). In der Hefe ist die branch-site hochgradig konserviert und folgt der Konsensussequenz UACUAAC. In höheren Eukaryonten ist diese Konsensussequenz schwächer konserviert. Zwischen der branch-site und der 3'-Splice-Site befindet sich in Eukaryonten ein Polypyrimidintrakt variabler Länge (Lewin, 2002).

1.1.2 Mechanismus des RNA-Splicings

Die chemische Reaktion des RNA-Splicings beinhaltet zwei aufeinander folgende transesterifizierende Reaktionen.

Im ersten Schritt wird über einen nukleophilen Angriff der 2'-Hydroxy-Gruppe des Adenosin-Nukleotids der branch-site auf die Phosphodiesterbindung des G-Nukleotids der 5'-Splice-Site das 5'-Exon vom 3'-Rest der RNA abgetrennt. Über eine 5'-2'-Phosphodiester-Bindung zwischen dem freien 5'-Ende des Introns und dem A-Nukleotid der branch-site kommt es zur Ausbildung einer Lassostruktur (engl.: lariat = Lasso).

Im zweiten Schritt greift die 3'-Hydroxygruppe des freien 5'-Exons die Phosphodiesterbindung an der 3'-Splice-Site an. Die Exons werden über eine 5'-3'-Bindung kovalent verknüpft und das Intron als lariat freigesetzt (Grabowski et al., 1984).

Das Splicing wird durch das Spliceosom, einem Protein-RNA-Komplex, katalysiert. Das Spliceosom formiert sich durch die stufenweise Gruppierung von fünf small nuclear ribonucleoprotein-particles (snRNP, U1, U2, U4/U6 und U5) um die prä-mRNA. Die snRNPs setzen sich aus kleinen nukleären RNA-Molekülen (snRNA) und ca. 50 verschiedenen Proteinen zusammen. Neben den Proteinen der snRNPs enthält das Spliceosom weitere Proteine, die als Splicing-Faktoren bezeichnet werden, wie z.B. SR-Proteine, SRp (z.B. U2AF) oder hnRNP (Nilsen, 2003; Reed, 2000).

Das präzise Erkennen der 5'- und 3'-Splice-Sites erfolgt über die Komponenten des Splice-Komplexes und umfasst eine Reihe von RNA-Protein-, Protein-Protein-, sowie RNA-RNA-Interaktionen. Diese Interaktionen finden an drei für den Splicing-Prozess erforderlichen Strukturen statt: 5'-Splice-Site, branch-site und Polypyrimidintrakt/AG-Konsensussequenz der 3'-Splice-Site.

Im ersten Schritt der Spliceosomenbildung (E-(early-)Komplex) bindet die U1-snRNA an die 5'-Splice-Site. Diese Bindung erfolgt lediglich über 4 bis 7 komplementäre Basen und wird durch die Interaktion einer Vielzahl von SR-Proteinen unterstützt (Reed, 1996). Der Splicing-Faktor U2AF spielt eine bedeutende Rolle bei der Erkennung der 3'-Splice-Site. U2AF ist ein Heterodimer, das sich aus einer großen (U2AF⁶⁵) und einer kleinen Subunit (U2AF³⁵) zusammensetzt (Zamore et al., 1989). Während U2AF⁶⁵ direkt an den Polypyrimidintrakt bindet, erkennt U2AF³⁵ die AG-Konsensussequenz der 3'-Splice-Site und ist erforderlich für das Splicing von AG-abhängigen Introns mit einem schwachen (kurzen) Polypyrimidintrakt (Wu et al., 1993).

1.1.3 Alternatives Splicing

Die vollständige Sequenzierung des humanen Genoms hat gezeigt, dass der Mensch ca. 32.000 Gene besitzt. Dies sorgte für Erstaunen, zumal sich diese Zahl nicht erheblich von der Anzahl der Gene der *Drosophila* (14.000 Gene) oder *Caenorhabditis elegans* (19.000 Gene) unterscheidet (Modrek et al., 2002). Das Ungleichgewicht zwischen der Anzahl der Gene und der Komplexität des Organismus deutet darauf hin, dass die Anzahl funktioneller Proteine deutlich höher sein muss als nach der geringen Anzahl von Genen zu erwarten ist (Hui et al., 2005). Die „ein Gen - ein Protein“ Hypothese scheint somit veraltet.

Der bedeutendste Mechanismus zur Erhöhung der Proteinviefalt ist das alternative Splicing. Dabei entstehen aus einem RNA-Primärtranskript verschiedene reife mRNAs, die für funktionell unterschiedliche Proteine kodieren können. Ein beeindruckendes Beispiel bietet das *Drosophila*-Homolog des Down syndrome cell adhesion molecule (Dscam), einem Axon-guidance Rezeptor. Durch alternatives Splicing wird die Dscam prä-mRNA in über 38.000 verschiedene mRNA-Transkripte gespleißt. Dies entspricht der zwei- bis dreifachen Menge des gesamten *Drosophila*-Genoms. Jedes alternative Dscam-mRNA-Transkript kodiert dabei für einen funktionell eigenen Rezeptor (Graveley, 2001).

Anhand von prä-mRNA Splicing-Analysen mittels Microarrays konnte gezeigt werden, dass für mehr als 70% aller humanen Gene alternativ gespleißte Isoformen existieren (Johnson et al., 2003).

Es existieren fünf Basis-Modelle für alternatives Splicing. Wie in Abbildung 1 dargestellt, können Exons übersprungen oder eingeschlossen, verlängert oder verkürzt werden:

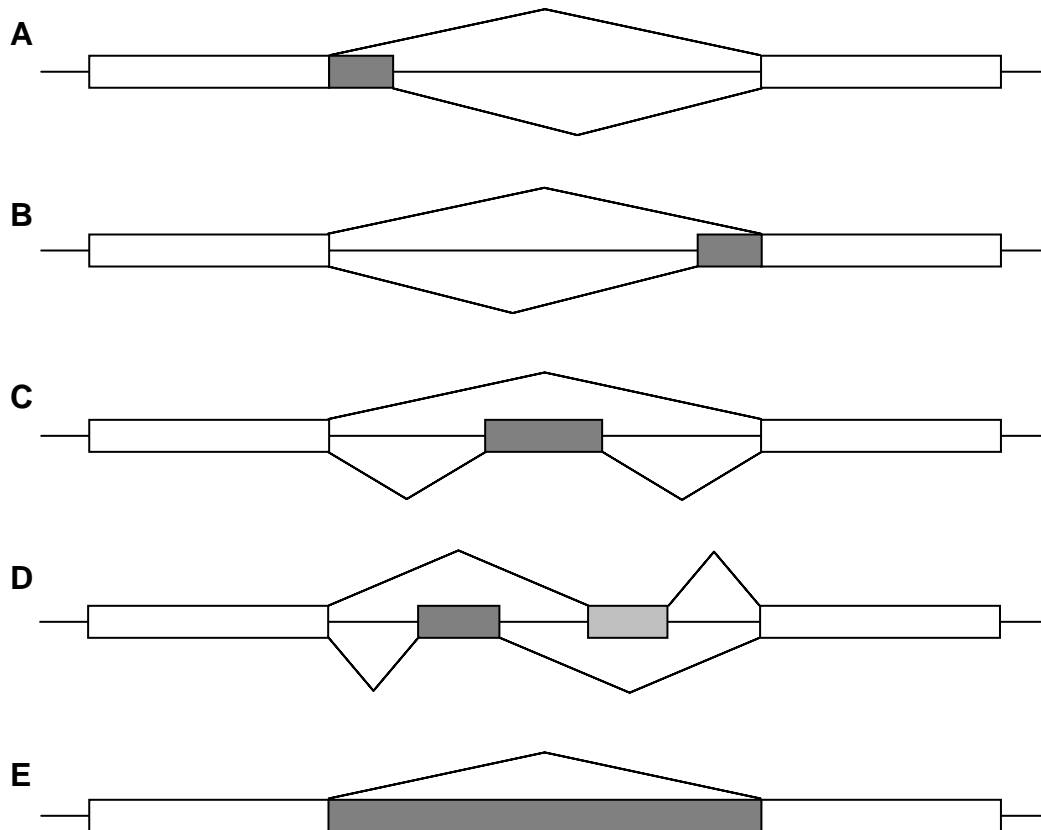


Abbildung 1: **Alternatives Splicing - Basismodelle.** Die konstitutiven Exons sind als weiße, die alternativen Exons als graue Boxen dargestellt. Die Linien über und unter den Boxen geben die möglichen alternativen Splice-Vorgänge an. Die Exons können alternative 5'- oder 3'-Splice-Sites besitzen (**A**), (**B**). Ein Exon kann übersprungen oder eingeschlossen werden (**C**). Es können mehrere alternative Exons zwischen den konstitutiven Exons liegen, so dass zwischen den Exons gewählt werden muss (**D**). Ein Intron kann vollständig in der mRNA zurückbehalten und translatiert werden (**E**) (nach Graveley 2001).

In Abhängigkeit von der Anzahl an Nukleotiden in der alternativ und konstitutiv gespleißten RNA kann sich der Leserahmen der mRNA ändern. Eine Verschiebung des Leserahmens (frameshift) führt zu einer Änderung der Aminosäuresequenz downstream der alternativen Splice-Site. In vielen Fällen entsteht dabei ein neues vorzeitiges „in frame“ Stopcodon, so dass bei der Translation verkürzte Proteine entstehen.

Das alternative Splicing ist ein koordiniert ablaufender Prozess, der gewebespezifisch und entwicklungsabhängig streng reguliert ist (Lopez, 1998). Es spielt eine wesentliche Rolle bei der Steuerung der Genexpression, sowie der Funktion und enzymatischen Aktivität vieler Proteine (Smith et al., 2000).

Ein Beispiel für einen Regulationsmechanismus durch alternatives Splicing findet sich beim apoptotischen Zelltod. Es existieren zwei mRNA-Isoformen des bcl-2-verwandten Gens bcl-x, einem dominanten Regulator des apoptotischen Zelltodes. Das Protein der längeren mRNA-Isoform (bcl-xL) ähnelt dem bcl-2 und zeigt eine Apoptose-hemmende Wirkung. Die zweite Isoform, bcl-xS, besitzt hingegen Apoptose-induzierende Eigenschaften. Auf diese Weise entstehen aus einem Gen zwei Proteine mit gegensätzlicher Funktion (Boise et al., 1993).

Alternatives Splicing ist auch mit der Entstehung und dem Verlauf vieler Krankheiten und Tumoren assoziiert (Caceres et al., 2002; Venables, 2006).

In der Literatur sind eine Vielzahl von Stimuli, wie Wachstumsfaktoren, Zytokine oder Hormone beschrieben, die einen Einfluss auf das alternative Splicing haben. Über die genauen Wege der Signaltransduktion ist bis dato wenig bekannt (Stamm, 2002).

1.2 Die Bedeutung der NO-Synthasen

1.2.1 Isoenzyme der NO-Synthasen

Stickstoffmonoxid (NO), das Produkt der NO-Synthase (NOS), spielt eine zentrale Rolle bei der vaskulären Homöostase. Die NOS wurde erstmals im Jahre 1989 beschrieben. Bis 1994 wurden drei Isoformen der NOS - induzierbare (iNOS), neuronale (nNOS) und endotheliale (eNOS) NO-Synthase - nachgewiesen. Die Bedeutung der NO-Synthasen wurde besonders durch die Verleihung des Nobelpreises im Jahre 1998 an R. Furchgott, L. Ignarro und F. Murad für die Entdeckung von NO als Mediator im kardiovaskulären System hervorgehoben (Alderton et al., 2001).

Die drei NOS-Isoformen werden von unterschiedlichen Genen kodiert. Hinsichtlich der Exon-/Intron-Struktur und Größe besitzen die NO-Synthasen jedoch einen ähnlichen genomischen Aufbau und stimmen in ca. 50% ihrer Sequenz überein (Xu et al., 1998).

Die Reduktase-Domänen der NO-Synthasen besitzen Sequenzhomologien (eNOS: ca. 36%) mit der Cytochrom P₄₅₀-Reduktase. Für die vollständige Funktionsfähigkeit benötigen alle drei NOS Isoformen Häm, FAD, FMN, BH₄, NADPH, O₂ und CaM (Ortiz de Montellano et al., 1998).

nNOS und eNOS zählen zu den konstitutiven Isoformen, die NO ständig in niedrigen Konzentrationen (nM) und Ca²⁺/Calmodulin-abhängig synthetisieren. Im Gegensatz dazu muss die iNOS transkriptionell induziert werden. Sie synthetisiert NO Ca²⁺-unabhängig in hohen Konzentrationen (µM) (Albrecht et al., 2003).

Die iNOS spielt eine Rolle im Entzündungs- und Schockgeschehen, sowie bei der Entstehung von atherosklerotischen Läsionen. Im Rahmen der Immunabwehr kommt es durch Zytokine und andere Entzündungsmediatoren zu einer Induktion der iNOS-Expression in Makrophagen, Endothelzellen, Herzmuskelzellen und glatten Muskelzellen mit konsekutiv gesteigerter NO-Produktion (Andrew et al., 1999; Buttery et al., 1996).

Die nNOS wird hauptsächlich in neuronalem Gewebe und Skelettmuskelzellen exprimiert. Im zentralen und peripheren Nervensystem spielt NO als Neurotransmitter beim Informationstransfer zwischen parallelen Nervenbahnen und bei der Ausprägung von Synapsen eine wichtige Rolle (Morris et al., 1992).

1.2.2 Endotheliale NO-Synthase (eNOS)

Die eNOS gilt als das Schlüsselenzym der vaskulären Homöostase und wird u.a. in Endothelzellen (Palmer et al., 1987) Thrombozyten (Radomski et al., 1990), Herzmuskelzellen (Balligand et al., 1995), Osteozyten (Fox et al., 1998) und Neuronen (Dinerman et al., 1994) exprimiert.

Das NO der eNOS hat neben seiner Funktion als stärkster endogener Vasodilatator eine Reihe gefäßprotektiver Eigenschaften, wie z.B. die Regulation der Leukozytenadhäsion an das Endothel, die Inhibition der Proliferation von glatten Gefäßmuskelzellen, sowie die Inhibition der Plättchenaggregation (Albrecht et al., 2003).

Des Weiteren spielt das NO der eNOS eine Rolle bei der Angiogenese (Ziche et al., 2000), dem renalen Sauerstoffverbrauch (Laycock et al., 1998), sowie der Regulation der Knochenmasse und des Knochenumsatzes (Armour et al., 2001).

Eine Vielzahl an Erkrankungen die zu einer endothelialen Dysfunktion führen, gehen mit einer verminderten Synthese oder einer vermehrten Degradation von NO einher (Li et al., 2000; Cooke et al., 1997). Dazu zählen u.a. die Hypercholesterolämie (Stroes et al., 1995), die arterielle Hypertonie (Panza et al., 1995) und der Diabetes mellitus (Williams et al., 1996). Zudem ist in den fortgeschrittenen Stadien der Atherosklerose eine verminderte Expression an eNOS-Protein nachgewiesen worden (Oemar et al., 1998).

Das humane eNOS-Gen befindet sich in der Region 7q35→7q36 des Chromosoms 7 und umfasst 21 kb, die sich über 26 Exons und 25 Introns erstrecken. Das Intron 13 stellt mit ca. 4300 bp das größte Intron der eNOS dar. Die mRNA der humanen eNOS besteht aus 4052 Nukleotiden, die für ein 1205 Aminosäuren großes Protein kodieren (Marsden et al., 1993).

Das eNOS-Protein setzt sich aus zwei funktionell verschiedenen Domänen zusammen, die über eine Calmodulin-bindende Sequenz miteinander verbunden sind. Die N-terminal gelegene Oxygenase-Domäne (Aminosäuren 1-491) umfasst die Bindungsstellen für Häm, BH₄ und L-Arginin und stellt das katalytische Zentrum dar. Die C-terminal gelegene Reduktase-Domäne (Aminosäuren 492-1205) enthält die Bindungsstellen für FAD, FMN und NADPH (Albrecht et al., 2003).

Wie nNOS und iNOS liegt die eNOS in der enzymatisch aktiven Form als Dimer vor, das sich aus zwei eNOS-Monomeren (je 134 kDa) zusammensetzt. Die Bindungsstellen für die Dimerisierung befinden sich in der Oxygenase-Domäne. In der dimerisierten Form kann BH₄ an eNOS binden, was zu einer Stabilisierung des Dimers führt (Rodriguez-Crespo et al., 1996). Zink-Ionen halten die Integrität der BH₄-Bindungsstelle aufrecht und erhöhen so die Stabilität des Dimers (Raman et al., 1998). Die funktionelle Aktivität des eNOS-Dimers ist abhängig von der Anzahl der gebundenen BH₄-Moleküle. Ein mit BH₄ gesättigtes Dimer agiert als reine NO-Synthase, während bei geringerer Bindung von BH₄ zusätzlich O₂⁻ synthetisiert wird (Albrecht et al., 2003).

Die Biosynthese von NO verläuft über zwei Oxidationsschritte. Dabei wird L-Arginin mit molekularem Sauerstoff und NADPH unter Bildung von NO zu L-Citrullin und NADP⁺

konvertiert. Im ersten Schritt der NO-Synthese wird L-Arginin zu N^G-hydroxy-L-Arginin hydroxyliert und im zweiten Schritt zu NO und L-Citrullin oxidiert. Beide Schritte sind NADPH- und O₂-abhängig (Marletta, 1993). Dabei fließen die Elektronen vom NADPH über die Flavine (FAD, FMN) zum Häm-Eisen-Atom in der Oxygenase-Domäne. Der Elektronenfluss vom FMN zum Häm ist nur möglich, wenn Calmodulin (CaM) an die CaM-Bindungsstelle gebunden ist. Ein Anstieg des intrazellulären Ca²⁺ führt über eine vermehrte Ca²⁺/CaM-Komplex-Bildung und damit verbundene CaM-Bindung zur Aktivierung der eNOS (Ortiz de Montellano et al., 1998).

Die Vasodilatation durch NO ist cGMP vermittelt. NO diffundiert in die glatten Muskelzellen und stimuliert dort die lösliche Guanylatzyklase zur vermehrten Umwandlung von GTP zu cGMP, das zur Muskelrelaxation führt (Cooke et al., 1997).

1.2.3 Regulation der eNOS

Obwohl die eNOS zu den konstitutiv exprimierten NO-Synthasen zählt, sind Regulationsmechanismen auf transkriptioneller, posttranskriptioneller, sowie ko- und posttranslationeller Ebene bekannt, welche die basale Expression und die Aktivität des Enzyms beeinflussen.

Ein Anstieg der eNOS-Expression auf transkriptioneller Ebene erfolgt über Substanzen, welche die Bindung von Transkriptionsfaktoren an spezifischen eNOS-Promoter-Sequenzen steigern. Die Transkription der eNOS wird u.a. durch Scherkräfte, Wachstumsfaktoren und Hormone wie z.B. Östrogen induziert (Govers et al., 2001; Li et al., 2002).

Auf posttranskriptioneller Ebene erfolgt die Regulation über eine Änderung der Stabilität der eNOS-mRNA durch verschiedene Stimuli. Die Halbwertszeit der eNOS-mRNA beträgt unter basalen Bedingungen 24 bis 48 Stunden. Eine verminderte Halbwertszeit aufgrund einer beschleunigten mRNA-Degradation wird beispielsweise durch TNF- α hervorgerufen (Yoshizumi et al., 1993). Der endotheliale Wachstumsfaktor VEGF und Wasserstoffperoxid hingegen erhöhen die Stabilität der eNOS-mRNA (Govers et al., 2001).

Die ko- und posttranslationelle Regulation der eNOS wird durch Acylierungen, Protein-Protein-Interaktionen, Phosphorylierungen oder durch BH₄ bewirkt.

Die Acylierung der eNOS mit Palmitin und Myristin ist notwendig für die Membranassoziiierung der eNOS. Kotranslationell wird die eNOS irreversibel an einem N-terminal gelegenen Glycin-Rest myristoyliert. Die Palmitoylierung an zwei N-terminal gelegenen Cystin-Resten (Cys¹⁵ und Cys²⁶) findet dagegen posttranslationell statt und ist reversibel (Alderton et al., 2001).

Ein Beispiel für die Regulation der eNOS-Aktivität über Protein-Protein-Interaktionen stellt der Caveolin/Calmodulin-Zyklus dar. Die eNOS liegt im enzymatisch aktiven Zustand an Ca²⁺/Calmodulin assoziiert vor. Das Caveolae-Membranprotein Caveolin-1 ist ein Ca²⁺/CaM-Antagonist der mit Ca²⁺/CaM um die eNOS-Bindung konkurriert und auf diese Weise die eNOS-Aktivität vermindert. Die Calmodulin-Bindung an eNOS ist Ca²⁺-abhängig. Substanzen, die den intrazellulären Ca²⁺-Gehalt erhöhen, wie z.B. Acetylcholin, Östrogen und Bradykinin, führen über eine vermehrte Ca²⁺/CaM-Assoziation mit eNOS zu einer Zunahme der eNOS-Aktivität (Govers et al., 2001; Michel et al., 1997).

Phosphorylierungen von eNOS haben einen Einfluss auf die eNOS-Aktivität. Scherkräfte führen über eine vermehrte Phosphorylierung der eNOS zu einer Ca²⁺-unabhängigen Zunahme der eNOS-Aktivität. Für Serin-1177 der eNOS ist die Phosphorylierung über die Serin/Threonin Proteinkinase Akt nachgewiesen (Dimmeler et al., 1999).

1.3 Zielsetzung der Arbeit

Microarray-Analysen haben gezeigt, dass für mehr als 70% aller humanen Gene alternativ gespleißte Isoformen existieren (Johnson et al., 2003). Auch in der Familie der NO-Synthasen wurden bereits alternative Splice-Varianten für die humane nNOS und iNOS, sowie für die NO-Synthase der *Drosophila* nachgewiesen.

Für die eNOS sind in der Literatur bis jetzt noch keine alternativen Splice-Varianten beschrieben worden. Eine eNOS-Teilsequenz in der EST-Datenbank gibt jedoch einen ersten Hinweis auf mögliche alternative Splice-Prozesse der eNOS.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten folgende Fragestellungen untersucht und beantwortet werden:

- Existieren alternative Splice-Varianten der eNOS und lassen sich diese experimentell nachweisen?
- In welchen Zellen und Geweben werden alternative Splice-Varianten der eNOS exprimiert?
- Hat die Expression von eNOS Splice-Varianten einen Einfluss auf die eNOS-Aktivität und damit auf die NO-Produktion? Was sind die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen?

2 Material und Methoden

2.1 Allgemeine Materialien

2.1.1 Chemikalien

(6R)-5,6,7,8-Tetrahydrobiopterin (BH ₄)	Sigma
β-Mercaptoethanol	Sigma
β-Nikotinamidadenindinukleotidphosphat (NADPH), reduzierte Form	Sigma
6-Aminohexansäure	Merck
Acrylamid-/Bisacrylamid-Stammlösungen: Roti- phorese Gel 30 (37,5 : 1), Rotiphorese Gel 40 (29:1)	Carl Roth GmbH & Co
Agar	Difco
Ammoniumpersulfat (APS)	Serva Feinbiochemica
Ampicillin	Boehringer Mannheim GmbH
Aqua ad iniectabilia	Braun
Borat	Merck
Calmodulin aus Rinderherz	Sigma
D-Glukose	Merck
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck
Dithiothreitol (DTT)	Sigma
Eisessig (Essigsäure 100%)	Merck
Ethanol absolut	J.T. Baker
Ethidiumbromid-Lösung, pur	Invitrogen
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma
Ethylenglykoltetraessigsäure (EGTA)	Sigma
Flavinadenindinukleotid Disodium (FAD)	Sigma
Glycerol	Invitrogen
Glycin	Merck
Glykogen-Solution	Boehringer Mannheim GmbH
Hank's balancierte Salzlösung (HBSS), (1x), ohne Ca ²⁺ /Mg ²⁺	Invitrogen
Hefe-Extrakt	Difco Lab
HEPES-Na-Salz	Sigma
Isopropanol	Merck

Kaliumacetat	Merck
Kaliumchlorid (KCl)	Carl Roth GmbH & Co
Kalziumchlorid (CaCl ₂)	Sigma
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Merck
Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	Merck
Methanol	Merck
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Serva Feinbiochemica
N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure (HEPES)	Sigma
Natriumchlorid (NaCl)	Merck
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck
Pefablock	Boehringer
PeqGOLD Universal Agarose	Peqlab Biotechnologie GmbH
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) (1x) ohne Ca ²⁺ /Mg ²⁺	Invitrogen
Riboflavin 5'-Monophosphat (FMN)	Sigma
Salzsäure (HCl)	Merck
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	Carl Roth GmbH & Co
Triton X-100	Sigma
Trypton	BD
Tween 20	Aldrich

2.1.2 Geräte

Brutschränke	Heraeus Instruments
Lichtmikroskop	Leica
pH-Meter MP220	Mettler Tolado
Schüttelinkubator GFL 3032	Gesellschaft für Labortechnik mbH
Sterilbank: LaminAir® HBB 2448	Heraeus Instruments
Thermocycler: Personal Cyclor	Biometra
Thermomixer Compact	Eppendorf
Vortex-Genie 2	Scientific Industries
Zentrifugen:	
Eppendorf Centrifuge 5415C	Eppendorf
Eppendorf Centrifuge 5417R	Eppendorf
Eppendorf Centrifuge 5810R	Eppendorf
Sigma 4K10	Sigma

2.1.3 Kulturmedien

Materialien:

Luria Bertani- (LB-) Medium	1,0% Trypton
	0,5% Hefe-Extrakt
	1,0% NaCl
	auf pH 7,0 eingestellt mit 5 N NaOH
LB-Agar	LB-Medium mit 1,5% [w/v] Agar

Die LB-Medien wurden mit Aqua dest. angesetzt und für 30 Minuten bei 121°C und 1,1 bar Überdruck autoklaviert. Die Lagerung erfolgte bei Raumtemperatur. Im Bedarfsfall wurde das LB-Medium mit 150 µg/ml Ampicillin versetzt. Agar enthaltendes LB-Medium wurde nach dem Autoklavieren auf 55°C runtergekühlt, mit 150 µg/ml Ampicillin versetzt und in sterile Petrischalen gegossen. Die Aufbewahrung der LB-Agar-Platten erfolgte bei 4°C.

2.1.4 DNA-Sequenzanalyse-Programm

Chromas Version 2.3

Technelysium

2.1.5 Primer

Die Auswahl der Primer für die untersuchten Gene erfolgte mit der Software Primer Express Version 3.0 von der Firma Applied Biosystems. Alle verwendeten Primer wurden von der Firma TIB MOLBIOL hergestellt. (FW = Forward, RW = Reverse)

2.1.6 Gewebeproben

Die humanen Gewebeproben stammten aus dem Human Total RNA Master Panel II der Firma Clontech und bestanden aus gepoolten Samples von mehreren Spendern. Die Gewebe Herz, Lunge und Leber stammten lediglich von einem Spender.

2.2 Zellkultur

Materialien:

Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM)	L-Glutamin, 1000 mg/L D-Glukose, Na-Pyruvat	Invitrogen
MCDB 131 Endothelial Cell (EC) Medium		Invitrogen
MV Endothelial Cell Growth Medium		PromoCell
MCDB 131 Supplement-Mix	1 ng/ml bFGF	Biomol
	2% FCS	Sigma
	1 µg/ml Hydrokortison	PromoCell
	2 ml ECGS	Invitrogen
	100 U/ml Penicillin	Invitrogen
	100 µg/ml Streptomycin	Invitrogen
	5 ml L-Glutamin	Biochrom
	5 U/ml Heparin	Biomol
	0,1 ng/ml EGF	Invitrogen

MV EC Growth Medium Supplement-Mix	0,4% ECGS/H	PromoCell
	5% FCS	Sigma
	10 ng/ml EGF	Invitrogen
	1 µg/ml Hydrokortison	PromoCell
Kollagenase Typ II		Biochrom
Fetales Kälberserum (FCS)		Sigma
Penicillin/Streptomycin		Invitrogen
Trypsin-EDTA	in HBSS ohne Ca ²⁺ /Mg ²⁺	Invitrogen

Durchführung:

Als Standardbedingungen wurden alle Zellen bei 37°C und 5% CO₂-Begasung in Zellkulturflaschen (T75) kultiviert. Um Kontaminationen zu vermeiden, wurde an einer Werkbank mit laminarer Luftströmung gearbeitet.

COS-7 Zellen (ATTC, American Type Culture Collection) und EA.hy926 Zellen (Edgell et al., 1983) wurden in DMEM mit 10% FCS, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin kultiviert. Humane umbilikale venöse Endothelzellen (HUVEC) wurden mittels Kollagenase Typ II Verdau aus Nabelschnüren isoliert und in EC-Medium plus EC-Medium Supplement-Mix kultiviert. Für die Experimente wurden HUVEC der Passage 2 bis 3 verwendet. Humane Aortenendothelzellen (HAEC) von PromoCell wurden in MV-Medium plus Supplement-Mix des Herstellers gehalten.

Bei ausreichender Konfluenz der Zellen unter lichtmikroskopischer Beurteilung wurde das Medium abgesaugt, der Zellrasen einmal mit PBS gewaschen und die Zellen mit 1 ml Trypsin-EDTA vom Boden der Zellkulturflaschen gelöst. Nach einer Inkubationszeit von 3 Minuten bei 37°C wurde das Trypsin durch Verdünnung mit FCS-haltigem Medium inaktiviert. Die noch haftenden Zellen wurden mit dem Trypsin-Medium-Gemisch vom Flaschenboden gespült und anschließend auf vier neue Zellkulturflaschen verteilt. Für die Experimente wurden die Zellen in 6 cm Schalen ausplattiert.

2.3 Zellyse und Proteinextraktion

Materialien:

Lysepuffer, pH 7,4	50 mM Tris-HCl
	1,15% KCl
	5 mM Glukose
	1% Triton X-100
	0,5 mM EDTA
	1 mM Pefablock
	2 mM DTT

DTT und Pefablock wurden unmittelbar vor Verwendung des Lysepuffers zugefügt.

Durchführung:

Vor der Lyse wurden die Zellen in den 6 cm Schalen mit 4 ml PBS gewaschen, um Reste des Nährmediums zu entfernen. Danach wurde 100 µl Lysepuffer zu den Zellen gegeben und für 5 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde mehrfach mit dem Lysepuffer über den Zellrasen gespült und die Zellen mit einem Zellschaber vom Plattenboden gelöst. Das Lysat wurde in ein vorgekühltes Eppendorfgefäß überführt. Um das Proteinextrakt von Zelltrümmern zu befreien, wurde das Lysat für 5 Minuten mit 14000 rpm bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß gegeben, das Pellet wurde verworfen.

2.4 Bestimmung der Proteinkonzentration

Materialien:

BCA Protein Assay Reagent Kit	Pierce
ELISA-Reader	Anthos labtec instruments
96-well Platte (durchsichtig)	Greiner Labortechnik

Durchführung:

10 µl Proteinextrakt (1:10 in Aqua ad iniectabilia verdünnt) wurden mit 200 µl Reaktionsreagenz bestehend aus Reagenz A (BCA) und Reagenz B (Kupfersulfat) (Verhältnis A+B = 50+1) versetzt. Von diesem Ansatz wurden 200 µl pro well in eine 96-well Platte pipettiert. Nach 30 Minuten Inkubation bei 37°C erfolgte die

Messung der Absorption mit Hilfe des ELISA-Readers (Messfilter 570 nm). Als Leerwert wurde Lysepuffer (1:10 in Aqua ad iniectabilia verdünnt) gegen eine BSA Standard-Reihe (0,125-1 µg/µl) gemessen. Die gemessenen Extinktionswerte der Proteinextrakte wurden anschließend auf eine Eichkurve der BSA Standard-Reihe gegen den Leerwert rechnerisch korrigiert. Die Auswertung erfolgte mit der Software WinRead 2.1 von Anthos Labtec Instruments. Es wurden stets Doppelwerte bestimmt.

2.5 Isolierung von Gesamt-RNA

Materialien:

TRizol®

Invitrogen

Durchführung:

Die Gesamt-RNA wurde mittels Trizol-Reagenz aus Zellen und Geweben isoliert. Dieses optimierte Verfahren basiert auf der „single-step“ Methode zur RNA-Isolierung (Chomczynski et al., 1987). Die Isolierung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Zur Resuspension der RNA wurde 30 µl Aqua ad iniectabilia verwendet.

2.6 Bestimmung der Konzentration und Reinheit von Nukleinsäuren

Materialien:

Spectrophotometer DU 640

Beckmann

Durchführung:

Die Konzentration und Reinheit von Nukleinsäuren wurde spektrophotometrisch bestimmt. Dazu wurde die Absorption bei verschiedenen Wellenlängen gemessen. Das Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren liegt bei 260 nm, von Proteinen bei 280 nm und von Verunreinigungen bei 320 nm.

Eine optische Dichte (OD) von 1 bei 260 nm entspricht einer Konzentration von 40 µg RNA pro ml bzw. 50 µg DNA pro ml.

Unter Berücksichtigung der Verdünnung lässt sich die Konzentration nach der Formel $OD_{260} \times 40$ bzw. $50 \times \text{Verdünnungsfaktor} = \mu\text{g RNA bzw. DNA/ml}$ berechnen.

Der Reinheitsgrad von Nukleinsäuren wird aus dem Quotienten der optischen Dichte bei 260 nm und 280 nm errechnet (für RNA: 1,8-2,1 und für DNA: 1,6-1,8).

2.7 RT-PCR (Reverse Transkription Polymerase Kettenreaktion)

2.7.1 Reverse Transkription

Bei der Reversen Transkription wird die RNA mittels Oligo-d(T)- und/oder Hexamer-Primern und der Reversen Transkriptase in eine komplementäre einzelsträngige cDNA umgeschrieben.

Materialien:

MMLV Reverse Transkriptase	Invitrogen
5x Reverse Transkriptase Puffer	Invitrogen
Ultrapure dNTP Set (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Pharmacia Biotech
DNase I	Ambion
RNasin Ribonuclease Inhibitor	Promega
Oligo-d(T) ₁₆ Primer	TIB MOLBIOL
Random Hexamer-Primer	TIB MOLBIOL

Durchführung:

Für die Reverse Trankription von RNA zu cDNA wurden 500 ng Gesamt-RNA eingesetzt. Zum initialen DNase-Verdau wurde die RNA mit 1 U DNase versetzt und der Ansatz mit Aqua ad iniectabilia auf ein Gesamtvolumen von 9 µl gebracht. Der Reaktionsansatz wurde im Thermocycler für 15 Minuten bei 37°C und zur Enzymaktivierung für weitere 5 Minuten bei 75°C inkubiert. Anschließend wurden die Primer dem Ansatz hinzugefügt und für 10 Minuten bei 70°C, danach für 5 Minuten auf Eis inkubiert. Bei RNA aus kultivierten Zellen wurden 2 µg Random-Hexamere, bei humanen Geweben wurde ein Gemisch aus 1 µg Oligo-d(T)₁₆-Primern und 1 µg Random-Hexameren verwendet. Anschließend wurden zu einem 20 µl Gesamtansatz 4 µl 5x Reverse Transkriptase-Puffer, 1 µl dNTP (10mM), 2 µl DTT (100 mM), 30 U RNasin, sowie 200 U MMLV Reverse Transkriptase gegeben. Der Ansatz wurde für 5 Minuten bei 25°C und weitere 60 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Aufbewahrung von cDNA-Proben erfolgte bei -80°C.

2.7.2 5'-RACE und 3'-RACE

Mit Hilfe der 5'- bzw. 3'-RACE (rapid amplification of cDNA ends) lassen sich unbekannte 3'- oder 5'-Enden eines Gens amplifizieren.

Materialien:

SMART™ RACE cDNA Amplification Kit Clontech

Durchführung:

Pro Reaktionsansatz wurden 1 µg Gesamt-RNA, isoliert aus HUVECs, unter Verwendung des SMART™RACE cDNA Amplification Kits nach Angaben des Herstellers in 5'- bzw. 3'-cDNA umgeschrieben.

2.7.3 RT-PCR und RACE-PCR

Materialien:

KOD Hot Start DNA Polymerase Kit Novagen

10x Universal-Primer-Mix A (UPM) SMART™ RACE cDNA Amplification Kit

Tricine-EDTA Puffer
(10 mM Tricine-KOH, pH 8,5; 1 mM EDTA) SMART™ RACE cDNA Amplification Kit

Durchführung:

Die cDNA aus der SMART™RACE wurden vor der RACE-PCR mit Tricine-EDTA Puffer 1:10 verdünnt.

Für die 5'-RACE-PCR mit 5'-cDNA wurde der Universal-Primer, der an das 3' Ende der DNA bindet, sowie ein eNOS Intron 13 spezifischer RW-Primer (eNOS 5'-RACE) verwendet. Das resultierende PCR-Produkt wurde mittels Nested-PCR mit einem Primer, der an das Startcodon im Exon 1 der eNOS (eNOS Start) bindet, sowie einem upstream im Intron 13 gelegenen Nested-Primer (eNOS Nested) weiter amplifiziert (Tabelle 1).

Tabelle 1: 5'-RACE-PCR Primer

Primer	5'	Sequenz	3'	Position
eNOS 5'-RACE RW	GAC	CTG GAA ACA GCC CAA GTG TCA		Intron13
eNOS Start FW	TCG	CGG CCG CCA TGG GCA ACT TGA AGA GCG T		Exon 1
eNOS Nested RW	GAG	TCG ACT TCT GTG GTG ACA GAC A		Intron13

Für die 3'-RACE-PCR mit 3'-cDNA wurde der Universal-Primer verwendet, der an das 5'-Ende der cDNA bindet, zusammen mit einem FW-Primer, der an den Übergang von Exon 13 der eNOS zu dem jeweiligen alternativen Exon (13A, 13B und 13C) bindet (Tabelle 2).

Tabelle 2: 3'-RACE-PCR Primer

Primer	5'	Sequenz	3'	Position
eNOS13A FW	TGG	AGA GTC TGT CTC CCT GCC AGA AGT G		Exon 13-13A
eNOS13B FW	CCC	GGA GAA TGG AGA GAG ATG GGG T		Exon 13-13B
eNOS13C FW	AGA	ATG GAG AGG GTC TCA CTT TGT GGC C		Exon 13-13C

Für die konventionelle RT-PCR mit cDNA aus den verschiedenen Geweben wurde ein eNOS Exon 13 spezifischer Primer (eNOS-QRT63 FW) mit einem eNOS (eNOS-QRT309 RW) oder eNOS13A (eNOS-QRT345 RW) spezifischen Primer kombiniert. Zusätzlich wurden dem PCR-Ansatz Primer für das Housekeeping-Gen GAPDH zugefügt (Tabelle 3).

Tabelle 3: RT-PCR Primer

Primer	5'	Sequenz	3'	Position
eNOS-QRT63 FW	AAC	CAG CAC ATT TGG GAA TGG		Exon 13
eNOS-QRT345 RW	GAC	CTG GAA ACA GCC CAA GTG		Exon 13A
eNOS-QRT309 RW	GAG	CCC GAA CAC ACA GAA CCT		Exon 16
GAPDH FW	ATG	ACA ACA GCC TCA AGA TCA TCA G		*
GAPDH RW	CTG	GTG GTC CAG GGG TCT TAC TCC T		*

* = Housekeeping-Gen

Die PCRs erfolgten in einem Reaktionsgemisch mit einem Endvolumen von 25 µl. Dazu wurden 2 µl first-strand cDNA mit 0,75 µl des jeweiligen FW- und RW-Primers bzw. 5 µl UPM (für RACE-PCR) und 10x PCR-Puffer, 0,2 mM dNTPs, 1 mM MgCl₂ und 1 U DNA-Polymerase aus dem KOD Hot Start DNA Polymerase Kit zusammengegeben.

Die Reaktionszyklen des Thermocyclers wurden wie folgt gewählt:

94°C	2 Minuten
5 Zyklen	
94°C	30 Sekunden
68°C	3 Minuten
12 Zyklen	
94°C	30 Sekunden
68°C - 62°C (touch down)	30 Sekunden
68°C	2 Minuten
28 Zyklen	
94°C	30 Sekunden
62°C	30 Sekunden
68°C	2 Minuten
68°C	10 Minuten

Die Heizdeckeltemperatur des Thermocyclers betrug 104°C um Verdunstungsverluste zu verhindern. Die PCR-Produkte wurden bei -20°C gelagert.

2.8 Realtime RT-PCR (Taqman-PCR)

Die Taqman-PCR ermöglicht einen quantitativen Nachweis von PCR-Produkten während der Amplifikation im Reaktionsgefäß.

Materialien:

Realtime GeneAmp 5700 Sequence Detection System	Applied Biosystems
TaqMan Universal PCR Master Mix	Applied Biosystems

Tabelle 4: Taqman-PCR Primer und Sonden

Primer	5'	Sequenz	3'	Position
eNOS FW	AAG	AGG AAG GAG TCC AGT AAC ACA GA		Exon 15
eNOS RW	ACG	AGC AAA GGC GCA GAA		Exon 16
eNOS Sonde	TGG	GCA CCC TCA GGT TCT GTG TGT T		Exon 15-16
eNOS13A FW	TGG	TAA CCA GCA CAT TTG GGA		Exon 13
eNOS13A RW	CAG	GCG AAA CTA TTC TGT GGT GA		Exon 13A
eNOS13A Sonde	TGG	AGA GTC TGT CTC CCT GCC AGA AGT G		Exon 13-13A
eNOS13B FW	TGG	TAA CCA GCA CAT TTG GGA		Exon 13
eNOS13B RW	CCT	GGG CAA CAT GGC GA		Exon 13B
eNOS13B Sonde	CCC	GGA GAA TGG AGA GAG ATG G		Exon 13-13B
eNOS13C FW	TGG	TAA CCA GCA CAT TTG GGA		Exon 13
eNOS13C RW	TGA	GCC GTG ATT GTA CTA CTG CAC T		Exon 13C
eNOS13C Sonde	AGA	ATG GAG AGG GTC TCA CTT TGT GGC C		Exon 13-13C
GAPDH FW	CAT	GTT CGT CAT GGG TGT GAA		*
GAPDH RW	ACG	ATA CCA AAG TTG TCA TGG ATG		*
GAPDH Sonde	TCA	GCA ATG CCT CCT GCA CCA CCA		*
HPRT FW	AGT	CTG GCT TAT ATC CAA CAC TTC G		*
HPRT RW	GAC	TTT GCT TTC CTT GGT CAG G		*
HPRT Sonde	TTT	CAC CAG CAA GCT TGC GAC CTT GA		*
RPL19 FW	GAG	ACC AAT GAA ATC GCC AAT G		*
RPL19 RW	GCG	GAT GAT CAG CCC ATC TT		*
RPL19 Sonde	CAA	CTC CCG TCA GCA GAT CCG GAA		*
RPS9 FW	GCG	GAG ACC CTT CGA GAA AT		*
RPS9 RW	CCC	TCC AGA CCT CAC GTT TG		*
RPS9 Sonde	GAA	GCT GAT CGG CGA GTA TGG GCT		*
28S FW	GGG	TGT TGA CGC GAT GTG AT		*
28S RW	CGT	TTA CCC GCG CTT CAT T		*
28S Sonde	TCT	GCC CAG TGC TCT GAA TGT CAA AGT GA		*

* = Housekeeping-Gen

An das 5'-Ende der Taqman-Sonden ist der Reporterfarbstoff 6-FAM, an das 3'-Ende der Quencherfarbstoff TAMRA gebunden. Die Auswahl der Taqman-Sonden für eNOS und die eNOS Splice-Varianten erfolgte mit der Software Primer Express Version 3.0

der Firma Applied Biosystems. Die Sonden stammen von der Firma Eurogentec, die Sonden für die Housekeeping-Gene GAPDH, RPL19, RPS9 von der Firma Qiagen.

Durchführung:

In einem Gesamtansatz von 25 µl wurden 12,5 µl TaqMan Universal Master Mix, jeweils 2,5 µl FW- und RW-Primer, 1 µl Sonde (Tabelle 4), sowie 6,5 µl in Aqua ad iniectabilia gelöste cDNA zusammengegeben. Die Amplifikation der PCR-Produkte erfolgte mit dem GeneAmp 5700 Sequence Detection System. Die Reaktionszyklen wurden wie folgt gewählt: Initialer Denaturierungsschritt von 95°C über 10 Minuten, gefolgt von 40 Zyklen (95°C für 15 Minuten; 60°C für 1 Minute). Alle Primer wurden so gewählt, dass die Annealingtemperatur bei 60°C lag. Die erhaltenen Daten wurden mit Hilfe der ABI Prism 7000 SDS Software von Applied Biosystems ausgewertet. Die Expression von eNOS und den eNOS Splice-Varianten in den Endothelzellen und den Geweben des Human Total RNA Master Panels II wurden anhand der dCT Methode auf das geometrische Mittel der Expression von GAPDH, HPRT, RPL19, RPS9 und 28S RNA bezogen. Aufgrund der hohen Sensitivität der quantitativen PCR wurden von jeder cDNA-Probe zwei identische Ansätze bestimmt und als Ergebnis der Mittelwert berechnet.

2.9 Agarose-Gelelektrophorese

Materialien:

10x TBE-Puffer, pH 8,0	900 mM Tris
	900 mM Borat
	25 mM EDTA
Ladepuffer	80% Glycerol [v/v]
	0,25% Bromphenolblau [w/v]
	0,25% Xylenxyanol [w/v]
	in Aqua ad iniectabilia
DNA-Größenmarker	Invitrogen
Elektrophoresekammer	Easy-Cast
Elektrophorese Stromversorgungsgerät:	
PowerPack P24	Biometra
UV-Transilluminator	Biometra
Kamera: CF 8/1 FMC	Kappa

Durchführung:

10 µl Aliquots eines jeden PCR-Produktes wurden nach elektrophoretischer Auftrennung in einem 1,2% [w/v] Agarose-Gel analysiert. Als Elektrophorese-Puffer wurde 0,5x TBE verwendet. Das Agarosepulver wurde in einem Erlenmeyerkolben in 0,5x TBE-Puffer durch Erhitzen gelöst. Pro 100 ml Agarose-Lösung wurden vor dem Gießen des Gels 5 µl Ethidiumbromid (Stammkonzentration = 5 mg/ml) zugegeben. Die PCR-Produkte wurden vor dem Auftragen auf das Gel mit 2 µl Ladepuffer versetzt. Die Elektrophorese erfolgte in der Elektrophoresekammer bei einer Spannung von 90 Volt (abhängig von der Produktgröße) über 1 bis 1,5 Stunden. Bei jedem Lauf wurde ein DNA-Größenmarker mit DNA-Fragmenten definierter Größe mitgeführt. Anschließend wurden die DNA-Banden unter UV-Licht sichtbar gemacht und mit einer Spezialkamera und dem Programm Image-Master (Pharmacia Biotech) dokumentiert.

2.10 Polyacrylamid-Gelelektrophorese für Taqman-PCR-Produkte

Die Produkte der Taqman-PCR wurden zur Kontrolle in einem Gel dargestellt. Aufgrund der geringen Größe der DNA-Fragmente (< 100 bp) wurde ein 20% Polyacrylamid-Gel gewählt.

Materialien:

10x TBE-Puffer, pH 8,0	siehe Agarose-Gelelektrophorese
Ladepuffer	siehe Agarose-Gelelektrophorese
25 bp DNA-Größenmarker	Invitrogen
Elektrophoresekammer	Biometra

Durchführung:

Direkt vor dem Gießen des Gels wurden 7,5 µl 20% Acrylamid/Bisacrylamid (Rotiphorese Gel 40 mit 10x TBE im Verhältnis 1:2 verdünnt) mit 10 µl TEMED und 25 µl 10% APS [w/v] versetzt. Die Dicke des Gels betrug 1 mm, als Elektrophorese-Puffer wurde 1x TBE verwendet. 10 µl PCR-Produkt wurden mit 2 µl Ladepuffer versetzt und in eine Geltasche pipettiert. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 200 Volt für eine Dauer von 1 bis 1,5 Stunden. Bei jedem Lauf wurde ein 25 bp DNA-Größenmarker mitgeführt. Die Anfärbung des Gels erfolgte in einem Wannenbad mit 10 µl Ethidiumbromid (Stammkonzentration 1 µg/ml) pro 100 ml 1x TBE-Puffer. Anschließend wurden die DNA-Banden unter UV-Licht sichtbar gemacht (siehe Agarose-Gel).

2.11 DNA-Isolierung aus Agarosegelen

Materialien:

QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
-----------------------------	--------

Durchführung:

Die aufzureinigenden DNA-Banden wurden unter UV-Licht mit einem sterilen Skalpell aus dem Agarosegel geschnitten und anschließend mit dem QIAquick Gel Extraction Kit nach Angaben des Herstellers aufgereinigt. Bei diesem Verfahren wird die DNA in Anwesenheit hoher Salzkonzentrationen durch eine Silica-Membran adsorbiert und

nach einem Waschschrift durch Lösungen mit geringeren Salzkonzentrationen eluiert. Zur Elution wurde 30-50 µl 10 mM Tris-Puffer (pH 8,5) verwendet.

2.12 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierungen wurden von der Firma Services in Molecular Biology (Dr. M. Meixner), Rüdersdorf/Berlin durchgeführt. Die DNA-Sequenzierung erfolgte in der Regel mit 400 ng Plasmid-DNA, sowie entsprechenden Primern (Tabelle 5; jeweils 2 bis 10 pmol pro Reaktion), unter Anwendung standardisierter Sequencing-Protokolle und dem BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (Version 1.1) der Firma Applied Biosystems. Zur Analyse der Proben wurde das Kapillarsequenziergerät 3130XL Genetic Analyzer der Firma Applied Biosystems verwendet.

Tabelle 5: Sequenzierungsprimer

Primer	5'	Sequenz	3'	Position
SEN-1 FW	ATG	GGC AAC TTG AAG AGC GT		Exon 1
SEN-2 FW	GAG	CAG CTG CTG AGT CAG GCC CG		Exon 2
SEN-3 FW	TTC	CGA ATC TGG AAC AGC CAG CTG		Exon 6
SEN-4 FW	GAG	ATC GGC ACG AGG AAC CTG TGT G		Exon 8
SEN-5 FW	AAG	GGG AGT GCC GCC AAG GGC ACC G		Exon 11
SEN-9 RW	CTA	TTC TGT GGT GAC AGA CA		Exon 13A
SEN-10 RW	GGC	CAC TTC TTT AAA GGT CTT CTT C		Exon 11
SEN-11 RW	AGC	CAC ATC CTC CAG GAT GTT GTA G		Exon 9
SEN-12 RW	GCA	GAG CTC GGT GAT CTC CAC GTT G		Exon 6
SEN-13 RW	CGC	TCC TCT TAA TGG AGC TGT AGT ACT GG		Exon 3-4

2.13 Restriktionsverdau

Materialien:

Restriktionsenzyme:

<i>EcoRI</i>	New England Biolabs GmbH
<i>KpnI</i>	New England Biolabs GmbH
<i>XhoI</i>	New England Biolabs GmbH

Durchführung:

Für den Restriktionsverdau wurde die DNA mit 4-6 U Restriktionsenzym pro µg DNA und dem entsprechenden Puffer versetzt. Die verwendete Enzymmenge betrug maximal 10% des Gesamtvolumens. Bei Doppelverdau von *XhoI* und *KpnI* wurde der vom Hersteller empfohlene Puffer verwendet. Die Reaktionszeit für einen vollständigen Restriktionsverdau betrug mindestens zwei Stunden bei 37°C.

2.14 Klonierung

2.14.1 Klonierung von PCR-Produkten mittels TOPO-TA-Cloning

Die aufgereinigten 5'- und 3'-RACE-PCR-Produkte wurden mittels TOPO TA Cloning in den pCR[®]II-TOPO Vektor kloniert und in chemisch kompetente One Shot[®]-TOP *E. coli* transformiert.

Materialien:

TOPO TA Cloning [®] Kit	Invitrogen
Vektor: pCR [®] II-TOPO	
One Shot [®] -TOP 10 Chemically Competent <i>E. coli</i>	Invitrogen
X-Gal	Invitrogen

Durchführung:

Da die Produkte der RACE-PCR mit einer Proofreading-Polymerase synthetisiert wurden, mussten die 3'-Enden der PCR-Produkte für die TOPO TA Cloning Reaktion mit einem A-Nukleotid-Überhang versehen werden. Dazu wurden 20-100 ng PCR-Produkt mit 10x PCR-Puffer, 50 mM MgCl₂, 1 mM dATP und 2,5 U Taq-Polymerase aus

dem Cloning Kit zusammengegeben und mit Aqua ad iniectabilia auf ein Gesamtvolumen von 10 µl aufgefüllt. Nach 15 Minuten Inkubation bei 72°C im Thermocycler wurde der Ansatz auf Eis gestellt.

Für die TOPO-Klonierungsreaktion wurden 4 µl des Ansatzes mit 1 µl pCR[®]II-TOPO Vektor und 1 µl Salz-Lösung aus dem Cloning Kit zusammengegeben und mit Aqua ad iniectabilia auf ein Endvolumen von 6 µl gebracht. Nach Inkubation über 30 Minuten bei Raumtemperatur wurde die Plasmid-DNA mittels Transformation in chemisch kompetente *E. coli* eingeschleust. Dazu wurden 2 µl DNA-Vektor Mix in ein Röhrchen mit One Shot[®]-TOP 10 Chemically Competent *E. coli*-Bakterien gegeben und vorsichtig gemischt. Nach 30 Minuten Inkubation auf Eis erfolgte ein Hitze-Schock für 30 Sekunden bei 42°C. Anschließend wurde die Probe sofort für 2 Minuten auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 250 µl SOC-Medium (37°C) wurde der Ansatz für eine Stunde bei 37°C und 200 rpm in horizontaler Lage im Schüttelinkubator inkubiert.

100 µl des Transformationsansatzes wurden auf LB-Agar-Platten mit 150 µg/ml Ampicillin ausgestrichen und bei 37°C für 16 Stunden inkubiert. Die LB-Agar Platten wurden vorher mit 40 µl X-Gal (Stammkonzentration 40 mg/ml) ausgestrichen. Dadurch konnten mittels Blau-weiß-Selektion inserttragende (weiß) von nicht-inserttragenden (blau) Klonen unterschieden werden.

2.14.2 Klonierung von Plasmid-DNA in pcDNA3.1 Vektor

Für die Umklonierung in den Expressionsvektor pcDNA3.1 wurde das cDNA-Insert mittels *KpnI/XhoI*-Restriktionsverdau aus dem pCR[®]II-TOPO-Vektor herausgeschnitten. Nach elektrophoretischer Auftrennung der Restriktionsprodukte im Agarose-Gel wurde die Insert-DNA nach der QIAquick Gel Extraction Methode isoliert und mittels Ligation in den pcDNA3.1 Vektor eingesetzt.

Materialien:

T4-DNA-Ligase	Boehringer Mannheim GmbH
10x Ligations-Puffer	Boehringer Mannheim GmbH
XL-1 Blue Chemically Competent Cells	Stratagene
Vektor:	
pcDNA3.1/V5-His TOPO	Invitrogen
pcDNA3.1/V5-His/LacZ	

Durchführung:

Für die Vektor-Insert Ligation wurde ein molares Verhältnis von 3:1 von Insert-DNA zum pcDNA3.1 Vektor gewählt. Eine Gesamtmenge von 200 ng an Insert- und Vektor-DNA wurde nicht überschritten.

Insert- und Vektor-DNA wurden in einem Eppendorfgefäß mit 1 U T4-DNA-Ligase, 2 µl 10x Ligations-Puffer, sowie 10 mM ATP zusammengegeben und mit Aqua ad iniectabilia auf ein Endvolumen von 20 µl gebracht. Es wurde über 2 Stunden bei 22°C inkubiert.

Für die Transformation wurde 1 µl DNA aus dem Ligationsansatz in ein Eppendorfgefäß mit chemisch kompetenten XL-1 Blue Zellen gegeben und für 10 Minuten auf Eis gelagert. Danach wurden die Proben für 5 Minuten bei 37°C im Thermomixer inkubiert, mit 250 µl SOC-Medium (37°C) versetzt und für weitere 20 Minuten bei 37°C inkubiert. Zur Bakterienanzucht wurden 100 µl des Transformationsansatzes auf vorgewärmten LB-Agar-Platten mit 150 µg/ml Ampicillin ausgestrichen und bei 37°C für 16 Stunden inkubiert.

Zur Langzeitlagerung von Klonen in Glycerinstocks wurden 800 µl Bakterien-Suspension mit 200 µl Glycerol versetzt und bei -80°C gelagert.

2.15 Plasmidpräparationen mittels Alkalischer Lösung

Die Plasmidpräparation dient der Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterienzellen. Bei der Alkalischen Lyse macht man sich die Eigenschaft der DNA zu nutze, in einem stark alkalischen Milieu zu denaturieren. Wird der pH anschließend wieder neutralisiert, hybridisieren die beiden Stränge der Plasmid-DNA schnell, während die weitaus größere chromosomale Bakterien-DNA einzelsträngig bleibt und mittels Fällung entfernt werden kann.

Materialien:

Resuspensions-Lösung	20 mM Tris-HCl, pH 8,0 50 mM Glukose 10 mM EDTA
Alkalischer Lysepuffer	200 mM NaOH 1% SDS
Neutralisations-Lösung	3 M Kaliumacetat, pH 5,5
Ribonuclease A (RNase-A)	Sigma
Plasmid Maxi Kit	Qiagen

Durchführung:

Es wurde eine Einzelkolonie von der LB-Agar-Platte gepickt und in 3 ml Ampicillin-LB-Medium für ca. 16 Stunden bei 37°C im Schüttelinkubator (250 rpm) kultiviert. Anschließend wurden 1 ml dieses Ansatzes in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und für 5 Minuten bei 5000 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes erfolgte die Resuspension des Pellets in 200 µl Resuspensionslösung und Zugabe von 2 µl RNase-A (Stammkonzentration 10 mg/ml). Die Zellen wurden in 200 µl Lysepuffer für 5 Minuten bei Raumtemperatur unter vorsichtigem Schwenken lysiert. Danach wurden 200 µl Neutralisationslösung zum Ansatz gegeben, vorsichtig geschwenkt und für 10 Minuten bei 4°C inkubiert. Bei diesem Schritt fallen die SDS-Anteile, sowie die Reste der Bakterienzellen inklusive der chromosomalen Bakterien-DNA aus und können abzentrifugiert werden. Nach Zentrifugation für 15 Minuten bei 14.000 rpm, 4°C, wurde der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt und mit 600 µl Isopropanol für 5 Minuten bei Raumtemperatur gefällt. Anschließend wurde für 20 Minuten bei 4°C zentrifugiert, der Überstand verworfen und das DNA-Pellet mit 600 µl 75% Ethanol gewaschen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt über 5 Minuten bei 14.000 rpm, Raumtemperatur, wurde das DNA-Pellet an der Luft getrocknet (maximal 5 Minuten) und anschließend in 30-50 µl Aqua ad iniectabilia gelöst.

Plasmid-DNA für Transfektionen wurde mit Hilfe des Plasmid Maxi Kit (Qiagen) präpariert. Dazu wurde eine Einzelkolonie einer LB-Agar-Platte gepickt und für 8 Stunden in 5 ml Ampicillin-LB-Medium (150 µg/ml Ampicillin) bei 37°C im Schüttelinkubator (250 rpm) kultiviert. Danach wurde der Ansatz auf ein Endvolumen

von 100 ml mit Ampicillin-LB-Medium aufgefüllt und für weitere 16 Stunden bei 37°C im Schüttelinkubator (250 rpm) inkubiert. Die Plasmid-Isolierung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Dabei wurde die Plasmid-DNA im Anschluss an die alkalische Lyse nach dem Prinzip der Anionenaustauscherchromatographie über Säulen gereinigt. Die präparierte DNA wurde in 200 µl 10 mM Tris-Puffer (pH 8,5) gelöst.

2.16 Transiente Transfektion

Die Transfektion dient der Einschleusung von DNA in Wirtszellen. Da die Lebensdauer der aufgenommenen DNA durch Abbau und Zellteilung begrenzt ist, spricht man von einer transienten Transfektion.

Die Transfektionen wurden mit jetPEI-Reagenz, einem kationischen Polymer-Transfektions-Reagenz, durchgeführt. Das jetPEI-Reagenz verdichtet die DNA in positiv geladene Partikel, die über Interaktion mit anionischen Proteoglykanen auf der Zelloberfläche endozytotisch in das Zellinnere gelangen.

Materialien:

jetPEI™ -Reagenz	Biomol
Opti-MEM	Invitrogen
MG132 Proteasominhibitor	CalBiochem

Durchführung:

COS-7 Zellen wurden in 6 cm Schalen mit 3 ml DMEM (10% FCS, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin) ausplattiert. Die Zellen wurden für 48 Stunden unter Standardbedingungen kultiviert, um eine erforderliche Dichte von etwa 80% Konfluenz - unter lichtmikroskopischer Beurteilung - zu erreichen. Die Transfektionen wurden stets an einer Sterilbank mit laminarer Luftströmung durchgeführt. Die Menge an jetPEI-Reagenz war abhängig von der eingesetzten DNA-Menge. Für ein N/P-Verhältnis (Verhältnis von Stickstoff des jetPEI und Phosphat der eingesetzten DNA) von 5 wurden 10 µg Plasmid-DNA und 20 µl jetPEI-Reagenz gewählt. In allen Transfektionen wurde die Gesamtmenge an transfizierter DNA durch Zugabe von pcDNA3.1 Vektor-DNA konstant bei 10 µg gehalten. Die Plasmid-DNA und das jetPEI-Reagenz wurden zunächst jeweils in 250 µl NaCl (150 mM) verdünnt.

Anschließend wurde das verdünnte jetPEI-Reagenz zur Plasmid-DNA gegeben und nach Vortexen und Zentrifugation für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Zur Vorbereitung der COS-7 Zellen wurde das DMEM entfernt, die Zellen mit 3 ml PBS gewaschen und mit 2 ml Opti-MEM versehen. Im Anschluss wurde der jetPEI/DNA-Mix auf die Zellen gegeben und für 3 Stunden unter Standardbedingungen inkubiert. Das Opti-MEM Medium wurde entfernt, die Zellen mit frischem DMEM (10% FCS, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin) versehen und für weitere 24 Stunden unter Standardbedingungen inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen zweimal mit jeweils 3 ml PBS gewaschen und anschließend zur Proteinextraktion für den Einsatz im Arginin-Citrullin Konversionsassay oder Western Blot lysiert.

Für die Experimente mit Proteasominhibition wurden den Zellen direkt nach der Transfektion 500 nM (Endkonzentration) MG132 Proteasominhibitor bzw. 0,1% (Endkonzentration) DMSO als Kontrolle zugegeben und für 24 Stunden unter Standardbedingungen inkubiert.

2.17 Western Blot

Der Western Blot dient dem quantitativen Nachweis spezifischer Proteine. Um die Proteine ausschließlich nach ihrer Größe auftrennen zu können, müssen diese erst durch Aufkochen mit Natriumdodecylsulfat (SDS) denaturiert werden. Das negativ geladene SDS bindet sich proportional zum Molekulargewicht an die Proteine und gibt diesen eine negative Außenladung. Die Eigenladungen der Proteine werden dabei überdeckt. So können die Proteine in einer Gelelektrophorese nach Laemmli ihrem Molekulargewicht nach aufgetrennt werden. Anschließend werden die Proteine auf eine Polyvinylidenfluorid-Membran (PVDF) übertragen (Blotten) und mit spezifischen Antikörpern (Detektion) nachgewiesen.

Materialien:

Blotkammer Pharmacia LKB Multiphor II	Pharmacia
Elektrophorese Stromversorgungsgerät Blotting: Electrophoresis Power Supply-EPS 3500 XL	Pharmacia Biotech
Elektrophorese Stromversorgungsgerät Gel: High-Voltage PowerPack P30	Biometra
Elektrophoresekammer	Biometra
Enhanced Chemiluminescence Lösung	Amersham
Entwicklermaschine Hyperprocessor	Amersham
Film X-Omat Blue XB-1, 18x24 cm	Kodak

Lösungen:

5x SDS-Probenpuffer	1,5 M Tris-HCl, pH 6,8 35% Glycerol 25% β -Mercaptoethanol 10% SDS 1% Bromphenolblau
SDS-Laufpuffer	125 mM Tris 960 mM Glycin 0,1% SDS
Anodenpuffer I	0,3 M Tris 20% Methanol
Anodenpuffer II	25 mM Tris 20% Methanol
Kathodenpuffer	40 mM 6-Aminohexansäure 0,01% SDS 20% Methanol
Waschpuffer	0,05% Tween 20 in 1x PBS
Rotiblock	Carl Roth GmbH & Co
Strip-Lösung	100 mM Mercaptoethanol 2% SDS 62,5 mM Tris, pH 6,7

2.17.1 Präparation der Polyacrylamid-Gele

Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine nach dem Molekulargewicht erfolgt durch die unterschiedliche Retardierung in einem engmaschig vernetzten Gel. Da die Vernetzung der Gele von der eingesetzten Acrylamidkonzentration abhängt, muss diese an die Größe der Proteine angepasst werden.

Für die eNOS (Mw 140 kDa) und die eNOS Splice-Varianten (Mw 60-70 kDa) wurde ein 8%iges Trenngel gewählt.

Polyacrylamid-Gele:

	8% Trenngel	4% Sammelgel
30% Acrylamid/0,8% Bisacrylamid	4,00 ml	0,65 ml
1,5 M Tris-HCl/0,4% SDS, pH 8,8	3,75 ml	-
0,5 M Tris-HCl/0,4% SDS, pH 6,8	-	1,25 ml
Aqua dest.	7,25 ml	3,05 ml
10% APS	50 µl	25 µl
TEMED	10 µl	5 µl

2.17.2 SDS-Polyacrylamidelektrophorese

Durchführung:

10-20 µg Gesamtprotein wurden ad 12 µl in Aqua ad iniectabilia gelöst und mit 3 µl 5x SDS-Probenpuffer versetzt. Anschließend wurden die Proben in einem Thermocycler für 5 Minuten bei 95°C inkubiert und danach auf Eis gestellt. Nach kurzer Zentrifugation wurden die Proben in die Geltaschen pipettiert. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Stromstärke von 20 mA und dauerte abhängig von den aufzutrennenden Proteinen 1 bis 1,5 Stunden.

2.17.3 SemiDry-Blotting

Die in der Elektrophorese aufgetrennten Proteine wurden aus dem Gel auf eine PVDF-Membran transferiert, so dass ein genaues Abbild des Elektrophoresemusters entsteht. Das Blotten erfolgte nach der Kyhse-Andersen-Methode (Kyhse-Andersen, 1984) unter Anwendung eines diskontinuierlichen Puffersystems.

Durchführung:

Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Sammelgel abgetrennt und das Trenngel für ca. 5 Minuten in Anodenpuffer I inkubiert. Die PVDF-Membran und die Whatman-Papiere wurden auf die Gelgröße zurechtgeschnitten. Für den Transferstapel wurden sechs Whatman-Papiere mit Anodenpuffer I getränkt und luftblasenfrei übereinander auf die mit Anodenpuffer I angefeuchtete Basiselektrode (Anode) gelegt. Darüber wurden drei mit Anodenpuffer II getränkte Whatman-Papiere platziert. Zur Aktivierung wurde die PVDF-Membran für eine Minute in Methanol, zwei Minuten in Anodenpuffer II geschwenkt und danach auf die Transfer-Einheit gelegt. Darüber wurde das äquilibrierte Gel ausgebreitet. Über das Gel wurden neun mit Kathodenpuffer getränkte Whatman-Papiere geschichtet und die mit Kathodenpuffer gesättigte obere Elektrode (Kathode) als Deckel plan aufgelegt. Der Blotaufbau wurde luftblasenfrei zusammengesetzt. Für das elektrische Feld wurde ein konstanter Strom von 150 mA über 1,5 bis 2 Stunden gewählt.

Zur Kontrolle der Transfereffizienz wurde die PVDF-Membran nach dem Transfer mit Ponceau S (0,5% Ponceau S und 1% Eisessig) reversibel angefärbt.

2.17.4 Blocken & Antikörperbindung

Um eine unspezifische Bindung der Antikörper an die PVDF-Membran zu verhindern, müssen unspezifische Bindungsstellen auf der Blot-Membran vollständig abgesättigt werden.

Dazu wurde die Membran über eine Stunde bei Raumtemperatur in 2 ml 1x Rotiblock geschwenkt. Daraufhin wurde die Membran über Nacht bei 4°C mit dem in 1x Rotiblock gelöstem Erstantikörper unter leichtem Schwenken inkubiert. Am Folgetag wurde die Membran viermal für jeweils 10 Minuten in 100 ml Western Blot Waschpuffer

gewaschen und für eine Stunde mit in 1x Rotiblock gelöstem Zweitantikörper schwenkend inkubiert. Nach einer weiteren Waschphase über 40 Minuten (viermaliger Pufferwechsel) wurde die Enhanced Chemiluminescence Lösung (ECL) gleichmäßig auf der Membran verteilt. Nach 2 Minuten Einwirkungszeit wurde die ECL-Lösung abgetropft und die restliche Flüssigkeit mit Filterpapier aufgesaugt. Die Detektion mit dem ECL-System beruht auf einer Peroxidase-Reaktion, wobei der Zweitantikörper das im ECL vorhandene Luminol oxidiert. Beim Zurückfallen des durch die Oxidation angeregten Luminols in den Grundzustand wird Licht emittiert. Das ausgesandte Licht wurde durch Auflage eines geeigneten Röntgenfilms in der Dunkelkammer registriert. Der Röntgenfilm wurde mit einer Entwicklermaschine entwickelt. Die in dieser Arbeit verwendeten Erst- und Zweitantikörper sind in den Tabellen 6 und 7 aufgelistet.

Tabelle 6: **Erstantikörper**

Antikörper, Eigenschaften	Verdünnung	Hersteller	eingesetzte Proteinmenge
N20 Kaninchen, polyklonal, IgG Epitop: N-terminal	1 : 2.000	Santa Cruz Biotechnology	20 µg
NOSIII Maus, IgG1, Klon 3 Epitop: C-terminal	1 : 2.500	BD Transduction Laboratories	20 µg
V5 Maus, monoklonal, IgG _{2a} Epitop: V5-tag	1 : 5.000	Invitrogen	20 µg

Tabelle 7: **Zweitantikörper**

Antikörper	Eigenschaften	Verdünnung	Hersteller
anti-Kaninchen	Esel, Meerettich-Peroxidase konjugiert	1 : 10.000	Santa Cruz Biotechnology
anti-Maus	Esel, IgG, Meerettich-Peroxidase konjugiert	1 : 10.000	Santa Cruz Biotechnology

2.18 Low-Temperature PAGE (LT-PAGE)

Proteine lassen sich temperaturabhängig in ihrer dimeren bzw. monomeren Form mittels Low-Temperature PAGE darstellen (Venema et al., 1997).

Durchführung:

Dazu wurden 20 µg Proteinextrakt vor dem Laden des Polyacrylamid-Gels in einem Thermocycler für 10 Minuten bei 37°C erhitzt, anschließend mit 3 µl 5x SDS-Probenpuffer versetzt und für weitere 30 Minuten bei 0°C inkubiert. Dadurch blieb die Dimerisierung des Proteins erhalten. Elektrophose-Gel und -Puffer wurden vor der Elektrophorese auf 4°C gekühlt. Die Elektrophorese fand in einem klimatisierten Raum (20°C) statt. Um die Temperatur des Gels während der Elektrophorese unter 14°C zu halten, wurden in regelmäßigen Zeitabständen Eiswürfel aus Elektrophoresepuffer zugegeben. Das Blotten, Blocken und die Antikörperbindung fanden unter den im Kapitel Western Blot genannten Bedingungen statt.

2.19 Arginin-Citrullin Konversionsassay mit Proteinextrakt

Die Aktivität der eNOS kann mittels eines Arginin-Citrullin Konversionsassays bestimmt werden. Dabei wird die Bildung von L-[³H]-Citrullin aus L-[³H]-Arginin, welches das Substrat für die eNOS darstellt, nach Trennung der Aminosäuren mittels Kationenaustauscher-Chromatographie gemessen.

Materialien:

L-[³ H]Arginin		Amersham Pharmacia Biotech
DOWEX® 50WX8-200		Sigma
HEPES/EGTA, pH 5,5	100 mM HEPES	
	10 mM EGTA	
Szintillationscocktail:		
Rotiszint eco plus		Carl Roth GmbH & Co
Wallac 1409		
Liquid Scintillation Counter		Wallac

Reaktionsgemisch	50 mM HEPES, pH 7,4 0,1% Triton X-100 1 mM EDTA 1,25 mM CaCl ₂ 1 mM DTT 1 μM FAD 1 μM FMN 100 mM Calmodulin 15 μM BH ₄ 1 mM NADPH 1 μCi L-[³ H]-Arginin
------------------	---

Durchführung:

Es wurden 50 μg Proteinextrakt mit 40 μl Reaktionsgemisch versetzt und für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Zum Abbruch der eNOS Enzym-Reaktion wurden 0,5 ml DOWEX-Kationenaustauscher (Stammkonzentration: 500 mg/ml) zugegeben. DOWEX bindet das Arginin, während das enthaltene EGTA das für die eNOS-Aktivierung benötigte Ca²⁺ entzieht. DOWEX lag als Pulver vor und musste vor dem Versuch in die Na⁺-Form umgewandelt und auf einen pH-Wert von 5,5 eingestellt werden. Dazu wurde das DOWEX nacheinander 3x mit 1 M NaOH, 2x mit jeweils 1 Liter Aqua dest. und anschließend 3x mit 20 mM Hepes/EGTA-Lösung gewaschen. Das DOWEX wurde mit 20 mM HepesNa feucht gehalten.

Der Reaktionsansatz wurde nach der Zugabe von DOWEX auf Säulen geladen und für 10 Sekunden bei 1.000 rpm zentrifugiert. Das Eluat wurde mit 1,4 ml Szintillationscocktail versetzt und sorgfältig vermischt. Die β-Strahlung des eluierten L-[³H]-Citrullin wurde mit dem Programm „Easy Count“ im Szintillationscounter gemessen.

3 Ergebnisse

Erste Hinweise auf alternative Splice-Vorgänge im Intron 13 der humanen eNOS finden sich in einem Eintrag der EST-Datenbank (Sequenz: AW015134). Diese kurze eNOS-Teilsequenz enthält sieben Nukleotide aus dem Exon 12 und das vollständige Exon 13, gefolgt von einer Sequenz aus dem Intron 13. An das 3'-Ende schließt sich ein Oligo-d(T)-Trakt an. Die Intronsequenz umfasst 280 Nukleotide und stammt aus der Mitte des Intron 13 der eNOS, etwa 1350 Nukleotide downstream der 5'-Splice-Site von Exon 13 (Abbildung 2).

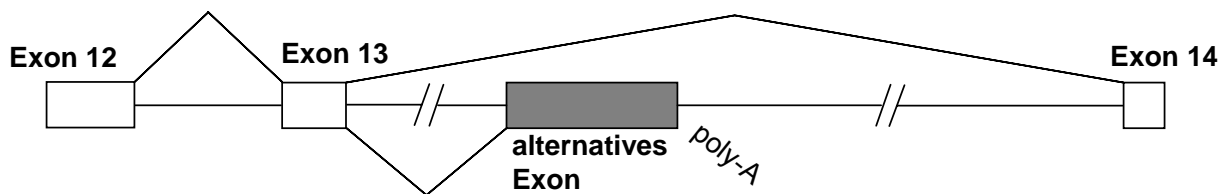


Abbildung 2: **EST-Datenbanksequenz: Splice-Prozesse im Intron 13 der eNOS.** Die konstitutiven Exons sind als weiße, das alternative Exon als graue Box dargestellt. Die oberen Linien zeigen die konstitutiven, die unteren Linien die alternativen Splice-Prozesse.

3.1 Identifizierung von drei neuen Splice-Varianten der humanen eNOS

Um nachzuweisen, ob eine vollständige mRNA für eNOS Splice-Varianten existiert, wurde eine 5'-RACE-PCR mit Gesamt-RNA aus primären humanen umbilikalen venösen Endothelzellen (HUVEC) unter Verwendung eines universalen und eines genspezifischen Primers (eNOS Intron 13) durchgeführt. Der genspezifische Primer leitete sich aus der EST-Datenbank-Sequenz ab und bindet an eine Intron 13 Sequenz. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung der primären RACE-Produkte zeigte sich eine Reihe von Banden in einer Größe von ca. 1800 bp und 2100 bp.

Die PCR-Produkte konnten mittels Nested-PCR mit genspezifischen Primern spezifisch amplifiziert werden. Dazu wurde ein im Exon 1 (eNOS Nested FF), sowie ein im Intron 13 der eNOS gelegener Primer (eNOS Nested RF) verwendet. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung wurden die Banden aus dem Agarosegel ausgeschnitten und mittels Gelextraktion aufgereinigt. Die aufgereinigte DNA wurde in den pCR[®]II-TOPO Vektor eingesetzt und kloniert.

Der pCR[®]II-TOPO Vektor besitzt zwei *EcoRI*-Schnittstellen, die das Insert (PCR-Produkt) flankieren. Nach *EcoRI*-Restriktionsverdau konnten im Agarosegel drei cDNA-Klone mit einer Größe von ca. 1800 bp, 2100 bp und 2300 bp nachgewiesen werden (Abbildung 3).

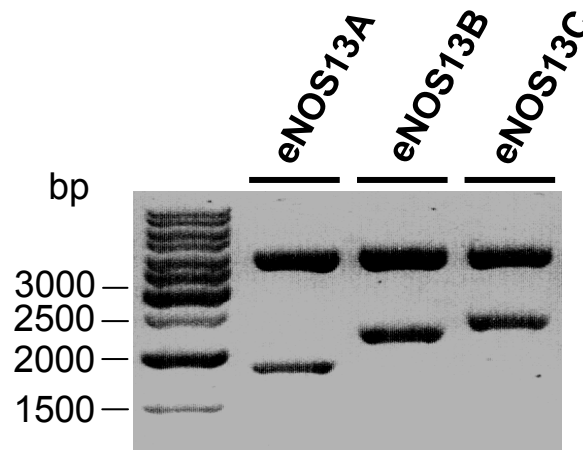


Abbildung 3: ***EcoRI*-Restriktionsverdau der klonierten 5'-RACE-PCR Produkte.** Die Größen der Markerbanden sind in bp angegeben.

Die Klone wurden vollständig sequenziert und mit dem Programm Blast der NCBI-Gen-Datenbank analysiert. Alle drei Klone entsprechen von Exon 1 bis 13 der humanen eNOS. An das Exon 13 schließen sich jeweils drei unterschiedlich lange, sich überlappende Sequenzen aus der Mitte des Introns 13 an, die im Rahmen dieser Arbeit mit Exon 13A, 13B und 13C bezeichnet wurden. Die Exons 14 bis 26 der eNOS fehlen in allen drei Klonen. Die 3'-Splice-Sites der drei neuen Exons weisen die für das RNA-Splicing notwendigen AG-Konsensussequenzen, sowie einen upstream davon gelegenen Polypyrimidintrakt auf. Mittels 3'-RACE mit spezifischen Primern, die an den Übergang des konstitutiven Exons 13 zum Exon 13A, 13B und 13C binden, konnte nachgewiesen werden, dass alle drei Splice-Varianten das gleiche Polyadenylierungssignal (AAUAAA) verwenden. Das Polyadenylierungssignal befindet sich etwa 20 Nukleotide upstream vom Poly-A-Schwanz im 3'-UTR. Die Gesamtlänge der mRNA der Splice-Varianten beträgt 2030 bp für eNOS13A, 2376 bp für eNOS13B und 2536 bp für eNOS13C, gefolgt von einem Poly-A-Schwanz variabler Länge. Die alternativen Exons 13A, 13B, 13C umfassen 278 bp, 624 bp und 784 bp (Übersicht in Abbildung 4). Die cDNA-Sequenzen der eNOS Splice-Varianten wurden unter den

folgenden Accession-Nummern bei GenBank eingetragen: DQ256129 für eNOS13A, DQ256130 für eNOS13B und DQ256131 für eNOS13C.

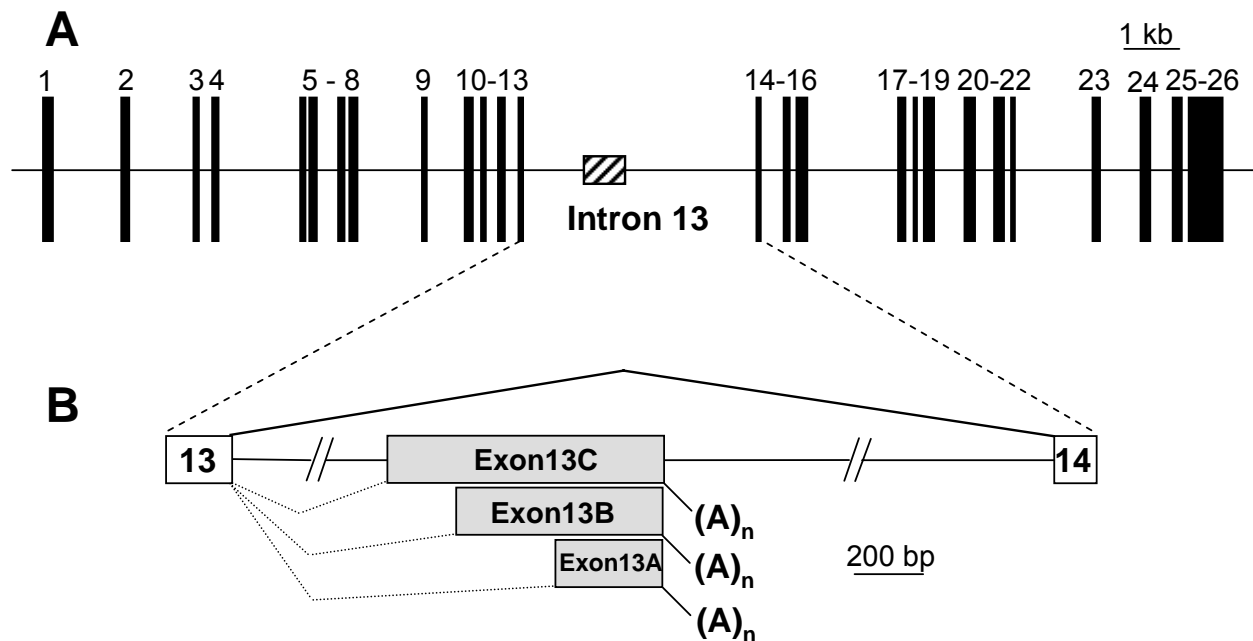


Abbildung 4: **Splice-Prozesse im Intron 13 der humanen eNOS.** (A) Übersicht über die Struktur des eNOS-Gens mit 26 Exons und 25 Introns. (B) Vergrößerte Darstellung von Exon 13 und 14, sowie Intron 13 mit Lage der alternativen Exons, Poly-A-Schwanz, sowie konstitutiven (obere Linien) und alternativen Splice-Prozessen (untere Linien) im Intron 13 der eNOS.

3.2 Expression eines Proteins der Splice-Variante eNOS13A

Die Splice-Varianten eNOS13A, 13B und 13C besitzen jeweils ein eigenes Stopcodon, so dass im Falle einer Translation verkürzte eNOS-Proteine entstehen, denen nahezu die vollständige C-terminale Reduktase-Domäne mit den Bindungsstellen für die Kofaktoren FMN, FAD und NADPH fehlt. Die Oxygenase-Domäne ist dagegen vollständig erhalten. Exon 13A, 13B und 13C fügen am C-terminalen Ende des verkürzten Proteins zusätzlich 12, 30 und 45 Aminosäuren hinzu (Abbildung 5).

Für die weitere Charakterisierung und zum Nachweis einer potentiellen Funktion der eNOS Splice-Varianten wurde exemplarisch eNOS13A gewählt. Die eNOS13A-cDNA wurde in den Expressionsvektor pcDNA3.1 kloniert und anschließend nochmals vollständig sequenziert. Der Vektor enthält einen spezifischen Promoter für

Säugerzellen und fügt ein C-terminal gelegenes V5-tag hinzu. Ein full-length eNOS Klon in einem pcDNA3.1 Vektor mit C-terminalem His-tag wurde freundlicherweise von Dr. Dimmeler (Dimmeler et al., 1999) zur Verfügung gestellt.

Zur Detektion im Western Blot wurden für die nachfolgenden Versuche drei unterschiedliche Antikörper verwendet (Abbildung 5). Der N20-Antikörper bindet an ein Epitop in der Oxygenase-Domäne der eNOS und detektiert full-length eNOS und eNOS13A. Zum spezifischen Nachweis von full-length eNOS wurde der NOSIII-Antikörper verwendet, der in der Reduktase-Domäne bindet, die in den Splice-Varianten nicht enthalten ist. Der spezifische Nachweis von eNOS13A-Protein erfolgte mittels V5-Antikörper über das V5-tag von eNOS13A.

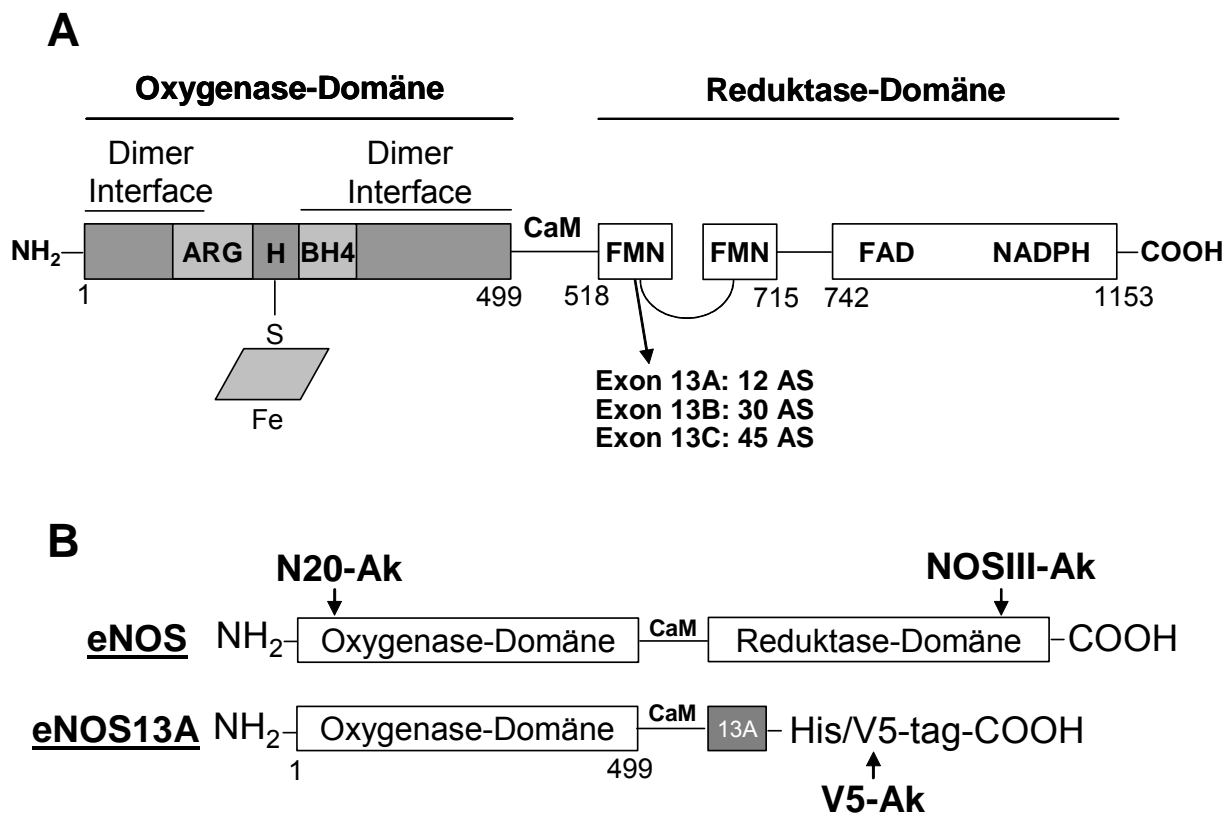


Abbildung 5: **Proteinstruktur von eNOS und eNOS Splice-Varianten, sowie Übersicht über die verwendeten Antikörper.** (A) eNOS-Monomer bestehend aus Oxygenase- und Reduktase-Domäne. Die Bindungsstellen für die Dimerisierung befinden sich in der Oxygenase-Domäne. Exon 13A, 13B und 13C fügen dem verkürzten Protein am C-terminalen Ende 12, 30 und 45 Aminosäuren hinzu. (B) eNOS13A enthält die vollständige Oxygenase-Domäne, die Calmodulin-Bindungsstelle, sowie Teile der FMN-Bindungsstelle. Zum Nachweis von eNOS- und eNOS13A-Protein im Western Blot wurden der N20-, NOSIII- und V5-Antikörper verwendet.

Zur Expression eines eNOS13A-Proteins wurden COS-7 Zellen, die kein endogenes eNOS besitzen, mit steigenden Mengen an eNOS13A Plasmid-DNA (1-5 μg) mittels jetPEI-Transfektionsreagenz transfiziert. Zur Kontrolle wurden analog COS-7 Zellen mit einem lacZ-Gen im pcDNA3.1/V5-tag Vektor transfiziert. Die Detektion im Western Blot erfolgte mit dem V5-Antikörper (Abbildung 6). Die Bande des eNOS13A-Proteins erschien in der zu erwartenden Größe von etwa 69 kDa. Die Zunahme der Signalintensität korrelierte mit der Menge an transfizierter DNA (Abbildung 6).

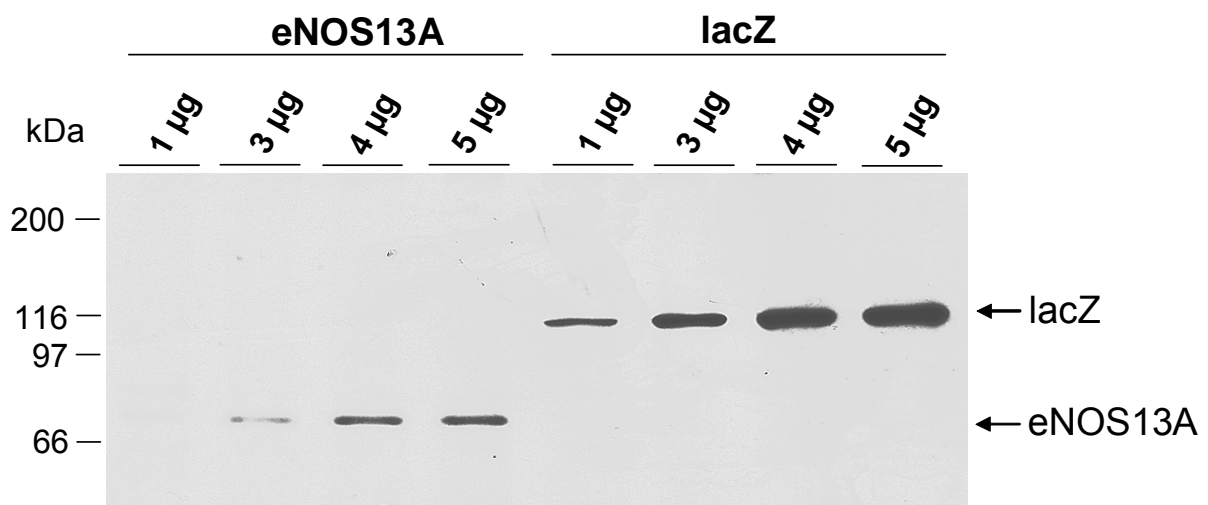


Abbildung 6: **Expression von eNOS13A-Protein in COS-7 Zellen.** Proteinextrakte aus COS-7 Zellen nach Transfektion steigender Mengen an eNOS13A und lacZ Plasmid-DNA. Die Detektion im Western Blot erfolgte mittels V5-Antikörper. Die Größen der Markerproteine sind in kDa angegeben.

3.3 Einfluss der Splice-Variante eNOS13A auf die eNOS-Aktivität

Um den Einfluss von eNOS13A auf die eNOS-Aktivität nachzuweisen, wurden COS-7 Zellen mit konstanter Menge an full-length eNOS Plasmid-DNA (3 µg) und steigenden Mengen eNOS13A Plasmid-DNA kotransfiziert. Als Kontrolle dienten unbehandelte und mit Vektor-DNA transfizierte COS-7 Zellen (Abbildung 7). Die Gesamtmenge an transfizierter DNA (10 µg) pro Transfektionsansatz wurde durch entsprechende Zugabe von Vektor-DNA konstant gehalten. Nach alleiniger Transfektion von full-length eNOS konnte im eNOS-Aktivitätsassay eine deutliche eNOS-Aktivität nachgewiesen werden, während nach alleiniger Transfektion von eNOS13A keine eNOS-Aktivität zu messen war. Nach Kotransfektion von full-length eNOS mit steigenden Mengen an eNOS13A Plasmid-DNA kam es zu einer konzentrationsabhängigen Abnahme der eNOS-Aktivität auf bis zu 58% der eNOS-Aktivität nach alleiniger Transfektion von full-length eNOS (100%). Identische Ergebnisse wurden auch nach Entfernung des V5-tag erzielt, was darauf hinweist dass der C-terminale Tag keinen Einfluss auf die eNOS-Aktivität hatte. Die Proteinextrakte von unbehandelten COS-7 Zellen, sowie nach Transfektion von Vektor-DNA wiesen, wie zu erwarten, keine eNOS-Aktivität auf. Im Western Blot wurde durch den V5-Antikörper das eNOS13A-Protein in der zu erwartenden Größe nachgewiesen. Die Signalintensität von eNOS13A nahm mit steigender Menge an transfizierter eNOS13A Plasmid-DNA zu. Bei der Detektion mit dem NOSIII-Antikörper, der nur full-length eNOS nachweist, zeigte sich trotz konstanter Mengen transfizierter eNOS Plasmid-DNA eine Abnahme der eNOS-Proteinmenge. Die Abnahme des eNOS-Proteins korrelierte dabei mit der Menge an kotransfizierter eNOS13A Plasmid-DNA. Diese Ergebnisse konnten mit dem N20-Antikörper bestätigt werden, der eNOS und eNOS13A gleichzeitig detektiert. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für fünf gleiche Experimente. Dagegen konnte eine Abnahme der eNOS-Aktivität nicht nachgewiesen werden, wenn Proteinextrakte mit full-length eNOS- und eNOS13A-Protein in vitro zusammengegeben wurden.

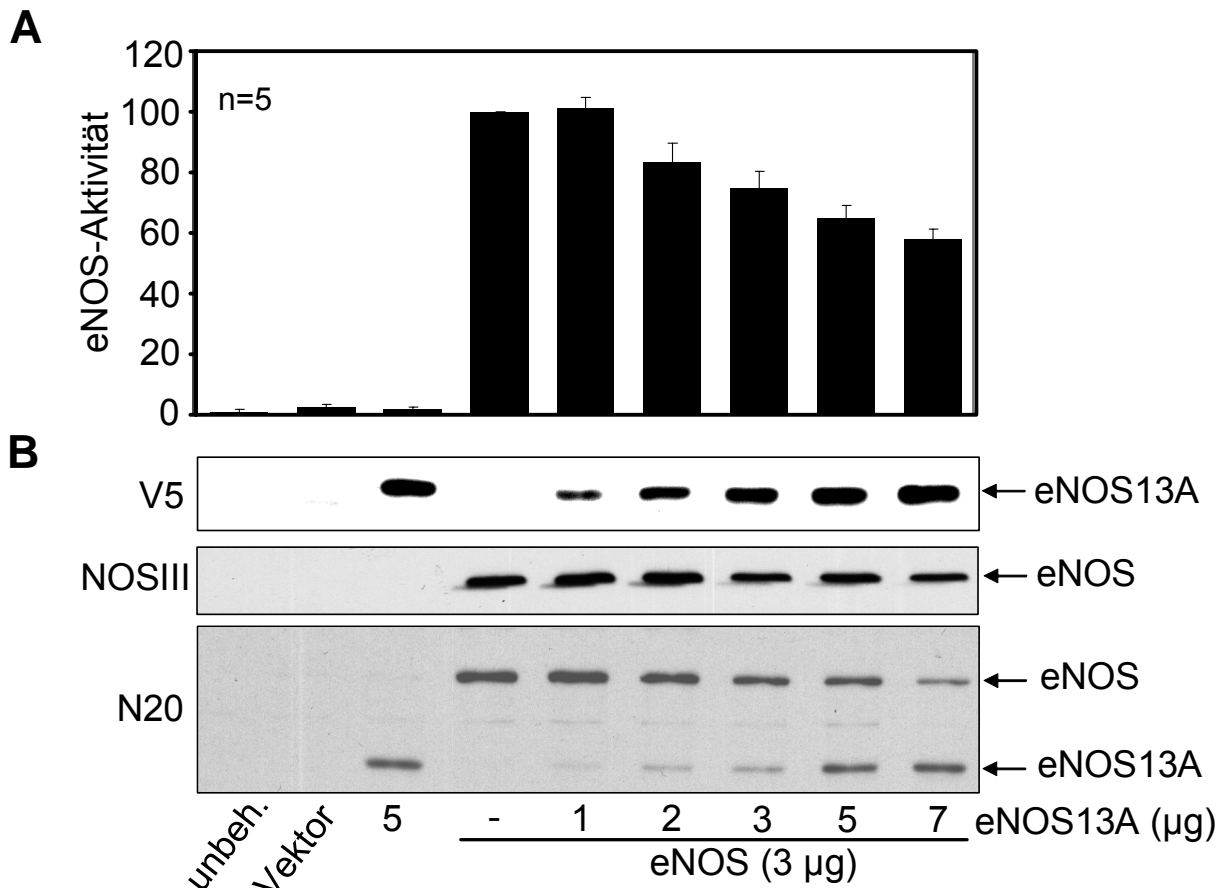


Abbildung 7: **Western Blot und eNOS-Aktivität nach Koexpression von eNOS und eNOS13A in COS-7 Zellen.** COS-7 Zellen wurden mit konstanter Menge eNOS (3 μ g) und steigenden Mengen eNOS13A Plasmid-DNA kotransfiziert. Die Gesamtmenge (10 μ g) an transfizierter DNA wurde durch Zugabe von Vektor-DNA konstant gehalten. Kontrolle: unbehandelte COS-7 Zellen (unbeh.), COS-7 Zellen nach Transfektion mit Vektor-DNA (Vektor). **(A)** Arginin-Citrullin Konversionsassay: Die gemessene eNOS-Aktivität ist in Prozent der eNOS-Aktivität nach alleiniger Expression von full-length eNOS (100%) dargestellt. Das Diagramm zeigt Mittelwerte \pm SEM, (n=5). **(B)** Western Blot: Detektion von eNOS mit NOSIII-Antikörper, von eNOS13A mit V5-Antikörper, sowie von eNOS und eNOS13A mit N20-Antikörper.

3.4 Heterodimerbildung von Splice-Variante eNOS13A mit full-length eNOS

Die eNOS liegt wie nNOS und iNOS im enzymatisch aktiven Zustand als Homodimer vor. Das eNOS-Dimer setzt sich aus zwei 134 kDa großen eNOS-Monomeren zusammen (Albrecht et al., 2003). Die Bindungsstellen für die Dimerisierung befinden sich in der Oxygenase-Domäne der eNOS. Die Oxygenase-Domäne ist in den eNOS

Splice-Varianten vollständig enthalten. Demzufolge könnte es zur Bildung eines Heterodimers von eNOS13A mit dem full-length eNOS-Monomer kommen.

Homo- und Heterodimere können mittels Low-Temperature-PAGE (LT-PAGE) nachgewiesen werden (Venema et al., 1997). Im Vorversuch wurden Proteinextrakte aus EA.hy926 Zellen für 10 Minuten bei 37°C inkubiert, anschließend mit SDS-Probenpuffer versetzt und für 30 Minuten bei einer Temperatur von 0, 20, 30, 35, 40 oder 95°C inkubiert. Danach wurden die Proben unter den Bedingungen der LT-PAGE gelelektrophoretisch aufgetrennt. Abbildung 8 zeigt die Temperaturabhängigkeit der eNOS-Dimerisierung mittels LT-PAGE. Unter denaturierenden Bedingungen bei 95°C konnte lediglich das eNOS-Monomer nachgewiesen werden. Mit abnehmender Inkubationstemperatur kam es zu einer Zunahme der eNOS-Dimere bei gleichzeitiger Abnahme der monomeren Form. Der höchste Anteil an eNOS-Dimeren konnte bei einer Inkubationstemperatur von 0°C nachgewiesen werden.

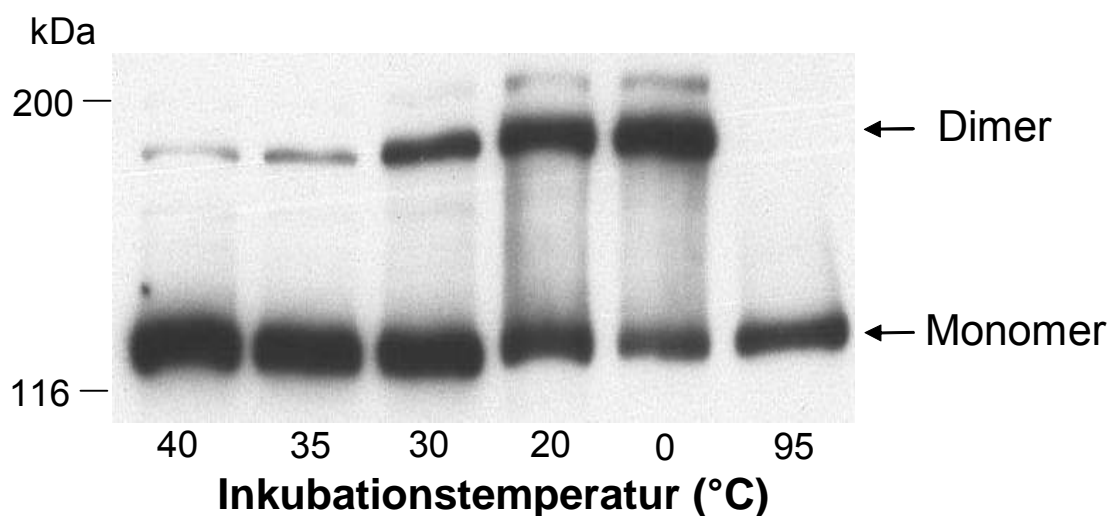


Abbildung 8: **Vorversuch LT-PAGE eNOS.** Sechs Proteinextrakte aus EA.hy926 Zellen wurden für 10 Minuten bei 37°C und anschließend für 30 Minuten in SDS-Probenpuffer bei den angegebenen Temperaturen inkubiert. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung mittels LT-PAGE erfolgte die Detektion mit dem NOSIII-Antikörper. Die Größen der Markerproteine sind in kDa angegeben.

Zum Nachweis einer Heterodimerbildung von eNOS13A mit eNOS wurden COS-7 Zellen mit jeweils 3 µg full-length eNOS und 5 µg eNOS13A Plasmid-DNA transfiziert.

Die DNA-Gesamtmenge (10 µg) pro Transfektionsansatz wurde durch Auffüllen mit Vektor-DNA konstant gehalten. Die Proteinextrakte der transfizierten Zellen wurden für 10 Minuten bei 37°C inkubiert, mit SDS-Probenpuffer versetzt und für weitere 30 Minuten bei 0°C inkubiert. Zur Kontrolle wurden Aliquots der Proteinextrakte für 5 Minuten bei 95°C in SDS-Probenpuffer inkubiert (Abbildung 9). Die anschließende gelelektrophoretische Auftrennung erfolgte unter den Bedingungen der LT-PAGE. Nach Transfektion von eNOS13A konnten im Gel die eNOS13A-Monomere und Homodimere (0°C) mit dem N20- und V5-Antikörper nachgewiesen werden. eNOS13A war offensichtlich in der Lage Homodimere zu bilden. Demzufolge scheinen die Bindungsstellen für eine Dimerisierung funktionsfähig zu sein (Abbildung 9, Spuren 1 und 2). Wie zu erwarten, bildete full-length eNOS nach alleiniger Transfektion bei einer Inkubationstemperatur von 0°C ebenfalls Homodimere, die mit den N20- und NOSIII-Antikörpern detektiert werden konnten (Abbildung 9, Spuren 3 und 4). Die Koexpression von full-length eNOS mit eNOS13A führte neben den entsprechenden Monomeren und Homodimeren der beiden Proteine zu einer weiteren Bande, die den Heterodimer-Komplex darstellte (markiert mit einem Pfeil). Die Bande des Heterodimers erschien im Gel zwischen den Homodimeren von full-length eNOS und eNOS13A und konnte mit allen drei Antikörpern nachgewiesen werden. Die stärkste Signalintensität wurde mit dem N20-Antikörper erreicht, der das Protein der full-length eNOS und von eNOS13A detektiert (Abbildung 9, Spuren 5 und 6). Die Ergebnisse zeigen, dass die Bindungsstellen für eine Dimerisierung in eNOS13A intakt sind und es nach Koexpression mit full-length eNOS zur Ausbildung von Heterodimeren kommt.

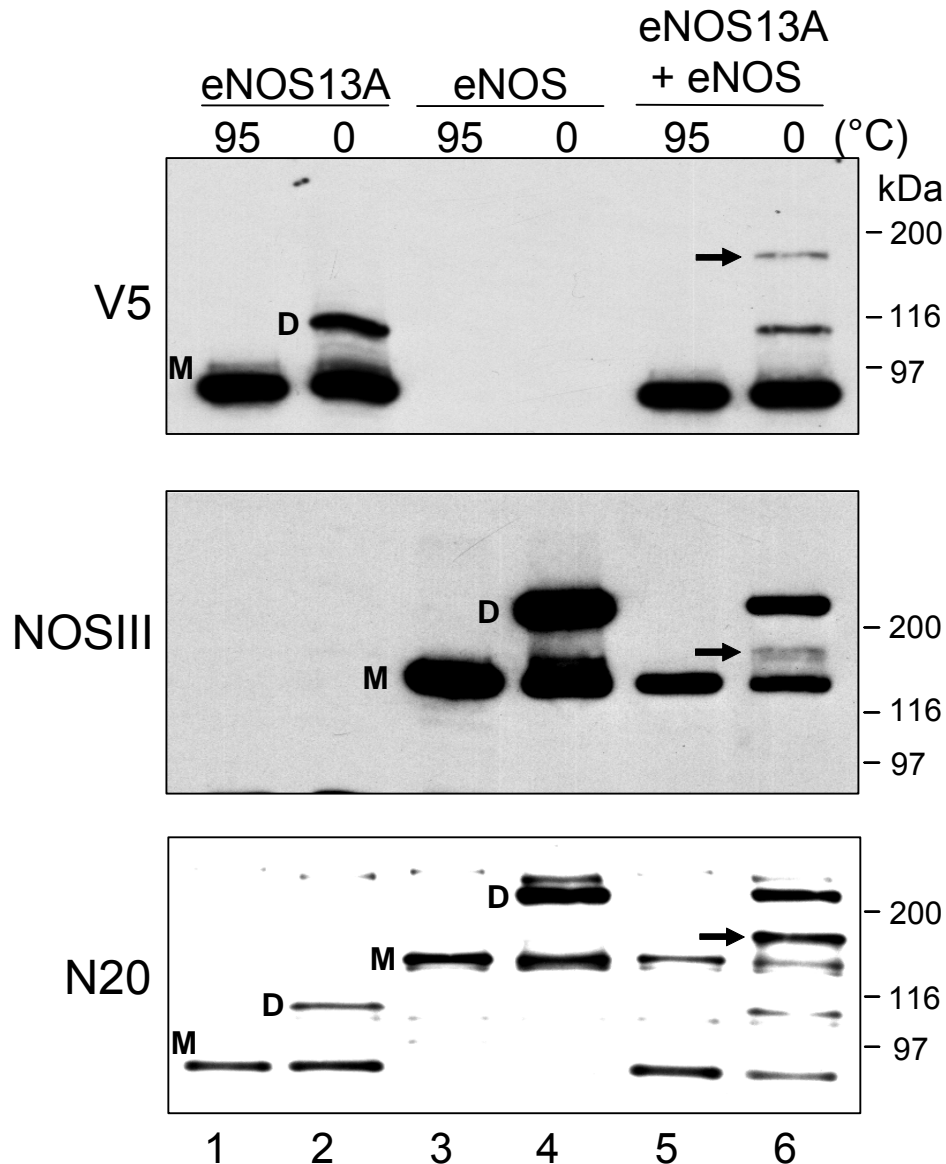


Abbildung 9: **Heterodimerbildung von eNOS und eNOS13A.** COS-7 Zellen wurden jeweils mit full-length eNOS und eNOS13A Plasmid-DNA transfiziert. Die Proteinextrakte wurden für 10 Minuten bei 37°C und anschließend für 30 Minuten bei 0°C in SDS-Probenpuffer inkubiert. Zur Kontrolle wurden parallel Aliquots der Proteinextrakte in SDS-Probenpuffer für 5 Minuten bei 95°C unter denaturierenden Bedingungen inkubiert. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung mittels LT-PAGE erfolgte die Detektion mit N20-, NOSIII- und V5-Antikörpern. Die Größen der Markerproteine sind in kDa angegeben. M = Monomer, D = Dimer, Pfeil = Heterodimer.

3.5 Vorzeitiger Abbau der eNOS-Heterodimere durch das Proteasom

Aus der Literatur ist bekannt, dass Heterodimere des von Willebrand-Proteins vorzeitig über das Proteasom abgebaut werden (Bodo et al., 2001). Auch für die eNOS ist ein Abbau über das Proteasom nachgewiesen (Jiang et al., 2003).

Um einen Einfluss des Proteasoms auf den Abbau von eNOS-Heterodimeren zu untersuchen, wurden Transfektionen mit anschließender Proteasominhibition durchgeführt. Dazu wurden COS-7 Zellen mit konstanten Mengen an eNOS Plasmid-DNA (3 µg) und steigenden Mengen an eNOS13A Plasmid-DNA kotransfiziert und für 24 Stunden mit 500 nM des Proteasominhibitors MG132 behandelt (Abbildung 10). In der Kontrolle ohne Inhibition des Proteasoms zeigte sich, wie im oben beschriebenen Versuch (Abbildung 7), eine Abnahme der eNOS-Proteinmenge bei steigender Menge an kotransfzierter eNOS13A Plasmid-DNA. Unter Proteasominhibition hingegen kam es nach Koexpression von eNOS13A zu keiner signifikanten Änderung der eNOS-Proteinmenge (N20- und NOSIII-Antikörper). Diese Ergebnisse deuten auf einen vorzeitigen Abbau der eNOS-Heterodimere über das Proteasom hin. Im eNOS-Aktivitätsassay zeigte die Abnahme der eNOS-Aktivität nach Koexpression keine signifikanten Unterschiede zwischen den Proben mit und ohne Inhibition des Proteasoms, so dass die unter Proteasominhibition stabilisierten Heterodimere vermutlich nicht funktional sind. Ohne Proteasominhibition kam es zur Abnahme der eNOS-Aktivität auf bis zu 54,8% ($\pm 3,78\%$), mit Proteasominhibition auf bis zu 64,8 % ($\pm 3,17\%$) des Ausgangswertes nach alleiniger Transfektion von full-length eNOS (100%), (Abbildung 10). Die Ergebnisse konnten in fünf unabhängigen Versuchen bestätigt werden.

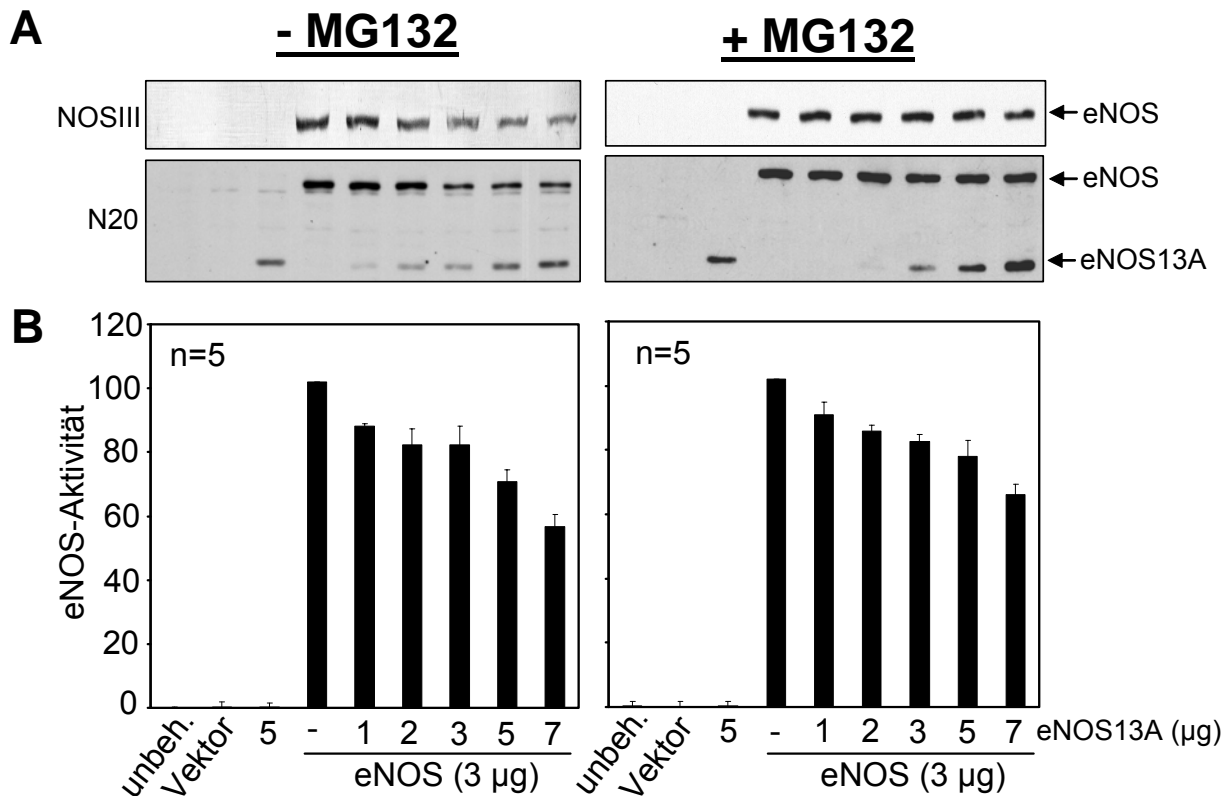


Abbildung 10: **Western Blot und eNOS-Aktivität nach Koexpression von eNOS und eNOS13A in COS-7 Zellen nach Proteasominhibition.** COS-7 Zellen wurden mit konstanter Menge an eNOS (3 µg) und steigenden Mengen an eNOS13A Plasmid-DNA kotransfiziert und mit 500 nM Proteasominhibitor MG132 behandelt (rechts). Zur Kontrolle wurden parallel Transfektionen ohne Inhibition des Proteasoms durchgeführt (links). Die Gesamtmenge an transfizierter DNA wurde durch Zugabe von Vektor-DNA konstant gehalten. Kontrollen: unbehandelte COS-7 Zellen (unbeh.), COS-7 Zellen nach Transfektion mit Vektor-DNA (Vektor). **(A)** Western Blot: Detektion von eNOS mit NOSIII-Antikörper, von eNOS und eNOS13A mit N20-Antikörper. **(B)** Arginin-Citrullin Konversionsassay: Die gemessene eNOS-Aktivität ist in Prozent der eNOS-Aktivität nach alleiniger Expression von full-length eNOS (100%) dargestellt. Das Diagramm zeigt Mittelwerte \pm SEM, (n=5).

3.6 Nachweis der mRNA von eNOS Splice-Varianten in Endothelzellen und humanen Geweben

Der Nachweis einer nativen Expression von eNOS13A, 13B und 13C in verschiedenen Endothelzellen und humanen Geweben erfolgte mittels Realtime RT-PCR. Für eNOS und die drei eNOS Splice-Varianten wurden jeweils spezifische Primer und Sonden hergestellt.

Zunächst wurde Gesamt-RNA aus humanen umbilikalen venösen Endothelzellen (HUVEC) und humanen Aortenendothelzellen (HAEC) mittels Realtime RT-PCR

untersucht (Abbildung 11). Alle drei eNOS Splice-Varianten wurden in den beiden untersuchten Endothelzellen exprimiert. Die relative Expressionsrate von eNOS13A, 13B und 13C korrelierte dabei mit der Expression von full-length eNOS. Im Vergleich zur full-length eNOS war die Expression der eNOS Splice-Varianten deutlich geringer (zwischen 0,1 % und 5 % der full-length eNOS).

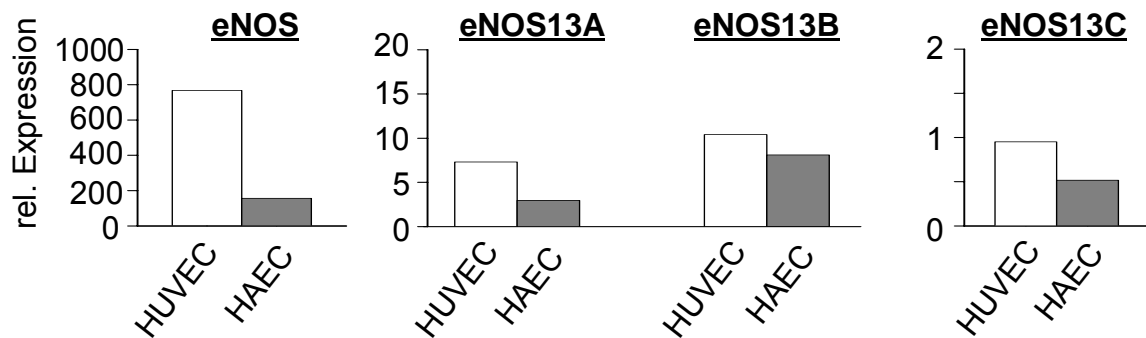


Abbildung 11: **Realtime RT-PCR aus Endothelzellen.** Relative Expression von eNOS, eNOS13A, eNOS13B und eNOS13C in HUVEC und HAEC.

Im nächsten Schritt wurde die Expression der eNOS Splice-Varianten in 17 verschiedenen humanen Geweben bestimmt (Human Total RNA Master Panel II, Clontech), (Abbildung 12). Die gemessenen Expressionsraten wurden auf den Mittelwert der Expression von fünf Housekeeping-Genen (GAPDH, HPRT, RPL19, RPS9 und 28S RNA) normiert. In nahezu allen Geweben konnten eNOS und die drei eNOS Splice-Varianten nachgewiesen werden. Die relative Häufigkeit der Splice-Varianten korrelierte weitestgehend mit der Expression von full-length eNOS. Die höchste Expressionsrate fand sich dabei in Milz und Plazenta (markiert mit Pfeil). In Testis zeigten sich jedoch niedrige Expressionsraten für full-length eNOS, eNOS13B und eNOS13C, wohingegen eine außerordentlich hohe Expression von eNOS13A (ca. 20% der full-length eNOS) zu verzeichnen war (markiert mit Sternchen). Dieses Ergebnis konnte mit Testis-RNA aus verschiedenen Quellen bestätigt werden.

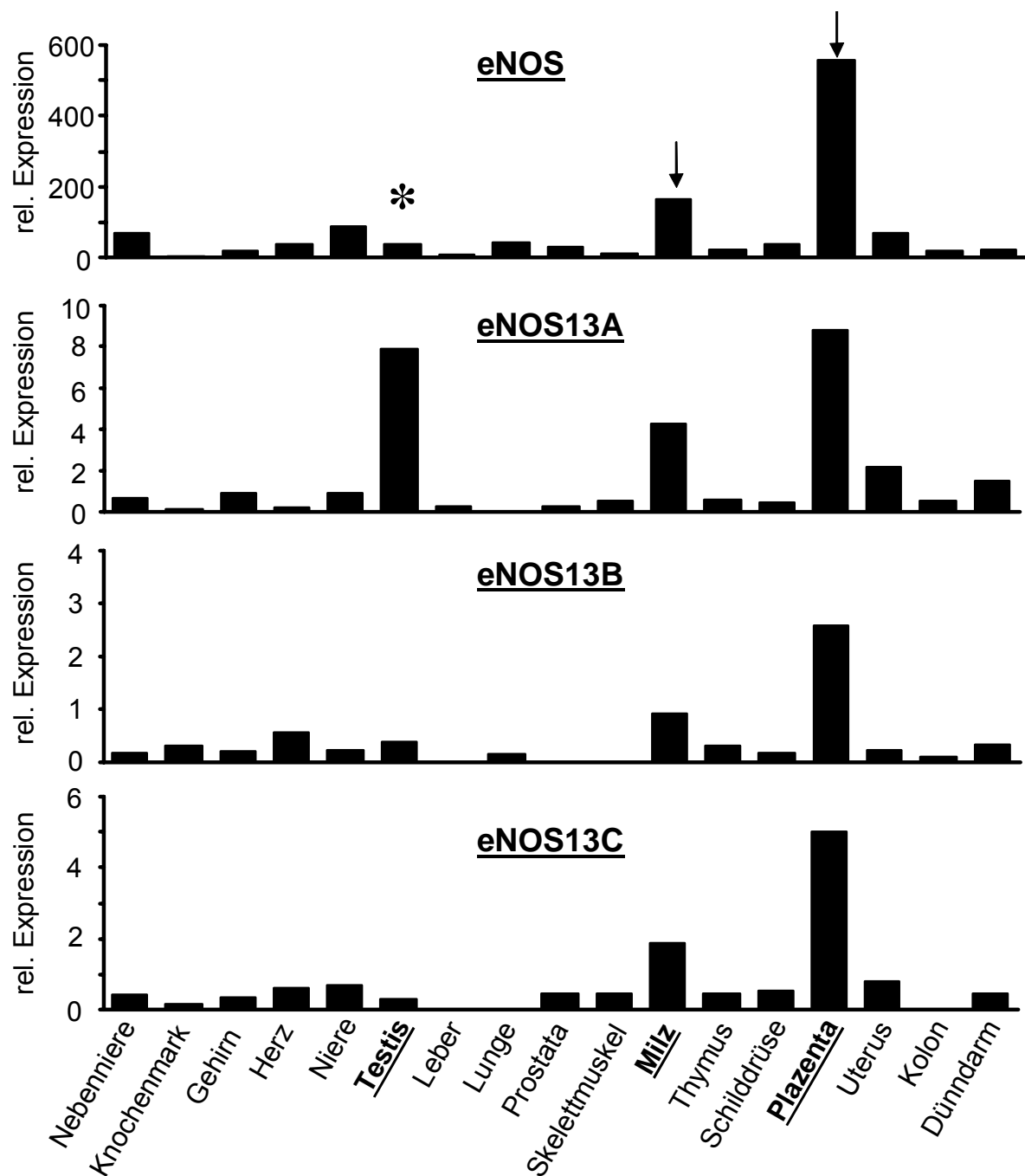


Abbildung 12: **Realtime RT-PCR aus verschiedenen humanen Geweben.** Relative Expressionsrate von full-length eNOS, eNOS13A, 13B und 13C in verschiedenen Geweben. Pfeil: Milz und Plazenta, Sternchen: Testis.

Die Ergebnisse der Realtime RT-PCR konnten mittels konventioneller RT-PCR bestätigt werden. Dazu wurden eNOS und eNOS13A aus sechs ausgewählten Geweben sowie HUVECs amplifiziert. Zum spezifischen Nachweis von eNOS wurden ein Exon 13 (FF63) und ein Exon 16 (RF 309) spezifischer Primer gewählt. Exon 16 ist in eNOS13A nicht enthalten. Der spezifische Nachweis von eNOS13A erfolgte mittels

Exon 13 (FF63) und Exon 13A (RF QRT345) spezifischen Primern. Der Exon 13A-Primer bindet an eine Intronsequenz, die in der full-length eNOS mRNA nicht vorhanden ist. Als interner Standard diente das konstitutiv exprimierte Housekeeping-Gen GAPDH. Zur Amplifikation wurde eine Zykluszahl von 28 Zyklen gewählt. Aufgrund der höheren Expressionsrate befand sich eNOS bereits im gesättigten Bereich, während eNOS13A nur schwach im Gel erschien. Zur besseren Darstellung der unterschiedlichen Expressionsraten wurde daher für eNOS zusätzlich im letzten Amplifikationsschritt eine geringere Zykluszahl (25 Zyklen) verwendet. Abbildung 13 zeigt die Banden der PCR-Produkte in den zu erwartenden Größen von 283 bp für eNOS13A und 247 bp für eNOS. Analog zur Realtime RT-PCR zeigte sich eine besonders hohe Expressionsrate von eNOS und eNOS13A in Milz und Plazenta, sowie eine im relativen Verhältnis zur full-length eNOS höhere Expression von eNOS13A in Testis.

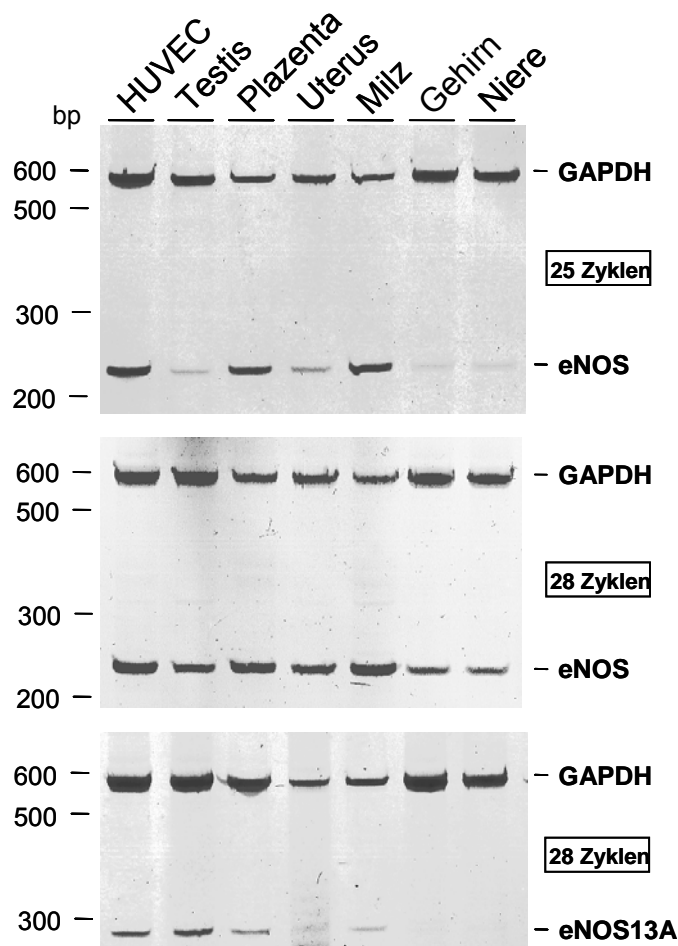


Abbildung 13: **RT-PCR der Expression von eNOS und eNOS13A.** Darstellung der Expression von eNOS und eNOS13A in sechs humanen Geweben und HUVECs. Als interner Standard diente das Housekeeping-Gen GAPDH. Die Größen der Markerbanden sind in bp angegeben.

4 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit konnten erstmals alternative Splice-Varianten der humanen eNOS nachgewiesen und ihre funktionelle Bedeutung charakterisiert werden. Durch Aktivierung alternativer 3'-Splice-Sites im Intron 13 entstehen drei neuartige Splice-Varianten - eNOS13A, eNOS13B und eNOS13C.

Alle drei Splice-Varianten enthalten Exon 1 bis 13 der full-length eNOS, gefolgt von jeweils einem neuartigen zusätzlichen Exon bestehend aus Intron 13-Sequenzen. Die 3'-Splice-Sites der drei neuen Exons (Exon 13A, 13B und 13C) weisen die für den Splice-Vorgang notwendigen AG-Konsensussequenzen, sowie einen upstream davon gelegenen Polypyrimidintrakt unterschiedlicher Länge auf. Die Ergebnisse der 3'-RACE konnten zeigen, dass alle drei eNOS Splice-Varianten das gleiche Polyadenylierungssignal (AAUAAA) verwenden, gefolgt von einem Poly-A-Schwanz.

Die Translation dieser alternativ gespleißten mRNA-Transkripte führt zu verkürzten eNOS-Proteinen, denen nahezu die vollständige Reduktase-Domäne fehlt. Für die weitere funktionelle Charakterisierung wurde exemplarisch eNOS13A gewählt. In Aktivitätsassays konnte gezeigt werden, dass eNOS13A keine eigene eNOS-Aktivität besitzt und nach Koexpression mit full-length eNOS in COS-7 Zellen zu einer Abnahme der eNOS-Aktivität führt. Dies geschieht über eine Heterodimerbildung des eNOS-Monomers mit dem Monomer der Splice-Variante. Die eNOS Splice-Varianten wirken somit dominant-negativ.

4.1 Alternatives Splicing und NO-Synthasen

Alternatives Splicing ist ein wichtiger Mechanismus zur Kontrolle der Genexpression, der sowohl gewebe- als auch entwicklungsspezifisch reguliert wird (Hui et al., 2005). Aus einem prä-mRNA-Transkript entstehen mehrere reife mRNAs, die für funktionell verschiedenartige Proteine kodieren können. Folglich stellt alternatives Splicing einen Schlüsselmechanismus für die Erhöhung der Proteinviefalt dar. Mittlerweile wird angenommen, dass ca. 74% aller humanen Gene alternativ gespleißte Isoformen besitzen (Johnson et al., 2003). Änderungen in der Proteinsequenz können nahezu alle Aspekte der Proteinfunktion, wie z.B. Bindungseigenschaften, Enzymaktivität oder Proteinstabilität beeinflussen. Häufige Mechanismen zur Regulation der Enzymaktivität

durch alternatives Splicing sind das Einführen eines Stopcodons upstream der katalytisch aktiven Sequenz, sowie die Deletion von Proteindomänen die notwendig für die Katalyse sind (Stamm et al., 2005).

In der Familie der NO-Synthasen sind alternative Splice-Varianten der nNOS und iNOS beschrieben. Für die eNOS sind bisher keine alternativen Splice-Varianten bekannt. Die NO-Synthasen - iNOS, nNOS und eNOS - besitzen, trotz der Lokalisation ihrer Gene auf unterschiedlichen Chromosomen, weitreichende Homologien sowie ähnliche Exon-Intron Strukturen (Alderton et al., 2001).

Die nNOS Splice-Variante nNOS μ wird gewebespezifisch in Herz- und Skelettmuskelzellen der Ratte, sowie humanen Penis und Urethra exprimiert. Das Protein von nNOS μ besitzt zwischen der Calmodulin- und Flavin-bindenden Domäne 34 zusätzliche Aminosäuren und weist eine ähnliche NOS-Aktivität wie die full-length nNOS auf (Magee et al., 1996; Silvagno et al., 1996).

Der nNOS Splice-Variante nNOS β fehlt das Exon 2. nNOS β konnte in bestimmten Gehirnregionen der Maus nachgewiesen werden. Die enzymatische Aktivität von nNOS β entspricht ca. 80% der full-length nNOS (Brenman et al., 1996; Eliasson et al., 1997). Eine weitere Testis-spezifische nNOS Splice-Variante, TnNOS, wird später im Text diskutiert.

Für die iNOS sind mehrere alternativ gespleißte mRNA-Transkripte mit unterschiedlichen Exon-Deletionen beschrieben, die gewebespezifisch reguliert werden und durch Zytokine induzierbar sind. Diese Splice-Varianten konnten u.a. in humanen Epithelzellen, Alveolarmakrophagen und B-Zellen nachgewiesen werden. Die iNOS Splice-Variante iNOS13-16_{neg} ist mit der Überlebensfähigkeit von B-Zellen bei der chronischen lymphatischen Leukämie assoziiert (Eissa et al., 1996; Tiscornia et al., 2004).

Durch alternatives Splicing der *Drosophila* NO-Synthase (dNOS) entstehen eine Reihe verkürzter mRNA-Transkripte, die zu enzymatisch inaktiven Proteinen führen. Die alternativen Splice-Prozesse involvieren die kodierenden Regionen, sowie die 5'-UTR des dNOS-Gens. Die dNOS besitzt weitreichende Struktur- und Sequenzhomologien zur nNOS und spielt u.a. eine Rolle bei der Entwicklung des Nervensystems und der

Imaginallscheibe. Die dNOS Splice-Varianten dNOS4, dNOS5 und dNOS6 entstehen durch das Einfügen alternativer Exons, die zu einem vorzeitigen Stopcodon führen. Im Falle einer Translation würden verkürzte dNOS-Proteine entstehen, denen die vollständige Reduktase-Domäne fehlt (Stasiv et al., 2001).

4.2 Heterodimerisierung und eNOS-Aktivität

Die eNOS-Aktivität wird über eine Reihe von Mechanismen auf transkriptioneller, posttranskriptioneller, sowie ko- und posttranslationeller Ebene reguliert. Eine Regulation der eNOS-Aktivität auf posttranskriptioneller Ebene durch alternatives Splicing ist für die eNOS bisher nicht beschrieben.

Die eNOS liegt im enzymatisch aktiven Zustand als Homodimer vor. Die Bindungsstellen für die Dimerisierung befinden sich in der Oxygenase-Domäne (Albrecht et al., 2003). Nach Koexpression von eNOS und eNOS13A in COS-7 Zellen konnte eine Heterodimerbildung beider Proteine nachgewiesen werden. Die Heterodimerisierung führte zu einer Abnahme der eNOS-Aktivität.

Zu ähnlichen Ergebnissen gelangte die Arbeitsgruppe von Lee nach Koexpression von künstlich verkürzten eNOS-Mutanten (N- und C-terminal) mit full-length eNOS in COS-7 Zellen. Die verkürzten eNOS-Mutanten bildeten Heterodimere mit eNOS und führten zu einer konzentrationsabhängigen Abnahme der eNOS-Aktivität über einen dominant-negativen Effekt. Die C-terminal verkürzte eNOS-Mutante enthielt die Aminosäuren 1 bis 734 der eNOS. Demzufolge fehlte, analog zu den eNOS Splice-Varianten dieser Arbeit, der überwiegende Teil der Reduktase-Domäne, während die vollständige Oxygenase-Domäne enthalten war (Lee et al., 1995).

Übereinstimmend mit den Ergebnissen dieser Arbeit konnte keine Abnahme der eNOS-Aktivität nachgewiesen werden, wenn Proteinextrakte, die verkürzte eNOS-Mutanten enthielten, zu Endothelzellextrakten mit full-length eNOS gegeben wurden (Lee et al., 1995). Dies deutet darauf hin, dass die intrazelluläre Koexpression von beiden Proteinen notwendig für eine Heterodimerisierung ist.

Interessante Parallelen zu den Ergebnissen dieser Arbeit finden sich bei den Splice-Varianten der *Drosophila*. Den Splice-Varianten dNOS4, dNOS5 und dNOS6 fehlt, vergleichbar zu den eNOS Splice-Varianten dieser Arbeit, die Reduktase-Domäne. Die Oxygenase-Domäne mit den Bindungsstellen für die Dimerisierung ist vollständig enthalten. dNOS4 inhibierte nach Überexpression in transgenen Fliegen über eine Heterodimerbildung mit full-length dNOS die NOS-Aktivität. Es konnte nachgewiesen werden, dass dNOS4 die antiproliferativen Eigenschaften von dNOS in der Imaginalscheibe des Auges supprimiert und so zu hyperproliferativen Phänotypen in pupalen und adulten Fliegen führt (Stasiv et al., 2004). Übereinstimmend konnte eine starke Abnahme der dNOS-Aktivität über Heterodimerbildung nach Koexpression der Splice-Varianten dNOS4, dNOS5 und dNOS6 mit dNOS in 293-Zellen gezeigt werden (Stasiv et al., 2001).

Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstützen die Hypothese, dass posttranskriptionelle Modifikationen von prä-mRNA, die zur Expression von dominant-negativen Proteinen führen, einen grundlegenden Mechanismus für die Regulation von Enzymaktivitäten bei den NO-Synthasen und möglicherweise bei einer Vielzahl weiterer Proteine darstellen. Es gibt eine Reihe von Beispielen, in denen alternatives Splicing zu dominant-negativen Proteinen in Heterodimerkomplexen führt.

Für die α_2 -Untereinheit der NO-sensitiven löslichen Guanylatzyklase existiert eine Splice-Variante (α_{2i}), die 31 zusätzliche Aminosäuren innerhalb der katalytischen Domäne enthält. Die alternative α_{2i} -Untereinheit konkurriert mit der α_2 -Untereinheit um die Dimerisierung mit der β_1 -Untereinheit der Guanylatzyklase und senkt so über eine Heterodimerbildung die Enzymaktivität (Behrends et al., 1995).

Ein dominant-negativer Effekt durch Heterodimerisierung ist auch für die Pyroglutamyl-Aminopeptidase II (PPII) aus der Familie der Zink-Metalloproteasen beschrieben. PPII ist für die Inaktivierung des Thyreotropin-Releasing-Hormons verantwortlich. Im Gewebe der Ratte konnte eine alternativ gespleißte PPII-mRNA nachgewiesen werden, die für ein C-terminal verkürztes PPII-Protein (PPII*) kodiert, das keine eigene PPII-Aktivität aufweist. Die Koexpression von PPII und steigenden Mengen an PPII* in COS-7 Zellen führte zu einer konzentrationsabhängigen Abnahme der PPII-Aktivität unter Bildung von Heterodimeren (Chavez-Gutierrez et al., 2005).

Für einige Rezeptoren, wie z.B. Melanocortin-Rezeptor (Biebermann et al., 2003) oder Wachstumshormon-Rezeptor (Ayling et al., 1997), sind dominant-negative Mutanten beschrieben, die über nicht-funktionale Heterodimerbildung mit dem Wildtyprezeptor auf der Zelloberfläche die Rezeptoreigenschaften regulieren.

Eine verkürzte Mutante des Prolaktin-Rezeptors (PRLR1-242) wirkt dominant-negativ über die Bildung von nicht-funktionalen Heterodimeren. Prolaktin ist assoziiert mit der Proliferation und Migration von Brustkrebszellen. PRLR1-242 inhibierte nach Expression in der Brustkrebszelllinie T47-D die Aktivierung der STAT5-Kaskade (STAT = Signaltransduktor und Aktivator der Transkription) durch Prolaktin und blockierte die Prolaktin-induzierte Proliferation der T47-D Zellen (Flynn et al., 2004).

Für die Östrogenrezeptoren - ER α und ER β - sind zahlreiche alternative Splice-Isoformen beschrieben, die die Signalantwort auf Östrogene unterschiedlich beeinflussen können. Die Splice-Variante ER β cx beispielsweise bildet bevorzugt Heterodimere mit ER α und zeigt einen dominant-negativen Effekt auf die DNA-Bindungsaktivität von ER α (Ogawa et al., 1998).

Im Unterschied zu den *Drosophila*-Studien (Stasiv et al., 2004; Stasiv et al., 2001) und der Studie mit künstlich verkürzten eNOS-Proteinen (Lee et al., 1995), wurde in den Experimenten dieser Arbeit mit zunehmender Menge an kotransfizierter DNA von eNOS13A eine Abnahme der full-length eNOS-Proteinmenge beobachtet.

Instabile Proteinkomplexe, wie sie Heterodimere darstellen, sowie unvollständig gefaltete Oligomere werden durch das Endoplasmatische Retikulum im Sinne einer Qualitätskontrolle aussortiert und vorzeitig degradiert (Bodo et al., 2001; Eilgaard et al., 2003). In eukaryotischen Zellen ist das Proteasom für die Degradation der meisten zellulären Proteine verantwortlich (Coux et al., 1996). Auch für die eNOS ist der Abbau über das Proteasom nach Ubiquitinierung beschrieben (Jiang et al., 2003).

Nach Inhibition des Proteasoms blieb die eNOS-Proteinmenge auch nach Koexpression mit eNOS13A konstant. Demnach könnte die Abnahme der eNOS-Proteinmenge auf eine vorzeitige Degradation der eNOS/eNOS13A-Heterodimere durch das Proteasom zurückgeführt werden.

Die Ursache für die unterschiedlichen Ergebnisse dieser Arbeit im Vergleich zu den oben genannten Studien ist unklar und eventuell auf verschiedene Längen oder die Stabilität der Splice-Varianten im jeweiligen System zurückzuführen.

Das Ausmaß der Abnahme der eNOS-Aktivität nach Koexpression von eNOS und eNOS13A war zwischen den Ansätzen mit und ohne Inhibition der Proteasoms vergleichbar, so dass angenommen werden kann, dass die nach Proteasominhibition stabilisierten Heterodimere nicht funktional sind.

Die Splice-Varianten eNOS13B und eNOS13C besitzen einen weitgehend identischen Aufbau wie eNOS13A. Folglich kann für diese Splice-Varianten ebenfalls eine dominant-negative Wirkung auf die eNOS-Aktivität über eine Bildung von Heterodimerkomplexen angenommen werden. Darüber hinaus ist bei gleichzeitiger Expression der drei Splice-Varianten ein additiver Wirkungseffekt vorstellbar.

4.3 Expression der eNOS Splice-Varianten in Endothelzellen und humanen Geweben

Die mRNAs der drei eNOS Splice-Varianten konnten in verschiedenen Endothelzellen und den meisten humanen Geweben mittels Taqman-PCR nachgewiesen werden. Eine besonders hohe Expression von eNOS Splice-Varianten und eNOS fand sich im Gewebe der Milz und der Plazenta. Während die Expression der Splice-Varianten in den meisten Geweben mit der Expression von eNOS zu korrelieren schien, konnte in humanem Testis-Gewebe eine im relativen Verhältnis zur eNOS höhere Expressionsrate von eNOS13A nachgewiesen werden.

Im Hoden sind eine Vielzahl von alternativen Splice-Prozessen beschrieben, die mit der Geschlechtsbestimmung, der meiotischen Teilung von Keimzellen, sowie der Spermatogenese assoziiert sind (Venables, 2002). In humanem Hodengewebe konnten mittels Northern Blot-Analysen neben der mRNA der full-length eNOS von 4,2 kb, verkürzte eNOS mRNA-Transkripte mit einer Größe von 1,4 kb, 1,7 kb, 2,0 kb und 2,4 kb nachgewiesen werden, die vermutlich auf alternative Splice-Prozesse zurückzuführen sind (Park et al., 2000). Ein verkürztes eNOS mRNA-Transkript von ca. 3 kb konnte auch in Testis-Gewebe der Ratte gezeigt werden (Sessa et al., 1993).

Die nNOS Splice-Variante, TnNOS, kodiert für ein N-terminal verkürztes Protein und wird spezifisch in humanen Testis exprimiert. In TnNOS werden Intronsequenzen aus dem Intron 3 der nNOS als neuartige 5'- Exons an das Exon 4 gespleißt. TnNOS wies nach stabiler Transfektion in CHO-K1 Zellen eine mit der full-length nNOS vergleichbare katalytische Aktivität auf (Wang et al., 1997).

4.4 Splicing-Enhancer im Intron 13

Das Intron 13 der humanen eNOS enthält eine polymorphe CA-Repeat Region in der Nähe der 5'-Splice-Site. Die Anzahl der CA-Repeats ist genetisch determiniert und reicht von CA₁₄ bis CA₄₄ (Nadaud et al., 1994). Interessanterweise ist eine hohe Anzahl an CA-Repeats im Intron 13 mit einem erhöhten Risiko für eine Koronare Herzerkrankung assoziiert (Stangl et al., 2000). In Kombination mit gebundenem nukleären Ribonukleoprotein (hnRNP) L beeinflussen die CA-Repeats längenabhängig die Splice-Effizienz der eNOS (Hui et al., 2003). Darüber hinaus beeinflussen CA-Repeats die Wahl alternativer Splice-Sites in eNOS und anderen humanen Genen (Hui et al., 2005). Möglicherweise haben die CA-Repeats in ihrer Funktion als Splicing-Enhancer einen regulatorischen Einfluss auf die Aktivierung von alternativen 3'-Splice-Sites im Intron 13. Ein möglicher Zusammenhang zwischen der Länge der CA-Repeats im Intron 13 und der Expression der eNOS Splice-Varianten sollte in weiterreichenden Experimenten untersucht werden.

4.5 eNOS-assoziierte Erkrankungen und alternatives Splicing

Stickstoffmonoxid (NO), das Produkt der eNOS, ist neben seiner Funktion als stärkster endogener Vasodilatator für eine Reihe gefäßprotektiver Eigenschaften verantwortlich, wie z.B. Verhinderung der Leukozytenadhäsion an das Endothel, Inhibition der Proliferation von glatten Gefäßmuskelzellen und Inhibition der Plättchenaggregation (Li et al., 2000). So sind eine Vielzahl von Erkrankungen mit einer verminderten Produktion oder einem vermehrten Abbau von vaskulärem NO assoziiert. Dazu zählen u.a. Hypercholesterolämie (Stroes et al., 1995), arterieller Hypertonus (Panza et al., 1995) und Diabetes mellitus (Williams et al., 1996). In den fortgeschrittenen Stadien der Atherosklerose konnte eine verminderte Expression von eNOS-Protein nachgewiesen werden (Oemar et al., 1998). Es ist bekannt, dass alternatives Splicing eine bedeutende

Rolle bei der Entstehung und dem Verlauf von Krankheiten und Tumoren spielt (Caceres et al., 2002; Venables, 2006).

Eine moderate Expression der eNOS Splice-Varianten über einen längeren Zeitraum könnte die Produktion von Stickstoffmonoxid negativ beeinflussen und auf diese Weise NO-assoziierte Erkrankungen begünstigen.

4.6 Perspektiven

Die Heterodimerbildung von full-length eNOS mit den verkürzten Proteinen der eNOS Splice-Varianten stellt einen neuartigen potentiellen Regulations-Mechanismus für die eNOS-Aktivität dar. Dennoch lässt die Diskussion einige Fragen offen.

1. Um die Bedeutung der alternativen Splice-Prozesse zu beurteilen, wäre eine Aufklärung der Regulation der Expression der eNOS Splice-Varianten erforderlich. Verschiedene Stimuli, wie TNF α , OxLDL etc. könnten einen Einfluss auf die Höhe der Expression der Splice-Varianten haben. Nach Behandlung von Zellen mit entsprechenden Substanzen könnte die Expression der Splice-Varianten mittels Taqman-PCR untersucht werden.
2. Es wäre interessant zu untersuchen, ob die CA-Repeats im Intron 13 der eNOS auch alternative 3'-Splice-Sites aktivieren können und einen Einfluss auf die Expression der eNOS Splice-Varianten haben.
3. Offen ist die Frage nach einer physiologischen Bedeutung der eNOS Splice-Varianten. Alle drei eNOS Splice-Varianten werden nativ in verschiedenen Endothelzellen und humanen Geweben exprimiert. Eine moderate Expression der eNOS Splice-Varianten über einen längeren Zeitraum könnte die eNOS-Aktivität negativ beeinflussen und demzufolge eNOS assoziierte Erkrankungen, wie z.B. Atherosklerose, begünstigen.

5 Zusammenfassung

Die endotheliale NO-Synthase (eNOS) gilt als Schlüsselenzym der vaskulären Homöostase. Neben seiner Bedeutung als potenter endogener Vasodilatator ist Stickstoffmonoxid (NO), das Produkt der eNOS, für eine Reihe gefäßprotektiver Eigenschaften verantwortlich. Während für die humane iNOS und nNOS eine Reihe von alternativen Splice-Varianten beschrieben sind, existiert bisher kein Nachweis alternativ gespleißter Isoformen für die eNOS.

Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit konnten erstmals alternative Splice-Varianten der humanen eNOS nachgewiesen werden. Die drei neuen Splice-Varianten - eNOS13A, eNOS13B und eNOS13C - entsprechen von Exon 1 bis 13 der humanen eNOS. An das Exon 13 schließt sich jeweils ein neues Exon bestehend aus Intron 13 Sequenzen an, gefolgt von einem Poly-A-Schwanz.

Im Falle einer Translation der Splice-Varianten entstehen verkürzte eNOS-Proteine, denen große Teile der Reduktase-Domäne fehlen und die keine eigene eNOS-Aktivität besitzen. Die Koexpression von eNOS mit eNOS13A in COS-7 Zellen führte zu einer Abnahme der eNOS-Aktivität durch die Bildung von Heterodimeren. Die Stabilisierung der full-length eNOS-Proteinmenge nach Proteasominhibition deutet auf einen vorzeitigen Abbau der Heterodimere über das Ubiquitin-Proteasom-System hin.

Die drei eNOS Splice-Varianten werden nativ in verschiedenen Endothelzellen und in einer Vielzahl humaner Gewebe exprimiert. Eine besonders hohe Expression an eNOS13A-mRNA konnte in humanem Testis-Gewebe nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen einen neuartigen potentiellen Mechanismus zur Regulation der eNOS-Aktivität und NO-Produktion über dominant-negative Splice-Varianten der humanen eNOS.

Schlagworte: NO-Synthase, Alternatives Splicing, Endothel, Stickstoffmonoxid

6 Abstract

NO, the product of endothelial NOS (eNOS), is a major regulator of vascular homeostasis and a critical factor in preventing cardiovascular diseases. Whereas for human iNOS and nNOS a number of different splice variants have been described, no such splice isoforms are known for eNOS so far.

This study describes three novel splice variants for human eNOS. These splice variants - termed eNOS13A, eNOS13B and eNOS13C - share the first 13 exons of human eNOS followed by novel overlapping exons containing intron 13 sequences. All three splice variants share the same polyadenylation signal followed by a poly-A tail.

When translated, these splice-variants would result in truncated eNOS proteins lacking eNOS activity. Coexpression of full-length and eNOS13A in COS-7 cells diminished eNOS enzyme activity by formation of heterodimers. Coexpression in COS-7 cells with inhibition of the proteasome suggest an enhanced degradation of the heterodimers by the ubiquitin-proteasome-system.

All three splice-variants were expressed in different endothelial cells and various human tissues. Expression of eNOS13A was particularly high in human testis.

Taken together, these data suggest a new mechanism for the regulation of eNOS activity and NO production by dominant-negative splice variants of human eNOS.

Keywords: nitric oxide synthase, alternative splicing, endothelium, nitric oxide

7 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
μCi	Mikrocurie
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
28S	28S Ribosomale RNA
A	Adenin
Ak	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
AS	Aminosäure(n)
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchonic Acid, Bicinchoninsäure
bFGF	Basic Fibroblast Growth Factor, basischer Fibroblastenfaktor
BH ₄	(6R)-5,6,7,8-Tetrahydrobiopterin
bp	Basenpaar(e)
BSA	Bovines Serumalbumin
C	Cytosin
Ca ²⁺	Kalzium
CaCl ₂	Kalziumchlorid
CaM	Calmodulin
cDNA	Komplementäre DNA, entsteht nach reverser Transkription von RNA
cGMP	Zyklisches Guanosinmonophosphat
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlendioxid
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
dGTP	Desoxyguanidintriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DNOS	<i>Drosophila</i> Nitric Oxide Synthase

dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
Dscam	Down Syndrom Cell Adhesion Molecule, Down-Syndrom Zelladhäsionsmolekül
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EC	Endothelial Cell, Endothelzelle
ECGS	Endothelial Cell Growth Supplement, Endothelzell-Wachstumszusatz
ECL	Enhanced Chemiluminescence, verstärkte Chemilumineszenz
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal Growth Factor, epidermaler Wachstumsfaktor
EGTA	Ethylenglykoltetraessigsäure
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbant Assay, Enzymgekoppelter Immunadsorptionsassay
eNOS	Endothelial Nitric Oxide Synthase
ER	Östrogenrezeptor
EST	Expressed Sequence Tag
FAD	Flavinadenindinukleotid,
FCS	Fetales Kälberserum
FMN	Flavinmononukleotid, Riboflavin 5'-Monophosphat
FW	Forward
g	Gramm
G	Guanin
GAPDH	Glycerinaldehyd-Phosphatdehydrogenase
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
HAEC	Humane Aortenendothelzellen
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
hnRNA	Heterogene Nukleäre RNA
hnRNP	Heterogenes Nukleäres Ribonukleoprotein
HPRT	Humane Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase
HUVEC	Humane Umbilikale Venöse Endothelzelle
IgG	Immunglobulin G
iNOS	Inducible Nitric Oxide Synthase

K	Kalium
kb	Kilobasenpaare
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KOH	Kaliumlauge
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
M	Molar
mA	Milliampere
MeEth	Mercaptoethanol
mg	Milligramm
Mg ²⁺	Magnesium
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mm	Millimeter
MMLV	Moloney Murine Leukemia Virus
mRNA	Messenger-RNA
Mw	Molecular Weight, Molmasse
Na	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
NADPH	Nikotinamidadenindinukleotidphosphat
NaOH	Natronlauge
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nNOS	Neuronal Nitric Oxide Synthase
NO	Nitric Oxide, Stickstoffmonoxid
NOS	Nitric Oxide Synthase, Stickstoffmonoxidsynthase
nt	Nukleotid(e)
O ₂	Sauerstoff
OD	Optische Dichte
Oligo-d(T)	Oligodesoxythymidin
oxLDL	Oxidiertes Low-Density-Lipoprotein

PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Chain Reaction, Polymerasekettenreaktion
pH	Negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen- konzentration in mol/l
pmol	Picomol
Poly-A	Polyadenyl
PPII	Pyroglutamyl Aminopeptidase II
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RACE	Rapid Amplification of cDNA Ends
RNA	Ribonucleic Acid, Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuclease
RPL19	Ribosomales Protein L19
rpm	Umdrehungen pro Minute
RPS9	Ribosomales Protein S9
RT	Reverse Transkriptase
RW	Reverse
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
snRNA	Small Nuclear RNA
snRNP	Small Nuclear Ribonucleoprotein-Particles
SR	Serin- und argininreich
SRrp	SR-Protein-verwandte Polypeptide
STAT5	Signal Transducer and Activator of Transcription 5, Aktivator der Signaltransduktion und Transkription 5
T	Thymin
TBE	Tris-Borat-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TNF- α	Tumornekrosefaktor-alpha
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Units
UPM	Universal-Primer-Mix
UTR	Untranslated Region, nicht translatierte Region von mRNAs
UV	Ultraviolett

V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor, vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
w/v	Weight/Volumen, Gewicht pro Volumen
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-Beta-D-Galaktosid

8 Literaturverzeichnis

1. Albrecht EW, Stegeman CA, Heeringa P, Henning RH, van Goor H. Protective role of endothelial nitric oxide synthase. *J. Pathol.* 2003; 199: 8-17
2. Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem. J.* 2001; 357: 593-615
3. Andrew PJ und Mayer B. Enzymatic function of nitric oxide synthases. *Cardiovasc.Res.* 1999; 43: 521-531
4. Armour KE, Armour KJ, Gallagher ME et al. Defective bone formation and anabolic response to exogenous estrogen in mice with targeted disruption of endothelial nitric oxide synthase. *Endocrinology* 2001; 142: 760-766
5. Ayling RM, Ross R, Towner P et al. A dominant-negative mutation of the growth hormone receptor causes familial short stature. *Nat. Genet.* 1997; 16: 13-14
6. Balligand JL, Kobzik L, Han X et al. Nitric oxide-dependent parasympathetic signaling is due to activation of constitutive endothelial (type III) nitric oxide synthase in cardiac myocytes. *J. Biol. Chem.* 1995; 270: 14582-14586
7. Behrends S, Harteneck C, Schultz G, Koesling D. A variant of the alpha 2 subunit of soluble guanylyl cyclase contains an insert homologous to a region within adenylyl cyclases and functions as a dominant negative protein. *J. Biol. Chem.* 1995; 270: 21109-21113
8. Biebermann H, Krude H, Elsner A et al. Autosomal-dominant mode of inheritance of a melanocortin-4 receptor mutation in a patient with severe early-onset obesity is due to a dominant-negative effect caused by receptor dimerization. *Diabetes* 2003; 52: 2984-2988
9. Bodo I, Katsumi A, Tuley EA et al. Type 1 von Willebrand disease mutation Cys1149Arg causes intracellular retention and degradation of heterodimers: a possible general mechanism for dominant mutations of oligomeric proteins. *Blood* 2001; 98: 2973-2979
10. Boise LH, Gonzalez-Garcia M, Postema CE et al. bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell* 1993; 74: 597-608
11. Brenman JE, Chao DS, Gee SH et al. Interaction of nitric oxide synthase with the postsynaptic density protein PSD-95 and alpha1-syntrophin mediated by PDZ domains. *Cell* 1996; 84: 757-767
12. Buttery LD, Springall DR, Chester AH et al. Inducible nitric oxide synthase is present within human atherosclerotic lesions and promotes the formation and activity of peroxynitrite. *Lab Invest* 1996; 75: 77-85

13. Caceres JF und Kornblihtt AR. Alternative splicing: multiple control mechanisms and involvement in human disease. *Trends Genet.* 2002; 18: 186-193
14. Chavez-Gutierrez L, Bourdais J, Aranda G et al. A truncated isoform of pyroglutamyl aminopeptidase II produced by exon extension has dominant-negative activity. *J. Neurochem.* 2005; 92: 807-817
15. Chomczynski P und Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 1987; 162: 156-159
16. Cooke JP und Dzau VJ. Nitric oxide synthase: role in the genesis of vascular disease. *Annu. Rev. Med.* 1997; 48: 489-509
17. Coux O, Tanaka K, Goldberg AL. Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. *Annu. Rev. Biochem.* 1996; 65: 801-847
18. Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B et al. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature* 1999; 399: 601-605
19. Dinerman JL, Dawson TM, Schell MJ, Snowman A, Snyder SH. Endothelial nitric oxide synthase localized to hippocampal pyramidal cells: implications for synaptic plasticity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 1994; 91: 4214-4218
20. Edgell CJ, McDonald CC, Graham JB. Permanent cell line expressing human factor VIII-related antigen established by hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 1983; 80: 3734-3737
21. Eissa NT, Strauss AJ, Haggerty CM et al. Alternative splicing of human inducible nitric-oxide synthase mRNA. tissue-specific regulation and induction by cytokines. *J. Biol. Chem.* 1996; 271: 27184-27187
22. Eliasson MJ, Blackshaw S, Schell MJ, Snyder SH. Neuronal nitric oxide synthase alternatively spliced forms: prominent functional localizations in the brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 1997; 94: 3396-3401
23. Ellgaard L und Helenius A. Quality control in the endoplasmic reticulum. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2003; 4: 181-191
24. Flynn A, Whittington H, Goffin V, Uney J, Norman M. A mutant receptor with enhanced dominant-negative activity for the blockade of human prolactin signalling. *J. Mol. Endocrinol.* 2004; 32: 385-396
25. Fox SW und Chow JW. Nitric oxide synthase expression in bone cells. *Bone* 1998; 23: 1-6
26. Govers R und Rabelink TJ. Cellular regulation of endothelial nitric oxide synthase. *Am. J. Physiol Renal Physiol* 2001; 280: F193-F206

27. Grabowski PJ, Padgett RA, Sharp PA. Messenger RNA splicing in vitro: an excised intervening sequence and a potential intermediate. *Cell* 1984; 37: 415-427
28. Graveley BR. Alternative splicing: increasing diversity in the proteomic world. *Trends Genet.* 2001; 17: 100-107
29. Harris NL und Senapathy P. Distribution and consensus of branch point signals in eukaryotic genes: a computerized statistical analysis. *Nucleic Acids Res.* 1990; 18: 3015-3019
30. Hui J und Bindereif A. Alternative pre-mRNA splicing in the human system: unexpected role of repetitive sequences as regulatory elements. *Biol. Chem.* 2005; 386: 1265-1271
31. Hui J, Hung LH, Heiner M et al. Intronic CA-repeat and CA-rich elements: a new class of regulators of mammalian alternative splicing. *EMBO J.* 2005; 24: 1988-1998
32. Hui J, Stangl K, Lane WS, Bindereif A. HnRNP L stimulates splicing of the eNOS gene by binding to variable-length CA repeats. *Nat. Struct. Biol.* 2003; 10: 33-37
33. Jiang J, Cyr D, Babbitt RW, Sessa WC, Patterson C. Chaperone-dependent regulation of endothelial nitric-oxide synthase intracellular trafficking by the co-chaperone/ubiquitin ligase CHIP. *J. Biol. Chem.* 2003; 278: 49332-49341
34. Johnson JM, Castle J, Garrett-Engle P et al. Genome-wide survey of human alternative pre-mRNA splicing with exon junction microarrays. *Science* 2003; 302: 2141-2144
35. Kyhse-Andersen J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J. Biochem. Biophys. Methods* 1984; 10: 203-209
36. Laycock SK, Vogel T, Forfia PR et al. Role of nitric oxide in the control of renal oxygen consumption and the regulation of chemical work in the kidney. *Circ. Res.* 1998; 82: 1263-1271
37. Lee CM, Robinson LJ, Michel T. Oligomerization of endothelial nitric oxide synthase. Evidence for a dominant negative effect of truncation mutants. *J. Biol. Chem.* 1995; 270: 27403-27406
38. Lewin BM: *Molekularbiologie der Gene*. Spektrum, Akad. Verl. 2002; 6. Auflage, 711-739.
39. Li H und Forstermann U. Nitric oxide in the pathogenesis of vascular disease. *J. Pathol.* 2000; 190: 244-254

40. Li H, Wallerath T, Forstermann U. Physiological mechanisms regulating the expression of endothelial-type NO synthase. *Nitric. Oxide.* 2002; 7: 132-147
41. Lopez AJ. Alternative splicing of pre-mRNA: developmental consequences and mechanisms of regulation. *Annu. Rev. Genet.* 1998; 32: 279-305
42. Magee T, Fuentes AM, Garban H et al. Cloning of a novel neuronal nitric oxide synthase expressed in penis and lower urinary tract. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1996; 226: 145-151
43. Marletta MA. Nitric oxide synthase structure and mechanism. *J. Biol. Chem.* 1993; 268: 12231-12234
44. Marsden PA, Heng HH, Scherer SW et al. Structure and chromosomal localization of the human constitutive endothelial nitric oxide synthase gene. *J. Biol. Chem.* 1993; 268: 17478-17488
45. Michel JB, Feron O, Sacks D, Michel T. Reciprocal regulation of endothelial nitric-oxide synthase by Ca²⁺-calmodulin and caveolin. *J. Biol. Chem.* 1997; 272: 15583-15586
46. Modrek B und Lee C. A genomic view of alternative splicing. *Nat. Genet.* 2002; 30: 13-19
47. Morris R, Southam E, Braid DJ, Garthwaite J. Nitric oxide may act as a messenger between dorsal root ganglion neurones and their satellite cells. *Neurosci. Lett.* 1992; 137: 29-32
48. Nadaud S, Bonnardeaux A, Lathrop M, Soubrier F. Gene structure, polymorphism and mapping of the human endothelial nitric oxide synthase gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1994; 198: 1027-1033
49. Nilsen TW. The spliceosome: the most complex macromolecular machine in the cell? *Bioessays* 2003; 25: 1147-1149
50. Oemar BS, Tschudi MR, Godoy N et al. Reduced endothelial nitric oxide synthase expression and production in human atherosclerosis. *Circulation* 1998; 97: 2494-2498
51. Ogawa S, Inoue S, Watanabe T et al. Molecular cloning and characterization of human estrogen receptor betax: a potential inhibitor of estrogen action in human. *Nucleic Acids Res.* 1998; 26: 3505-3512
52. Ortiz de Montellano PR, Nishida C, Rodriguez-Crespo I, Gerber N. Nitric oxide synthase structure and electron transfer. *Drug Metab Dispos.* 1998; 26: 1185-1189
53. Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987; 327: 524-526

54. Panza JA, Garcia CE, Kilcoyne CM, Quyyumi AA, Cannon RO, III. Impaired endothelium-dependent vasodilation in patients with essential hypertension. Evidence that nitric oxide abnormality is not localized to a single signal transduction pathway. *Circulation* 1995; 91: 1732-1738
55. Park CS, Krishna G, Ahn MS et al. Differential and constitutive expression of neuronal, inducible, and endothelial nitric oxide synthase mRNAs and proteins in pathologically normal human tissues. *Nitric Oxide* 2000; 4: 459-471
56. Radomski MW, Palmer RM, Moncada S. An L-arginine/nitric oxide pathway present in human platelets regulates aggregation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 1990; 87: 5193-5197
57. Raman CS, Li H, Martasek P et al. Crystal structure of constitutive endothelial nitric oxide synthase: a paradigm for pterin function involving a novel metal center. *Cell* 1998; 95: 939-950
58. Reed R. Initial splice-site recognition and pairing during pre-mRNA splicing. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 1996; 6: 215-220
59. Reed R. Mechanisms of fidelity in pre-mRNA splicing. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2000; 12: 340-345
60. Rodriguez-Crespo I, Gerber NC, Ortiz de Montellano PR. Endothelial nitric-oxide synthase. Expression in *Escherichia coli*, spectroscopic characterization, and role of tetrahydrobiopterin in dimer formation. *J. Biol. Chem.* 1996; 271: 11462-11467
61. Sessa WC, Harrison JK, Luthin DR, Pollock JS, Lynch KR. Genomic analysis and expression patterns reveal distinct genes for endothelial and brain nitric oxide synthase. *Hypertension* 1993; 21: 934-938
62. Silvagno F, Xia H, Bredt DS. Neuronal nitric-oxide synthase-mu, an alternatively spliced isoform expressed in differentiated skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* 1996; 271: 11204-11208
63. Smith CW und Valcarcel J. Alternative pre-mRNA splicing: the logic of combinatorial control. *Trends Biochem. Sci.* 2000; 25: 381-388
64. Stamm S. Signals and their transduction pathways regulating alternative splicing: a new dimension of the human genome. *Hum. Mol. Genet.* 2002; 11: 2409-2416
65. Stamm S, Ben Ari S, Rafalska I et al. Function of alternative splicing. *Gene* 2005; 344: 1-20
66. Stangl K, Cascorbi I, Laule M et al. High CA repeat numbers in intron 13 of the endothelial nitric oxide synthase gene and increased risk of coronary artery disease. *Pharmacogenetics* 2000; 10: 133-140

67. Stasiv Y, Kuzin B, Regulski M, Tully T, Enikolopov G. Regulation of multimers via truncated isoforms: a novel mechanism to control nitric-oxide signaling. *Genes Dev.* 2004; 18: 1812-1823
68. Stasiv Y, Regulski M, Kuzin B, Tully T, Enikolopov G. The *Drosophila* nitric-oxide synthase gene (dNOS) encodes a family of proteins that can modulate NOS activity by acting as dominant negative regulators. *J. Biol. Chem.* 2001; 276: 42241-42251
69. Stroes ES, Koomans HA, de Bruin TW, Rabelink TJ. Vascular function in the forearm of hypercholesterolaemic patients off and on lipid-lowering medication. *Lancet* 1995; 346: 467-471
70. Tiscornia AC, Cayota A, Landoni AI et al. Post-transcriptional regulation of inducible nitric oxide synthase in chronic lymphocytic leukemia B cells in pro- and antiapoptotic culture conditions. *Leukemia* 2004; 18: 48-56
71. Venables JP. Alternative splicing in the testes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2002; 12: 615-619
72. Venables JP. Unbalanced alternative splicing and its significance in cancer. *Bioessays* 2006; 28: 378-386
73. Venema RC, Ju H, Zou R, Ryan JW, Venema VJ. Subunit interactions of endothelial nitric-oxide synthase. Comparisons to the neuronal and inducible nitric-oxide synthase isoforms. *J. Biol. Chem.* 1997; 272: 1276-1282
74. Wang Y, Goligorsky MS, Lin M, Wilcox JN, Marsden PA. A novel, testis-specific mRNA transcript encoding an NH₂-terminal truncated nitric-oxide synthase. *J. Biol. Chem.* 1997; 272: 11392-11401
75. Williams SB, Cusco JA, Roddy MA, Johnstone MT, Creager MA. Impaired nitric oxide-mediated vasodilation in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J. Am. Coll. Cardiol.* 1996; 27: 567-574
76. Wu JY und Maniatis T. Specific interactions between proteins implicated in splice site selection and regulated alternative splicing. *Cell* 1993; 75: 1061-1070
77. Xu WM und Liu LZ. Nitric oxide: from a mysterious labile factor to the molecule of the Nobel Prize. Recent progress in nitric oxide research. *Cell Res.* 1998; 8: 251-258
78. Yoshizumi M, Perrella MA, Burnett JC, Jr., Lee ME. Tumor necrosis factor downregulates an endothelial nitric oxide synthase mRNA by shortening its half-life. *Circ. Res.* 1993; 73: 205-209
79. Zamore PD und Green MR. Identification, purification, and biochemical characterization of U2 small nuclear ribonucleoprotein auxiliary factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 1989; 86: 9243-9247

80. Ziche M und Morbidelli L. Nitric oxide and angiogenesis. *J. Neurooncol.* 2000; 50: 139-148

9 Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.

10 Publikationen

Lorenz M, Hewing B, Hui J, Zepp A, Baumann G, Bindereif A, Stangl V, Stangl K. **Alternative splicing in intron 13 of the human eNOS gene: a potential mechanism for regulating eNOS activity.** FASEB J. 2007; 21: 1556-1564

Hewing B und Stangl K. **Rational use of catecholamines and inotropes.** Pneumologie 2007; 61: 700-708

11 Danksagung

Für die freundliche Überlassung des Themas dieser Arbeit und die umfassende Betreuung möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. Karl Stangl bedanken.

Weiterhin danke ich Herrn Prof. Dr. Gert Baumann für die Möglichkeit der Forschung im molekularbiologischen Forschungslabor der Medizinischen Klinik und Poliklinik mit Schwerpunkt Kardiologie und Angiologie der Medizinischen Fakultät der Charité-Universitätsmedizin Berlin.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Mario Lorenz und Prof. Dr. Verena Stangl für die wissenschaftliche Betreuung und ihrem Interesse an dem Fortgang dieser Arbeit.

Darüber hinaus bedanke ich mich bei Angela Zepp, Minoos Moobed, Angelika Vietzke, Elena Follmann und Dr. Henryk Dreger, sowie den übrigen Mitarbeitern des kardiologischen Forschungslabors, die mir alle stets mit Rat und Tat zur Seite standen.

Ich bedanke mich bei meinen Eltern, die mir das Studium ermöglicht und mich immer in meinen Vorhaben bestärkt und unterstützt haben.

12 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass die hier vorliegende Arbeit von mir selbst ohne die Hilfe Dritter verfasst wurde, auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten darstellt und die verwendeten Hilfsmittel sowie die Literatur vollständig angegeben sind.

Berlin, den 19.09.2008

13 Anhang

13.1 Sequenz eNOS13A

1	ATGGGCAACT MetGlyAsnL	TGAAGAGCGT euLysSerVa	GGCCCAGGAG lAlaGlnGlu	CCTGGGCCAC ProGlyProP	CCTGCGGCCT roCysGlyLe	GGGGCTGGGG uGlyLeuGly
61	CTGGGCCTTG LeuGlyLeuG	GGCTGTGCGG lyLeuCysGl	CAAGCAGGGC yLysGlnGly	CCAGCCACCC ProAlaThrP	CGGCCCTGA roAlaProGl	GCCCAGCCGG uProSerArg
121	GCCCCAGCAT AlaProAlaS	CCCTACTCCC erLeuLeuPr	ACCAGCGCCA oProAlaPro	GAACACAGCC GluHisSerP	CCCCGAGCTC roProSerSe	CCCGTAACC rProLeuThr
181	CAGCCCCCAG GlnProProG	AGGGGCCCAA luGlyProLy	GTTCCCTCGT sPheProArg	GTGAAGAACT ValLysAsnT	GGGAGGTGGG rpGluValGl	GAGCATCACC ySerIleThr
241	TATGACACCC TyrAspThrL	TCAGCGCCCA euSerAlaGl	GGCGCAGCAG nAlaGlnGln	GATGGGCCCT AspGlyProC	GCACCCCAAG ysThrProAr	ACGTGCCTG gArgCysLeu
301	GGCTCCCTGG GlySerLeuV	TATTTCCACG alPheProAr	GAAACTACAG gLysLeuGln	GGCCGGCCCT GlyArgProS	CCCCGGCCC erProGlyPr	CCCGGCCCT oProAlaPro
361	GAGCAGCTGC GluGlnLeuL	TGAGTCAGGC euSerGlnAl	CCGGGACTTC aArgAspPhe	ATCAACCAGT IleAsnGlnT	ACTACAGCTC yrTyrSerSe	CATTAAGAGG rIleLysArg
421	AGCGGCTCCC SerGlySerG	AGGCCACGA lnAlaHisGl	ACAGCGGCTT uGlnArgLeu	CAAGAGGTGG GlnGluValG	AAGCCGAGGT luAlaGluVa	GGCAGCCACA lAlaAlaThr
481	GGCACCTACC GlyThrTyrG	AGCTTAGGGA lnLeuArgGl	GAGCGAGCTG uSerGluLeu	GTGTTTCGGG ValPheGlyA	CTAAGCAGGC laLysGlnAl	CTGGCGCAAC aTrpArgAsn
541	GCTCCCCGCT AlaProArgC	GCGTGGGCCG ysValGlyAr	GATCCAGTGG gIleGlnTrp	GGGAAGCTGC GlyLysLeuG	AGGTGTTCGA lnValPheAs	TGCCCGGGAC pAlaArgAsp
601	TGCAGGTCTG CysArgSerA	CACAGGAAAT laGlnGluMe	GTTACCTAC tPheThrTyr	ATCTGCAACC IleCysAsnH	ACATCAAGTA isIleLysTy	TGCCACCAAC rAlaThrAsn
661	CGGGGCAACC ArgGlyAsnL	TTCGCTCGGC euArgSerAl	CATCACAGTG aIleThrVal	TTCCCGCAGC PheProGlnA	GCTGCCCTGG rgCysProGl	CCGAGGAGAC yArgGlyAsp
721	TTCCGAATCT PheArgIleT	GGAACAGCCA rpAsnSerGl	GCTGGTGCGC nLeuValArg	TACGCGGGCT TyrAlaGlyT	ACCGGCAGCA yrArgGlnGl	GGACGGCTCT nAspGlySer
781	GTGCGGGGGG ValArgGlyA	ACCCAGCCAA spProAlaAs	CGTGGAGATC nValGluIle	ACCGAGCTCT ThrGluLeuC	GCATTCAGCA ysIleGlnHi	CGGCTGGACC sGlyTrpThr
841	CCAGGAAACG ProGlyAsnG	GTCGCTTCGA lyArgPheAs	CGTGTGCCC pValLeuPro	CTGCTGCTGC LeuLeuLeuG	AGGCCCCAGA lnAlaProAs	TGAGCCCCCA pGluProPro
901	GAACTCTTCC GluLeuPheL	TTCTGCCCCC euLeuProPr	CGAGCTGGTC oGluLeuVal	CTTGAGGTGC LeuGluValP	CCCTGGAGCA roLeuGluHi	CCCCACGCTG sProThrLeu
961	GAGTGGTTTG GluTrpPheA	CAGCCCTGGG laAlaLeuGl	CCTGCGCTGG yLeuArgTrp	TACGCCCTCC TyrAlaLeuP	CGGCAGTGTC roAlaValSe	CAACATGCTG rAsnMetLeu
1021	CTGGAAATTG LeuGluIleG	GGGGCCTGGA lyGlyLeuGl	GTTCCCCGCA uPheProAla	GCCCCCTTCA AlaProPheS	GTGGCTGGTA erGlyTrpTy	CATGAGCACT rMetSerThr
1081	GAGATCGGCA GluIleGlyT	CGAGGAACCT hrArgAsnLe	GTGTGACCTT uCysAspPro	CACCGCTACA HisArgTyrA	ACATCCTGGA snIleLeuGl	GGATGTGGCT uAspValAla
1141	GTCTGCATGG ValCysMetA	ACCTGGATAC spLeuAspTh	CCGGACCACC rArgThrThr	TCGTCCCTGT SerSerLeuT	GGAAAGACAA rpLysAspLy	GGCAGCAGTG sAlaAlaVal
1201	GAAATCAACG GluIleAsnV	TGGCCGTGCT alAlaValLe	GCACAGTTAC uHisSerTyr	CAGCTAGCCA GlnLeuAlaL	AAGTCACCAT ysValThrIl	CGTGGACCAC eValAspHis
1261	CACGCCGCCA HisAlaAlaT	CGGCCTCTTT hrAlaSerPh	CATGAAGCAC eMetLysHis	CTGGAGAATG LeuGluAsnG	AGCAGAAGGC luGlnLysAl	CAGGGGGGGC aArgGlyGly
1321	TGCCCTGCAG CysProAlaA	ACTGGGCCTG spTrpAlaTr	GATCGTGCCC pIleValPro	CCCATCTCGG ProIleSerG	GCAGCCTCAC lySerLeuTh	TCCTGTTTTC rProValPhe

1381 CATCAGGAGA TGGTCAACTA TTTCTGTGCC CCGGCCTTCC GCTACCAGCC AGACCCCTGG
 HisGlnGluM etValAsnTy rPheLeuSer ProAlaPheA rgTyrGlnPr oAspProTrp

1441 AAGGGGAGTG CCGCCAAGGG CACCGGCATC ACCAGGAAGA AGACCTTTAA AGAAGTGGCC
 LysGlySerA laAlaLysGl yThrGlyIle ThrArgLysL ysThrPheLy sGluValAla

1501 AACGCCGTGA AGATCTCCGC CTCGCTCATG GGCACGGTGA TGGCGAAGCG AGTGAAGGCG
 AsnAlaValL ysIleSerAl aSerLeuMet GlyThrValM etAlaLysAr gValLysAla

1561 ACAATCCTGT ATGGCTCCGA GACCGGCCGG GCCCAGAGCT ACGCACAGCA GCTGGGGAGA
 ThrIleLeuT yrGlySerGl uThrGlyArg AlaGlnSerT yrAlaGlnGl nLeuGlyArg

1621 CTCTTCCGGA AGGCTTTTGA TCCCCGGGTC CTGTGTATGG ATGAGTATGA CGTGGTGTCC
 LeuPheArgL ysAlaPheAs pProArgVal LeuCysMetA spGluTyrAs pValValSer

1681 CTCGAACACG AGACGCTGGT GCTGGTGGTA ACCAGCACAT TTGGGAATGG GGATCCCCCG
 LeuGluHisG luThrLeuVa lLeuValVal ThrSerThrP heGlyAsnGl yAspProPro

1741 GAGAATGGAG AGTCTGTCTC CCTGCCAGAA GTGTCTGTCA CCACAGAATA Gtttcgcctg
 GluAsnGlyG luSerValSe rLeuProGlu ValSerValT hrThrGlu**Stop**

1801 ctctagaacg gcacctagat ggaagcacgc agtggtgcgg cgtctcctgc ttaggctggt
 1861 tttgaggcgc actcgtggtg ctgcgtgact cagtatttca ctcattctgc tgctgagtg
 1921 cgttcattgt gtgaatatcc ccagtttggt taccattct cttggttggtg acacttgggc
 1981 tgtttccagg tcggggctat tatgaaataaa cctggtatga acattcttgt **Poly-A**

13.2 Sequenz eNOS13B

1	ATGGGCAACT MetGlyAsnL	TGAAGAGCGT euLysSerVa	GGCCCAGGAG lAlaGlnGlu	CCTGGGCCAC ProGlyProP	CCTGCGGCCT roCysGlyLe	GGGGCTGGGG uGlyLeuGly
61	CTGGGCCTTG LeuGlyLeuG	GGCTGTGCGG lyLeuCysGl	CAAGCAGGGC yLysGlnGly	CCAGCCACCC ProAlaThrP	CGGCCCTGA roAlaProGl	GCCCAGCCGG uProSerArg
121	GCCCCAGCAT AlaProAlaS	CCCTACTCCC erLeuLeuPr	ACCAGCGCCA oProAlaPro	GAACACAGCC GluHisSerP	CCCCGAGCTC roProSerSe	CCCGCTAACC rProLeuThr
181	CAGCCCCAG GlnProProG	AGGGGCCCAA luGlyProLy	GTTCCCTCGT sPheProArg	GTGAAGAACT ValLysAsnT	GGGAGGTGGG rpGluValGl	GAGCATCACC ySerIleThr
241	TATGACACCC TyrAspThrL	TCAGCGCCCA euSerAlaGl	GGCGCAGCAG nAlaGlnGln	GATGGGCCCT AspGlyProC	GCACCCCAAG ysThrProAr	ACGCTGCCTG gArgCysLeu
301	GGCTCCCTGG GlySerLeuV	TATTTCCACG alPheProAr	GAAACTACAG gLysLeuGln	GGCCGGCCCT GlyArgProS	CCCCCGGCC erProGlyPr	CCCGGCCCT oProAlaPro
361	GAGCAGCTGC GluGlnLeuL	TGAGTCAGGC euSerGlnAl	CCGGGACTTC aArgAspPhe	ATCAACCAGT IleAsnGlnT	ACTACAGCTC yrTyrSerSe	CATTAAGAGG rIleLysArg
421	AGCGGCTCCC SerGlySerG	AGGCCACGA lnAlaHisGl	ACAGCGGCTT uGlnArgLeu	CAAGAGGTGG GlnGluValG	AAGCCGAGGT luAlaGluVa	GGCAGCCACA lAlaAlaThr
481	GGCACCTACC GlyThrTyrG	AGCTTAGGGA lnLeuArgGl	GAGCGAGCTG uSerGluLeu	GTGTTGCGGG ValPheGlyA	CTAAGCAGGC laLysGlnAl	CTGGCGCAAC aTrpArgAsn
541	GCTCCCCGCT AlaProArgC	GCGTGGGCCG ysValGlyAr	GATCCAGTGG gIleGlnTrp	GGGAAGCTGC GlyLysLeuG	AGGTGTTTCA lnValPheAs	TGCCCGGGAC pAlaArgAsp
601	TGCAGGTCTG CysArgSerA	CACAGGAAAT laGlnGluMe	GTTCACTTAC tPheThrTyr	ATCTGCAACC IleCysAsnH	ACATCAAGTA isIleLysTy	TGCCACCAAC rAlaThrAsn
661	CGGGGCAACC ArgGlyAsnL	TTCGCTCGGC euArgSerAl	CATCACAGTG aIleThrVal	TTCCCGCAGC PheProGlnA	GCTGCCCTGG rgCysProGl	CCGAGGAGAC yArgGlyAsp
721	TTCCGAATCT PheArgIleT	GGAACAGCCA rpAsnSerGl	GCTGGTGCGC nLeuValArg	TACGCGGGCT TyrAlaGlyT	ACCGGCAGCA yrArgGlnGl	GGACGGCTCT nAspGlySer
781	GTGCGGGGG ValArgGlyA	ACCCAGCCAA spProAlaAs	CGTGGAGATC nValGluIle	ACCGAGCTCT ThrGluLeuC	GCATTCAGCA ysIleGlnHi	CGGCTGGACC sGlyTrpThr
841	CCAGGAAACG ProGlyAsnG	GTCGCTTCGA lyArgPheAs	CGTGCTGCCC pValLeuPro	CTGCTGCTGC LeuLeuLeuG	AGGCCCCAGA lnAlaProAs	TGAGCCCCCA pGluProPro
901	GAACTCTTCC GluLeuPheL	TTCTGCCCCC euLeuProPr	CGAGCTGGTC oGluLeuVal	CTTGAGGTGC LeuGluValP	CCCTGGAGCA roLeuGluHi	CCCCACGCTG sProThrLeu
961	GAGTGGTTTTG GluTrpPheA	CAGCCCTGGG laAlaLeuGl	CCTGCGCTGG yLeuArgTrp	TACGCCCTCC TyrAlaLeuP	CGGCAGTGTC roAlaValSe	CAACATGCTG rAsnMetLeu
1021	CTGGAAATTG LeuGluIleG	GGGGCCTGGA lyGlyLeuGl	GTTCCCCGCA uPheProAla	GCCCCCTTCA AlaProPheS	GTGGCTGGTA erGlyTrpTy	CATGAGCACT rMetSerThr
1081	GAGATCGGCA GluIleGlyT	CGAGGAACCT hrArgAsnLe	GTGTGACCCT uCysAspPro	CACCGCTACA HisArgTyrA	ACATCCTGGA snIleLeuGl	GGATGTGGCT uAspValAla
1141	GTCTGCATGG ValCysMetA	ACCTGGATAC spLeuAspTh	CCGGACCACC rArgThrThr	TCGTCCCTGT SerSerLeuT	GGAAAGACAA rpLysAspLy	GGCAGCAGTG sAlaAlaVal
1201	GAAATCAACG GluIleAsnV	TGGCCGTGCT alAlaValLe	GCACAGTTAC uHisSerTyr	CAGCTAGCCA GlnLeuAlaL	AAGTCACCAT ysValThrIl	CGTGGACCAC eValAspHis
1261	CACGCCGCCA HisAlaAlaT	CGGCCTCTTT hrAlaSerPh	CATGAAGCAC eMetLysHis	CTGGAGAATG LeuGluAsnG	AGCAGAAGGC luGlnLysAl	CAGGGGGGGC aArgGlyGly
1321	TGCCCTGCAG CysProAlaA	ACTGGGCCTG spTrpAlaTr	GATCGTGCCC pIleValPro	CCCATCTCGG ProIleSerG	GCAGCCTCAC lySerLeuTh	TCCTGTTTTTC rProValPhe
1381	CATCAGGAGA HisGlnGluM	TGGTCAACTA etValAsnTy	TTTCTGTGCC rPheLeuSer	CCGGCCTTCC ProAlaPheA	GCTACCAGCC rgTyrGlnPr	AGACCCCTGG oAspProTrp

1441	AAGGGGAGTG LysGlySerA	CCGCCAAGGG laAlaLysGl	CACCGGCATC yThrGlyIle	ACCAGGAAGA ThrArgLysL	AGACCTTTAA ysThrPheLy	AGAAGTGGCC sGluValAla
1501	AACGCCGTGA AsnAlaValL	AGATCTCCGC ysIleSerAl	CTCGCTCATG aSerLeuMet	GGCACGGTGA GlyThrValM	TGGCGAAGCG etAlaLysAr	AGTGAAGGCG gValLysAla
1561	ACAATCCTGT ThrIleLeuT	ATGGCTCCGA yrGlySerGl	GACCGGCCGG uThrGlyArg	GCCCAGAGCT AlaGlnSerT	ACGCACAGCA yrAlaGlnGl	GCTGGGGAGA nLeuGlyArg
1621	CTCTTCCGGA LeuPheArgL	AGGCTTTTGA ysAlaPheAs	TCCCCGGGTC pProArgVal	CTGTGTATGG LeuCysMetA	ATGAGTATGA spGluTyrAs	CGTGGTGTCC pValValSer
1681	CTCGAACACG LeuGluHisG	AGACGCTGGT luThrLeuVa	GCTGGTGGTA lLeuValVal	ACCAGCACAT ThrSerThrP	TTGGGAATGG heGlyAsnGl	GGATCCCCCG yAspProPro
1741	GAGAATGGAG GluAsnGlyG	AGAGATGGGG luArgTrpGl	TTTCGCCATG yPheAlaMet	TTGCCCAGGC LeuProArgL	TGGTCTCTAA euValSerAs	CTCCTGGGTT nSerTrpVal
1801	CAAGCAATCC <u>GlnAlaIleH</u>	ACCTGCCTCG isLeuProAr	GCCTCCCCAAA gProProLys	GTGCTGCGAT ValLeuArgL	TATAGacgtg <u>euStop</u>	agccactgca
1861	cctggccctc	agtatcttaa	gcaagttgga	atctcgtgaa	accctttttg	ctgccttagt
1921	gtccgtttca	gccctcattc	tgacctacct	tttcaagaaa	aatagcacca	gcaattgact
1981	tttttttagc	ataaaggtgt	atagacaccc	atataaccta	cagccttcac	aaggcatagc
2041	acattttcac	caccctggaa	agttccctca	tcagttcctc	acgtgaatcc	cttcccagtc
2101	tgtctccctg	ccagaagtgt	ctgtcaccac	agaatagttt	cgctgctct	agaacggcac
2161	ctagatggaa	gcacgcagtg	ttgcggcgtc	tctgctgag	gctgtttttg	aggcgactc
2221	gtgttgctgc	gtgactcagt	atttcaactca	ttctgctgct	gagtgccgtt	cattgtgtga
2281	atatccccag	tttgtttacc	cattctcttg	ttggtgacac	ttgggctggt	tccaggtcgg
2341	ggctattatg	<u>aataaa</u> cctg	ttatgaacat	tcttgt	Poly-A	

13.3 Sequenz eNOS13C

1	ATGGGCAACT MetGlyAsnL	TGAAGAGCGT euLysSerVa	GGCCCAGGAG lAlaGlnGlu	CCTGGGCCAC ProGlyProP	CCTGCGGCCT roCysGlyLe	GGGGCTGGGG uGlyLeuGly
61	CTGGGCCTTG LeuGlyLeuG	GGCTGTGCGG lyLeuCysGl	CAAGCAGGGC yLysGlnGly	CCAGCCACCC ProAlaThrP	CGGCCCTGA roAlaProGl	GCCCAGCCGG uProSerArg
121	GCCCCAGCAT AlaProAlaS	CCCTACTCCC erLeuLeuPr	ACCAGCGCCA oProAlaPro	GAACACAGCC GluHisSerP	CCCCGAGCTC roProSerSe	CCCGCTAACC rProLeuThr
181	CAGCCCCAG GlnProProG	AGGGGCCCAA luGlyProLy	GTTCCCTCGT sPheProArg	GTGAAGAACT ValLysAsnT	GGGAGGTGGG rpGluValGl	GAGCATCACC ySerIleThr
241	TATGACACCC TyrAspThrL	TCAGCGCCCA euSerAlaGl	GGCGCAGCAG nAlaGlnGln	GATGGGCCCT AspGlyProC	GCACCCCAAG ysThrProAr	ACGCTGCCTG gArgCysLeu
301	GGCTCCCTGG GlySerLeuV	TATTTCCACG alPheProAr	GAAACTACAG gLysLeuGln	GGCCGGCCCT GlyArgProS	CCCCCGGCC erProGlyPr	CCCGGCCCT oProAlaPro
361	GAGCAGCTGC GluGlnLeuL	TGAGTCAGGC euSerGlnAl	CCGGGACTTC aArgAspPhe	ATCAACCAGT IleAsnGlnT	ACTACAGCTC yrTyrSerSe	CATTAAGAGG rIleLysArg
421	AGCGGCTCCC SerGlySerG	AGGCCACGA lnAlaHisGl	ACAGCGGCTT uGlnArgLeu	CAAGAGGTGG GlnGluValG	AAGCCGAGGT luAlaGluVa	GGCAGCCACA lAlaAlaThr
481	GGCACCTACC GlyThrTyrG	AGCTTAGGGA lnLeuArgGl	GAGCGAGCTG uSerGluLeu	GTGTTGCGGG ValPheGlyA	CTAAGCAGGC laLysGlnAl	CTGGCGCAAC aTrpArgAsn
541	GCTCCCCGCT AlaProArgC	GCGTGGGCCG ysValGlyAr	GATCCAGTGG gIleGlnTrp	GGGAAGCTGC GlyLysLeuG	AGGTGTTTCA lnValPheAs	TGCCCGGGAC pAlaArgAsp
601	TGCAGGTCTG CysArgSerA	CACAGGAAAT laGlnGluMe	GTTCACTTAC tPheThrTyr	ATCTGCAACC IleCysAsnH	ACATCAAGTA isIleLysTy	TGCCACCAAC rAlaThrAsn
661	CGGGGCAACC ArgGlyAsnL	TTCGCTCGGC euArgSerAl	CATCACAGTG aIleThrVal	TTCCCGCAGC PheProGlnA	GCTGCCCTGG rgCysProGl	CCGAGGAGAC yArgGlyAsp
721	TTCCGAATCT PheArgIleT	GGAACAGCCA rpAsnSerGl	GCTGGTGCGC nLeuValArg	TACGCGGGCT TyrAlaGlyT	ACCGGCAGCA yrArgGlnGl	GGATGGCTCT nAspGlySer
781	GTGCGGGGG ValArgGlyA	ACCCAGCCAA spProAlaAs	CGTGGAGATC nValGluIle	ACCGAGCTCT ThrGluLeuC	GCATTCAGCA ysIleGlnHi	CGGCTGGACC sGlyTrpThr
841	CCAGGAAACG ProGlyAsnG	GTCGCTTCGA lyArgPheAs	CGTGCTGCCC pValLeuPro	CTGCTGCTGC LeuLeuLeuG	AGGCCCCAGA lnAlaProAs	TGATCCCCCA pAspProPro
901	GAACTCTTCC GluLeuPheL	TTCTGCCCCC euLeuProPr	CGAGCTGGTC oGluLeuVal	CTTGAGGTGC LeuGluValP	CCCTGGAGCA roLeuGluHi	CCCCACGCTG sProThrLeu
961	GAGTGGTTTTG GluTrpPheA	CAGCCCTGGG laAlaLeuGl	CCTGCGCTGG yLeuArgTrp	TACGCCCTCC TyrAlaLeuP	CGGCAGTGTC roAlaValSe	CAACATGCTG rAsnMetLeu
1021	CTGGAAATTG LeuGluIleG	GGGGCCTGGA lyGlyLeuGl	GTTCCCCGCA uPheProAla	GCCCCCTTCA AlaProPheS	GTGGCTGGTA erGlyTrpTy	CATGAGCACT rMetSerThr
1081	GAGATCGGCA GluIleGlyT	CGAGGAACCT hrArgAsnLe	GTGTGACCCT uCysAspPro	CACCGCTACA HisArgTyrA	ACATCCTGGA snIleLeuGl	GGATGTGGCT uAspValAla
1141	GTCTGCATGG ValCysMetA	ACCTGGATAC spLeuAspTh	CCGGACCACC rArgThrThr	TCGTCCCTGT SerSerLeuT	GGAAAGACAA rpLysAspLy	GGCAGCAGTG sAlaAlaVal
1201	GAAATCAACG GluIleAsnV	TGGCCGTGCT alAlaValLe	GCACAGTTAC uHisSerTyr	CAGCTAGCCA GlnLeuAlaL	AAGTCACCAT ysValThrIl	CGTGGACCAC eValAspHis
1261	CACGCCGCCA HisAlaAlaT	CGGCCTCTTT hrAlaSerPh	CATGAAGCAC eMetLysHis	CTGGAGAATG LeuGluAsnG	AGCAGAAGGC luGlnLysAl	CAGGGGGGGC aArgGlyGly
1321	TGCCCTGCAG CysProAlaA	ACTGGGCCTG spTrpAlaTr	GATCGTGCCC pIleValPro	CCCATCTCGG ProIleSerG	GCAGCCTCAC lySerLeuTh	TCCTGTTTTTC rProValPhe
1381	CATCAGGAGA HisGlnGluM	TGGTCAACTA etValAsnTy	TTTCTGTGCC rPheLeuSer	CCGGCCTTCC ProAlaPheA	GCTACCAGCC rgTyrGlnPr	AGACCCCTGG oAspProTrp

1441	AAGGGGAGTG LysGlySerA	CCGCCAAGGG laAlaLysGl	CACCGGCATC yThrGlyIle	ACCAGGAAGA ThrArgLysL	AGACCTTTAA ysThrPheLy	AGAAGTGGCC sGluValAla
1501	AACGCCGTGA AsnAlaValL	AGATCTCCGC ysIleSerAl	CTCGCTCATG aSerLeuMet	GGCACGGTGA GlyThrValM	TGGCGAAGCG etAlaLysAr	AGTGAAGGCG gValLysAla
1561	ACAATCCTGT ThrIleLeuT	ATGGCTCCGA yrGlySerGl	GACCGGCCGG uThrGlyArg	GCCCAGAGCT AlaGlnSerT	ACGCACAGCA yrAlaGlnGl	GCTGGGGAGA nLeuGlyArg
1621	CTCTTCCGGA LeuPheArgL	AGGCTTTTGA ysAlaPheAs	TCCCCGGGTC pProArgVal	CTGTGTATGG LeuCysMetA	ATGAGTATGA spGluTyrAs	CGTGGTGTCC pValValSer
1681	CTCGAACACG euGluHisG	AGACGCTGGT luThrLeuVa	GCTGGTGGTA lLeuValVal	ACCAGCACAT ThrSerThrP	TTGGGAATGG heGlyAsnGl	GGATCCCCCG yAspProPro
1741	GAGAATGGAG GluAsnGlyG	AGGGTCTCAC luGlyLeuTh	TTTGTGGCCC rLeuTrpPro	AGGCTGGAGT ArgLeuGluC	GCAGTAGTAC ysSerSerTh	AATCACGGCT rIleThrAla
1801	CACTGCAGCC <u>HisCysSerL</u>	TCAACCTCCT euAsnLeuLe	AGACTCAAGC uAspSerSer	AATCCTCCCA AsnProProT	CTTCAACCTC hrSerThrSe	CCAAGTAGTT rGlnValVal
1861	GGGACTACAG GlyThrThrG	GCGCATGCCA lyAlaCysHi	TGATGCCTAG sAspAla Stop	ctaatttttg	tattttttat	agagatgggg
1921	tttcgccatg	ttgcccaggc	tggtctctaa	ctcctggggt	caagcaatcc	acctgcctcg
1981	gcctcccaaa	gtgctgcat	tatagacgtg	agccactgca	cctggccctc	agtatcttaa
2041	gcaagttgga	atctcgtgaa	accctttttg	ctgccttagt	gtccgtttca	gccctcattc
2101	tgacctacct	tttcaagaaa	aatagcacca	gcaattgact	tttttttagc	ataaagggtg
2161	atagacaccc	atataaccta	cagccttcac	aaggcatagc	acattttcac	caccctggaa
2221	agttccctca	tcagttcctc	acgtgaatcc	cttcccagtc	tgtctccctg	ccagaagtgt
2281	ctgtcaccac	agaatagttt	cgctgctct	agaacggcac	ctagatggaa	gcacgcagtg
2341	ttgcggcgtc	tctgctgag	gctgtttttg	aggcgcactc	gtgttgctgc	gtgactcagt
2401	atctcactca	ttctgctgct	gagtgccgtt	cattgtgtga	atatccccag	tttgtttacc
2461	cattctcttg	ttggtgacac	ttgggctggt	tccaggtcgg	ggctattatg	<u>aataaa</u> cctg
2521	ctatgaacat	tcttgt	Poly-A			

Legende:

ATGGGC.....	= Nukleotide
LysGlySer....	= Aminosäuren im 3-Buchstaben-Code
_____	= alternatives Exon
Stop	= Stopcodon
Kleinbuchstaben	= 3'-untranslatierte Region
<u>aataaa</u>	= Polyadenylierungssignal
Poly-A	= Poly-A-Schwanz
T	= Single Nukleotid Polymorphismus im Exon 6 und Exon 7 von eNOS13C

Die Zahlen am linken Rand geben die Basenposition in den entsprechenden cDNAs an.