

**Untersuchungen zur Bedeutung von NOSTRIN in der
Leberzirrhose und Charakterisierung einer neuen
NOSTRIN-Isoform**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

Vorgelegt beim Fachbereich für
Biochemie, Chemie und Pharmazie
der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main

von
Anja Wiesenthal
aus Detmold

Frankfurt, Mai 2007

Vom Fachbereich für Biochemie, Chemie und Pharmazie der Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. Harald Schwalbe

Gutachter: Prof. Dr. Bernd Ludwig
Prof. Dr. Werner Müller-Esterl

Datum der Disputation:

Danksagung

Auf der letzten Seite dieser Arbeit habe ich an Eides statt versichert, sämtliche verwendeten Hilfsmittel angegeben und die Arbeit eigenständig verfasst zu haben. Vom wissenschaftlichen Standpunkt aus stimmt dies auch: Gewissenhaft sind alle Hilfsmittel aufgeführt, alle Arbeitsschritte sind von mir durchgeführt worden - nüchtern und nachvollziehbar dargestellt.

Doch zum Beenden einer Doktorarbeit bedarf es auch anderer „Hilfsmittel“. Diese Seite möchte ich nun dazu nutzen, auch diese aufzuführen und all denjenigen zu danken, die mich die letzten Jahre begleitet und diesen Abschluss erst ermöglicht haben.

Für die Bereitschaft zur externen Betreuung danke ich ganz herzlich Prof. Dr. Bernd Ludwig, Prof. Dr. Werner Müller-Esterl gilt mein Dank für die freundliche Aufnahme in seinen Arbeitskreis. Meine Ausbildung hat sehr von der guten Ausstattung und dem internationalen Flair des Institutes profitiert.

Des weiteren danke ich „meinen“ drei Post-Docs: Kirstin Schilling und Ann Siehoff waren nicht nur bei fachlichen Fragen eine wichtige Stütze, sondern brachten auch für das Leben außerhalb des Labors viel Verständnis auf. Masood Siddique hat zwar nicht mehr als Betreuer für mich fungiert, aber diese Arbeit ist aufgrund seines kritischen Blicks noch einmal um einiges verbessert worden, er ist eine echte Bereicherung für das gesamte Projekt. Des weiteren danke ich allen Mitarbeitern aus Labor 10, besonders Simone Schaubek für die experimentelle Unterstützung während meiner Schreibphase, sowie Stefanie Oess für Zuhören, Diskutieren und Verständnis. Allen nicht erwähnten ein Danke für das gute Klima im Labor: Hilfsbereitschaft, Diskussionsbereitschaft und auch mal abwägend zu philosophieren helfen einem doch über so manchen experimentellen Rückschlag hinweg. Albert Smolenski und Meike Hoffmeister ein dickes Danke für die Unterstützung bei meinen experimentellen „Exkursionen“, die leider nicht in diese Arbeit aufgenommen werden konnten. Ein großes Danke möchte ich auch unseren Kooperationspartnern aus London sagen, ohne Rajeshwar P. Mookerjee und Rajiv Jalan wäre das „Leber-Paper“ nicht zustande gekommen. Für die Einarbeitung in den EMSA danke ich Jörg Leupold, und Peer Heine für die Hilfe bei den (nicht aufgeführten) *in situ*-Versuchen.

Und auch wenn sie nun zuletzt genannt werden, war die Unterstützung und das Verständnis meiner Familie sowie meiner Freunde sehr wichtig für mich. Ich denke hier nicht mehr sagen zu müssen als: ohne Euch hätte ich den Weg bis hier nicht geschafft!

1	Zusammenfassung	1
2	Summary	2
3	Einleitung	3
3.1	Die endotheliale NO-Synthase (eNOS).....	3
3.2	Caveolae	5
3.3	NOSTRIN (eNOS traffic inducer)	7
3.3.1	NOSTRIN gehört zur PCH-Familie.....	8
3.3.2	NOSTRIN als Schlüssel-Adapter im caveolären Transport der eNOS.....	10
3.3.3	NOSTRIN β – ein alternatives Spleißprodukt	11
3.3.4	Alternatives Spleißen und der <i>nonsense-mediated-mRNA-decay</i>	12
3.4	Zirrhose	14
3.4.1	Retinsäure.....	15
4	Zielsetzung	16
5	Material und Methoden	17
5.1	Verwendete Geräte	17
5.2	Verbrauchsmaterialien	17
5.3	Chemikalien und spezielle Reagenzien.....	18
5.4	Enzyme und Kits	19
5.5	Reagenzien für die Real-Time PCR.....	19
5.6	Antikörper	20
5.7	Vektoren.....	21
5.8	Bakterienstämme und Zelllinien	21
5.9	Agarose-Gelelektrophorese.....	21
5.10	Klonierungen.....	22
5.11	Zellkultur.....	26
5.12	Transfektion von eukaryotischen Zellen	26
5.13	Immunblotting.....	27
5.14	Proteinaufreinigung.....	28
5.15	GST-Pulldown aus Zelllysat	28
5.16	Coimmunpräzipitation aus Lebergewebe.....	29
5.17	Immunfluoreszenzmikroskopie.....	29
5.18	HE-Färbung von Kryoschnitten	30
5.19	Immunhistochemie-Färbung von Lebergewebe.....	30

5.20	real-time-PCR: Das Taqman-Prinzip	31
5.21	Electromobility Shift Assay (EMSA)	35
6	Ergebnisse	37
6.1	NOSTRIN in zirrhotischer Leber	37
6.1.1	NOSTRIN α interagiert mit eNOS und Caveolin-1 in Leber	37
6.1.2	NOSTRIN ist innerhalb der Leber in vaskulärem Endothel und Hepatozyten exprimiert	38
6.1.3	Etablierung der qRT-PCR	39
6.1.4	Die Expression der NOSTRIN-Isoformen ist in krankhaftem Gewebe erhöht	41
6.2	Charakterisierung von NOSTRIN β	43
6.2.1	Stimulation der Expression von NOSTRIN α und NOSTRIN β	43
6.2.2	Bestätigung der Immunoblot-Daten mittels qRT-PCR	44
6.2.3	NOSTRIN β ist kein Produkt fehlerhaften Spleißens	45
6.2.4	NOSTRIN β ist hauptsächlich im Zellkern lokalisiert.....	47
6.2.5	NLS-Motive bestimmen die Kernlokalisation von NOSTRIN β	48
6.2.6	Die NLS-Motive sind funktional voneinander unabhängig	51
6.2.7	NLS-Transfer zeigt allgemeine Funktionalität der NLS-Motive	51
6.2.8	NOSTRIN β hat ein Crm-1-abhängiges NES-Motiv	52
6.2.9	Die Funktion von NOSTRIN β im Zellkern	54
7	Diskussion.....	58
7.1	Alternatives Spleißen in der PCH-Familie.....	58
7.2	Die Stimulation durch Retinsäure	59
7.3	Die intrazelluläre Lokalisation der NOSTRIN-Varianten	59
7.4	Funktionen von NOSTRIN β	60
7.5	NOSTRIN: Ein Marker für portale Hypertonie?.....	62
7.6	Ausblick	63
8	Literaturverzeichnis	65
9	Abkürzungsverzeichnis.....	73
10	Lebenslauf	75
11	Veröffentlichungen.....	76
11.1	Publikationen.....	76
11.2	Vorträge / Präsentationen	76
12	Eidesstattliche Erklärung.....	77

1 Zusammenfassung

Die endotheliale NO-Synthase (eNOS) ist im kardiovaskulären System der Hauptproduzent von Stickstoffmonoxid (NO). Studien deuten auf eine Beteiligung der eNOS im Krankheitsverlauf einer Leberzirrhose hin; zirrhotische Tiere zeigen eine reduzierte hepatische eNOS-Aktivität bei unveränderten Proteinmengen. Die reduzierte NO-Menge trägt zu einer Erhöhung des intrahepatischen Widerstandes und einer portalen Hypertonie bei. Inhibitoren und posttranslationale Modifikationen der eNOS wurden als auslösende Faktoren postuliert, aber auch am intrazellulären Transport der eNOS beteiligte Proteine könnten eine wichtige Rolle spielen.

Ein solches ist das neue Protein NOSTRIN (*“eNOS traffic inducer”*), das über seine C-terminale SH3-Domäne an eNOS bindet und durch seine N-terminale FCH Domäne an Membranen assoziiert. In vorhergegangenen Studien wurde nur ein translatiertes Protein identifiziert, bezeichnet als NOSTRIN α . In der vorliegenden Arbeit habe ich eine verkürzte Isoform entdeckt (NOSTRIN β), die aus einem alternativen Spleißvorgang hervorgeht. Ihr fehlt fast die gesamte FCH Domäne, wodurch keine Membranbindung mehr stattfindet. Diese Isoform konnte nur in pathogenem Lebergewebe nachgewiesen werden. Untersuchungen mittels Western Blotting und qRT-PCR mit Proben aus Patienten mit Zirrhose, alkoholischer Hepatitis oder von gesunden Personen, zeigten eine deutliche Erhöhung der Expression beider NOSTRIN-Isoformen von gesundem zu zirrhotischem Gewebe. NOSTRIN α mRNA-Mengen waren in zirrhotischen vs. gesunden Proben verdoppelt, und in Proben aus Patienten mit zusätzlicher Hepatitis verdreifacht. Dies deutet darauf hin, dass erhöhte Mengen von NOSTRIN α zu einer Internalisierung und Inaktivierung der eNOS führen könnten.

NOSTRIN α und NOSTRIN β wurden ebenfalls in Hep3B-Zellen auf Protein und mRNA-Ebene nachgewiesen, ihre Expression war durch Retinsäure zeit- und dosisabhängig stimulierbar. NOSTRIN α lokalisiert an Plasmamembran und vesikulären Strukturen, NOSTRIN β hingegen hauptsächlich im Zellkern, eine geringe Fraktion im Zytosol. Über Kartierungsstudien wurden zwei *nuclear leading sequences* (NLS) identifiziert, die den Transport in den Zellkern vermitteln, sowie eine Crm-1-abhängige *nuclear export sequence* (NES). Im EMSA konnte die Bindung von NOSTRIN β an die Promotorregion des NOSTRIN-Gens gezeigt werden. Diese Ergebnisse legen eine Funktion von NOSTRIN β als Transkriptionsfaktor nahe, evtl. innerhalb einer negativen Rückkopplung auf die NOSTRIN α -Expression. Weiterführende Studien sollen diesen potentiellen molekularen Mechanismus im Detail klären.

2 Summary

Endothelial nitric oxide synthase (eNOS) is the major NO-producing (nitric oxide) enzyme in the cardiovascular system that contributes to vascular homeostasis. Accumulating evidence suggests a pathogenetic role for eNOS in the development of liver cirrhosis. Cirrhotic animals display reduced enzymatic activity of eNOS though its protein level is unchanged. The reduction in hepatic NO generation contributes to increased intrahepatic resistance and elevated portal pressure. Inhibitors and post-translational modifications of eNOS have been postulated as pathogenetic factors, however proteins regulating the intracellular trafficking of eNOS may also play a crucial role.

One such protein termed NOSTRIN (for eNOS traffic-inducer) is a novel multi-domain protein that binds to eNOS via its C-terminal SH3 domain and attaches to membranes through its N-terminal FCH domain. Previous work have only identified the full-size form of NOSTRIN (referred to as NOSTRIN α). In the present work, I have identified a truncated isoform of NOSTRIN (dubbed NOSTRIN β), which results from alternative splicing and lacks the most of the FCH domain and therefore does not attach to membranes. This isoform is only present in diseased liver tissues. Expression levels of NOSTRIN α and NOSTRIN β analyzed by Western Blotting and qRT-PCR in liver samples of patients with severe cirrhosis, alcoholic hepatitis or healthy liver revealed that both NOSTRIN isoforms are upregulated in cirrhotic as compared to normal liver. NOSTRIN α mRNA levels were doubled in cirrhotic vs. normal samples, and three times as high in samples from patients with additional hepatitis, suggesting that increased levels of NOSTRIN α may promote eNOS internalization and inactivation.

NOSTRIN α and NOSTRIN β were also present in immortalized Hep3B cells both on mRNA and protein level, and their expression was stimulated in a time- and dose-dependent manner by retinoic acid. NOSTRIN α was found at the plasma membrane and at vesicular structures, whereas overexpressed NOSTRIN β mainly localized to the nucleus and only a minor fraction was present in the cytosol. Mapping studies identified two nuclear localization sequences (NLS) that target NOSTRIN β to the nucleus, whereas a unique Crm-1-dependent nuclear export sequence (NES) mediates nuclear export. EMSA revealed that NOSTRIN β may bind to the NOSTRIN gene promotor region, indicating that the truncated NOSTRIN β isoform may serve as a transcription factor which silences NOSTRIN α expression in a negative feedback mechanism. Ongoing studies aim at dissecting these putative mechanism in molecular detail.

3 Einleitung

3.1 Die endotheliale NO-Synthase (eNOS)

Mit ihrem Vorkommen in Endothelzellen, Kardiomyozyten und Thrombozyten spielt die eNOS im kardiovaskulären System eine zentrale Rolle. Hier dient das von ihr gebildete Stickstoffmonoxid (NO) nicht nur als Vasodilatator, sondern verhindert ebenfalls die Leukozytenadhäsion an der Gefäßwand, Thrombozytenaggregation sowie die Proliferation der glatten Muskelzellen. Die Aktivierung der eNOS kann durch Agonisten wie z.B. Bradykinin, Acetylcholin oder auch durch physikalische Stimulation wie die Scherkraft des Blutstroms erfolgen. Pathologische Auswirkungen einer veränderten eNOS-Aktivität oder der Bioverfügbarkeit von NO werden mit Bluthochdruck, Arteriosklerose, Herzinsuffizienz oder auch verminderter Wundheilung in Verbindung gebracht¹⁻³. NO spielt somit im Endothel eine protektive, anti-atherogene Rolle. Darüber hinaus wird die Umbildung von Blutgefäßen sowie die Gefäßneubildung (Angiogenese) durch VEGF-stimulierte NO-Synthese induziert^{4,5}.

Die aktive Form der eNOS besteht aus zwei antiparallel angeordneten identischen Untereinheiten von je 130 kDa, die eine N-terminale Oxygenase- und C-terminale Reduktasedomäne besitzen (Abb. I-A). Der Elektronentransfer erfolgt von NADPH über die gebundenen Cofaktoren FAD und FMN der Reduktasedomäne zur Hämgruppe der Oxygenasedomäne. Dort erfolgt dann die Biosynthese von NO in einer zweistufigen Oxidation ausgehend von L-Arginin über N^G-hydroxy-L-Arginin zu den Produkten L-Citrullin und NO unter Verbrauch von molekularem Sauerstoff⁶ (Abb. I-B). Hinsichtlich ihrer Aktivität und ihrer subzellulären Lokalisation unterliegt eNOS einer strengen Regulation. Zwischen der Reduktase- und der Oxidasedomäne befindet sich eine Bindungsstelle für Ca²⁺-aktiviertem Calmodulin (Ca²⁺/CaM). Erst wenn diese Bindungsstelle besetzt ist, tritt eine Konformationsänderung der eNOS ein, die den Elektronentransport ermöglicht⁶. Die Konformationsänderung aufgrund der Bindung von Ca²⁺/CaM wird unter anderem durch Bradykinin ausgelöst, indem es eine Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration in seiner Zielzelle bewirkt. Darüber hinaus gibt es Regulationsmechanismen wie Phosphorylierung, Acylierung sowie zahlreiche Protein-Protein-Interaktionen⁷⁻⁹, die zur Feinregulation der eNOS-Aktivität und -Lokalisation beitragen. Die durch Scherkraft oder VEGF verursachte Stimulation ist auf eine Phosphorylierung an Ser1177 der eNOS

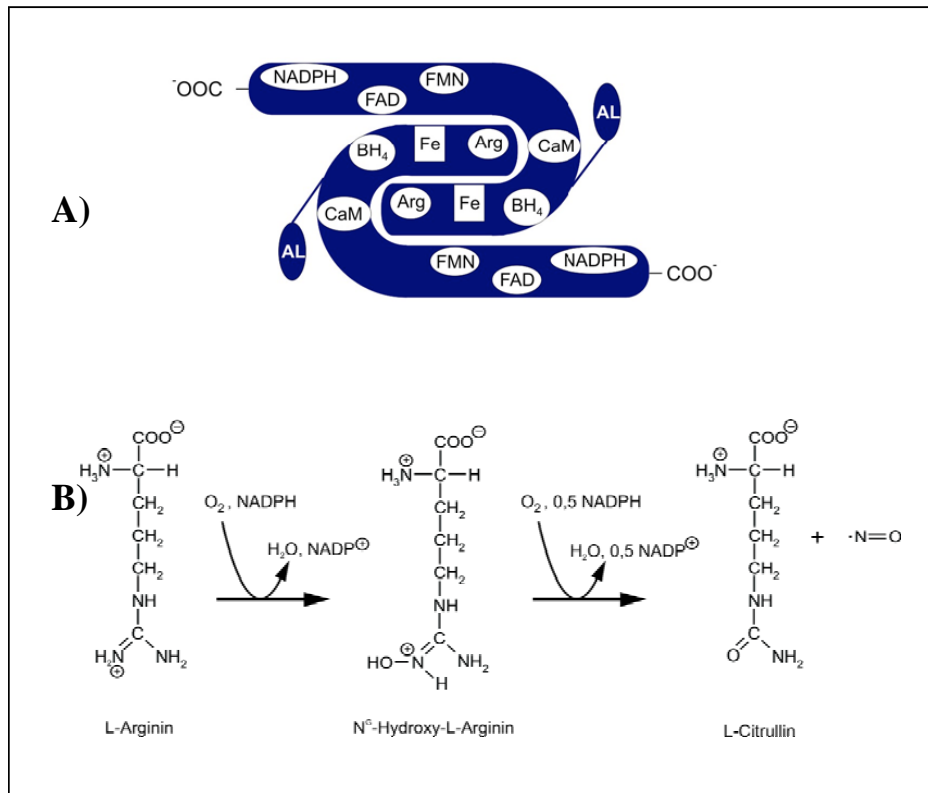


Abbildung I: Struktureller Aufbau der eNOS und die NOS-katalysierte Biosynthese von NO

(A) Schematische Darstellung des eNOS-Dimers mit seinen Cofaktoren. AL, autoinhibitorischer Loop; Arg, Arginin; BH₄, Tetrahydrobiopterin; CaM, Calcium/Calmodulin-Bindungsstelle; FAD, Flavinadeninucleotid; FMN, Flavinmononucleotid; NADPH, Nicotinamidadeninucleotidphosphat. (B) Die Biosynthese von NO in einer zweistufigen Oxidation: Im ersten Schritt erfolgt unter Verbrauch von molekularem Sauerstoff die Hydroxylierung von L-Arginin zum Intermediat NG-Hydroxyl-L-Arginin, das im zweiten Schritt durch einen 1-Elektronenübergang von NADPH zu L-Citrullin oxidiert wird und NO abgibt.

zurückzuführen. Hierfür verantwortlich sind die Proteinkinase B^{10, 11}, Proteinkinase A¹², Proteinkinase G¹³ sowie cAMP-abhängige Kinasen¹⁴. Diese Phosphorylierung sorgt für eine Aktivierung der eNOS, selbst wenn die Kalziumkonzentration in der Zelle niedrig ist^{10, 11}. Dagegen führt die Phosphorylierung an Thr495 der eNOS durch die Proteinkinase C^{12, 15} oder auch AMP-abhängigen Kinasen¹⁴ zu einer Inhibition der eNOS.

Neben der Modifikation durch Phosphorylierung wird eNOS sowohl posttranslational myristyliert als auch an zwei Cysteinresten reversibel palmyliert. Wie Studien an acylierungsdefizienten Mutanten zeigen, dient die Acetylierung der korrekten Platzierung der eNOS am Golgi-Apparat sowie an spezialisierten Plasmamembrankompartimenten, den Caveolae^{16, 17} (siehe Abschnitt 3.2), in welchen viele der für die eNOS-Aktivierung wichtigen Protein-Protein-Interaktionen stattfinden. 1997 wurde von Thomas Michel ein Modell vorgeschlagen, in dem ein Aktivierungs-Deaktivierungs-Zyklus von eNOS beschrieben

wurde¹⁸⁻²⁰. In diesem Modell ist eNOS durch die Bindung von Caveolin-1 an den Caveolae der Plasmamembran in inaktiver Form lokalisiert, dabei ist das Enzym 3-fach acyliert sowie an Thr495 phosphoryliert. Nach Stimulation und intrazellulärer Erhöhung der Kalziumkonzentration verdrängt der Ca^{2+} /CaM-Komplex Caveolin-1 kompetitiv und führt damit zu einer Aktivierung der eNOS. In Abhängigkeit vom Stimulus kann nun eine Depalmytylierung, eine Dephosphorylierung von Thr495 und / oder eine Phosphorylierung an Ser1177 erfolgen. Hier wirkt das Chaperon Hsp90 als allosterischer Aktivator, indem es eine Konformationsveränderung von eNOS induziert und somit eine Interaktion mit der Proteinkinase B erleichtert²¹. Durch diese posttranslationalen Modifikationen wird eine Translokation der eNOS von der Plasmamembran zu intrazelluläre Kompartimenten wie dem Golgi-Apparat oder dem Endoplasmatischen Retikulum ausgelöst. Hier werden die erfolgten Modifikationen wieder rückgängig gemacht, und eNOS kann in Vollendung des Zyklus wieder an die Plasmamembran zurückkehren. Es häufen sich die Hinweise darauf, dass es sich hierbei nicht einfach um einen Recycling-Prozess handelt, sondern dass das *targeting* von eNOS an bestimmte intrazellulären Kompartimente notwendig ist, damit eine spezifische NO-Wirkung erfolgen kann. Wie genau die Translokation der eNOS von der Plasmamembran zu intrazellulären Kompartimenten wie dem Golgi-Apparat oder dem Endoplasmatischen Retikulum gesteuert ist, oder welche Proteine einen Einfluss hierauf haben könnten, war bislang noch nicht bekannt.

Als neue Interaktionspartner der eNOS, die einen Einfluss auf das *targeting* der eNOS haben, wurden NOSIP (*eNOS interacting protein*)²² und NOSTRIN²³ in unserem Labor entdeckt. NOSIP verursacht nach Überexpression eine charakteristische Umverteilung der eNOS von der Plasmamembran zum Golgi-Apparat, NOSTRIN hingegen bewirkt eine Translokation an intrazelluläre vesikelartige Strukturen wobei gleichzeitig die eNOS-Aktivität signifikant inhibiert wird.

3.2 Caveolae

Man ging lange davon aus, dass Membranproteine lateral frei beweglich sind und sich gleichmäßig in der Plasmamembran verteilen²⁴. Heute gilt als gesichert, dass Lipidansammlungen (sogenannte *lipid rafts*) mit einer Größe von ca. 70 nm transiente, laterale Ansammlungen aus Glycosphingolipiden und Cholesterin mit GPI-verankerten (Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol) Proteinen darstellen, die aufgrund der biophysikalischen und

chemischen Eigenschaften der beteiligten Moleküle zustande kommen^{25, 26}. Caveolae stellen als kleine, flaschenförmige Einstülpungen in der Zellmembran eine Spezialform der „*lipid rafts*“ dar^{27, 28}. In den im *trans*-Golgi-Netzwerk (TGN) gebildeten Lipidkern der Caveolae aus Glycosphingolipiden, Sphingomyelin und Cholesterin werden GPI-Proteine und Caveolin-1 aus dem ER eingebaut^{29, 30}. Diese caveolären Strukturen gelangen in Form von Vesikeln zur Zelloberfläche³¹. Man geht davon aus, dass Caveolae ein eigenständiges endozytotisches und exozytotisches Kompartiment an der Oberfläche der meisten Zellen bilden und fähig sind, Moleküle aufzunehmen und an ihre Zielorte in der Zelle zu bringen oder in den extrazellulären Raum abzugeben²⁶. Moleküle, die durch Caveolae aufgenommen werden, gelangen von der Zelloberfläche entweder ins Zytoplasma, ins ER, auf die andere Zellseite (Transcytose) oder in das aus Caveolae gebildete tubuläre/vesikuläre Kompartiment³². Caveolae erfüllen daher in der Zelle eine Vielzahl von Funktionen, eine der wichtigsten ist der intrazelluläre Cholesterin-Transport, der durch Caveolin-1 vermittelt wird^{33, 34}.

Caveoline sind die strukturgebenden Proteine der Caveolae. Caveolin-1, Caveolin-2 und Caveolin-3 sind strukturell und funktionell vom Wurm (*Caenorhabditis elegans*) bis zum Menschen stark konserviert³⁵. Zwei Isoformen von Caveolin-1 (Cav-1 α und Cav-1 β) werden durch alternative Initiation bei der Translation gebildet³⁶. In Adipozyten, Endothelzellen und fibroblastischen Zelltypen werden hauptsächlich Caveolin-1 und -2 gefunden³⁷, während die Caveolin-3-Expression spezifisch in Muskelzellen stattfindet³⁸.

Caveoline bilden Homo- und Heterooligomere^{37, 39-41}, welche Protein-Protein- (z. B. mit Cholesterin³⁴) und Protein-Lipid-Interaktionen mit Glykosphingolipiden⁴² in Caveolae ausbilden.

Caveolin-1 hat eine ungewöhnliche Topologie: Eine zentrale, hydrophobe Domäne (AS 102-134) bildet eine Haarnadel-ähnliche Struktur in der Membran⁴³, so dass sowohl die N-terminale Domäne (AS 1-101) als auch die C-terminale Domäne (AS 135-178) auf der cytoplasmatischen Seite liegen³⁶. Innerhalb der N-terminalen Domäne sorgt ein 40 AS-Segment für die Homooligomerisierung⁴⁴, während in der C-terminalen Domäne 44 AS als Brücke zwischen diesen Homooligomeren dienen⁴¹. Für die Lokalisation von Caveolin-1 innerhalb der Caveolae ist eine Palmylierung an drei Cysteinresten im C-Terminus (Position 133, 143 und 156) notwendig^{16, 17}.

Caveolin-1 enthält als wichtiges Merkmal eine sogenannte *scaffolding*-Domäne (AS 82-101)⁴⁵, der zwei Aufgaben zugeschrieben werden: Die Bildung von Caveolin-Homooligomeren sowie die Vermittlung der Bindung zwischen Caveolin und

Signalmolekülen wie Src-Kinasen, eNOS, dem EGF-Rezeptor, dem PDGF-Rezeptor, Phospholipase $C\gamma$, PKC α , PKC β , Ras, trimere G-Proteine sowie einigen MAP-Kinasen.

Im Fall der eNOS hat die Interaktion mit Caveolin-1 einen inhibitorischen Effekt⁴⁶. Der Phänotyp von Caveolin-1-*knock-out* Mäusen betrifft sogar hauptsächlich die NO-Signalwege. Die NO-Freisetzung aus Caveolin-1-defizienten Zellen ist im Vergleich zu normalen Zellen erhöht, daher auch die durch NO-vermittelten sekundären Effekte. Dieser Phänotyp lässt auf eine Aktivierung der eNOS aufgrund ausbleibender Inhibition schließen⁴⁷.

3.3 NOSTRIN (eNOS traffic inducer)

NOSTRIN wurde vor einigen Jahren in unserer Arbeitsgruppe als neuer Interaktionspartner der eNOS gefunden. NOSTRIN ist von *C. elegans* bis zum Menschen gut konserviert und kommt vor allem in stark vaskularisierten Geweben (Herz, Lunge, Niere, Plazenta, Leber) aber auch in sekretierenden Geweben, wie z.B. Dünndarm und Speicheldrüse, vor⁴⁸. Ferner wurde endogenes NOSTRIN sowohl in Endothelzellen von Blutgefäßen als auch in primären Zellkulturen von mikrovaskulären Endothelzellen (HMVEC) und makrovaskulären Endothelzellen (HUVEC) nachgewiesen⁴⁹. Mit seiner Domänenstruktur (Abb. II) gehört NOSTRIN zur Familie der PCH-Proteine (*pombe Cdc15 homology*; siehe Abschnitt 3.3.1).

Die Interaktion mit der eNOS erfolgt über die C-terminale SH3-Domäne (Abb. II) von NOSTRIN⁵⁰. Weitere Interaktionspartner für diese Bindungsstelle sind die große GTPase Dynamin und das den Arp2/3-Komplex aktivierende Protein N-WASP⁵¹. Die SH3-Domäne ist nicht die einzige Protein-Protein-Interaktionsplattform von NOSTRIN. Die Bindung mit Caveolin-1⁴⁹ wurde auf die AS 323 - 433 von NOSTRIN eingegrenzt⁴⁸. Über seine C-terminale Coiled-Coil-Domäne (AS250 – AS434) ist NOSTRIN in der Lage zu Oligomerisieren⁵²; die FCH-Domäne (*Fes/CIP homology*) vermittelt eine Membranassoziation von NOSTRIN⁵³. Des Weiteren wurde in NOSTRIN eine potentielle Bindungsdomäne für Rho-GTPasen (HR1) und potentielle Tyr-Phosphorylierungsstellen gefunden.

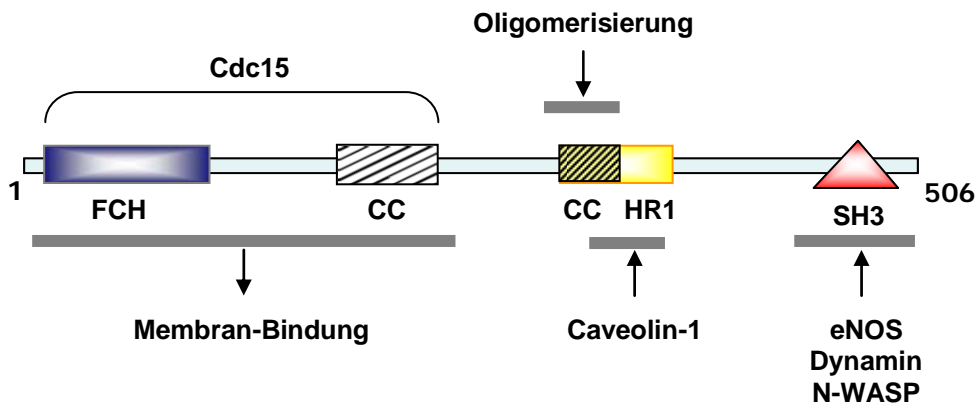


Abbildung II: Schematische Darstellung von NOSTRIN und seiner bekannten Interaktionsdomänen

NOSTRIN ist ein Protein von 58 kDa mit definierter Domänenstruktur. FCH, Fes/CIP homology; CC, Coiled-Coil; HR1, protein kinase C-related kinase homology region 1; SH3, Src homology 3.

3.3.1 NOSTRIN gehört zur PCH-Familie

PCH-Proteine⁵⁴ zeichnen sich durch eine typische Domänenstruktur aus, bei welcher sich eine FCH-Domäne am N-Terminus befindet, gefolgt von ein oder zwei Coiled-Coil-Domänen mit einer abschließenden SH3-Domäne am C-Terminus. Die FCH-Domäne erhielt ihren Namen über ihre Erstbeschreibung in der Fes-Kinase und dem Cdc42-interagierenden Protein, CIP4⁵⁵. Ferner gehören zur PCH-Familie zum Beispiel die Proteine PSTPIP⁵⁶, Pacsine/Syndapine^{57, 58} und Toca-1⁵⁹. Die Familienmitglieder weisen untereinander keine große Übereinstimmung auf der Ebene der Aminosäure-Identität auf (Abb. III). Für NOSTRINs SH3-Domäne wurde mit 40 % die höchste Übereinstimmung zu der SH3-Domäne von CD2BP1 gefunden, zu der von CIP4 liegt sie nur bei 25 %. Noch geringer ist die Übereinstimmung in der FCH-Domäne, bei der als höchster Wert 17 % Identitätsübereinstimmung zwischen NOSTRIN und Pacsin-1 gefunden wurde. Trotz dieser geringen Übereinstimmungen zeichnen sich die Familienmitglieder durch eine funktionale Gemeinsamkeit aus, nämlich der Beteiligung an der dynamischen Reorganisation des Zytoskeletts sowie der Endozytose⁵³.

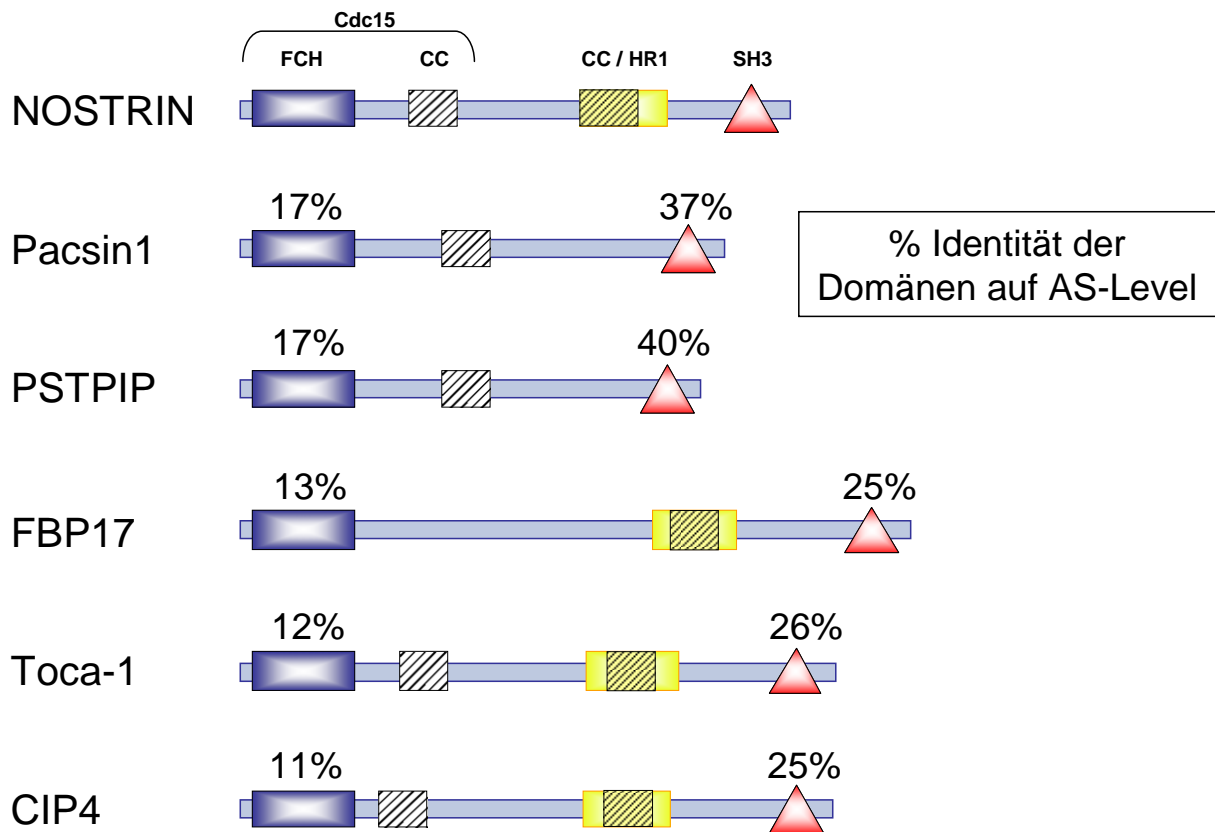


Abbildung III: Vergleich der AS-Identität von NOSTRIN zu anderen Proteinen der PCH-Familie

FCH, Fes/CIP homology; CC, Coiled-Coil; HR1, protein kinase C-related kinase homology region 1; SH3, Src homology 3.

Wie bei NOSTRIN⁵¹ binden an die SH3-Domäne anderer PCH-Familienmitglieder verschiedene Proteine, wie zum Beispiel Dynamin und N-WASP⁵⁸⁻⁶⁰. Durch die Interaktion mit N-WASP lokalisieren die Familienmitglieder auch am Aktin-Zytoskelett. In Immunfluoreszenzstudien mit überexprimierten NOSTRIN konnte eine partielle Co-Lokalisation mit Phalloidin beobachtet werden. Auch die Familienmitglieder PSTPIP2 und Syndapin interagieren mit Aktin. PSTPIP2 bindet wahrscheinlich direkt über seine Coiled-Coil-Domäne an Aktin und löst die Bildung von dicken, langen Filamenten aus⁶¹. Syndapin hingegen wird an Stellen der Aktinpolymerisation und Umstrukturierung gefunden, lokalisiert jedoch nicht an stabile F-Aktin Stressfasern⁶².

Für die FCH-Domäne häufen sich die Hinweise, dass sie für die Membranassoziation verantwortlich ist. Für das Protein FBP17, Toca und CIP4 konnte die Abhängigkeit der Membranassoziation von der erweiterten FCH-Domäne direkt gezeigt werden⁶³⁻⁶⁵. Des Weiteren gibt es Hinweise darauf, dass diese Domäne die Membran verformen kann⁶⁶. Für

NOSTRIN konnte gezeigt werden, dass die FCH-Domäne hinreichend für eine Membranassoziation ist, aber nur gemeinsam mit der anschließenden Coiled-coil-Domäne (AS160 – AS190) - was dann einer typischen Cdc15-Domäne entspricht - eine spezifische Bindung an die Plasmamembran erfolgt⁵³.

3.3.2 NOSTRIN als Schlüssel-Adapter im caveolären Transport der eNOS

NOSTRIN befindet sich über die direkte Interaktion mit Caveolin-1 innerhalb der Plasmamembran an den sogenannten Caveolae und auch an intrazellulären Vesikeln, die Caveolin-1 enthalten. Unter Verwendung von CHO-eNOS-Zellen (CHO-Zellen mit stabil exprimierter eNOS) wurden bei Coexpression von NOSTRIN zwei Effekte beobachtet:

1. NOSTRIN verursacht eine Translokation der eNOS von der Plasmamembran zu vesikulären Strukturen, in denen beide Proteine sowie Caveolin-1 colokalisieren^{50, 51}.
2. NOSTRIN inhibiert unter Kalziumstimulation die eNOS um ca. 60 %⁵⁰. Bei der Translokation und der Inhibition handelt es sich wahrscheinlich um zwei entkoppelte Mechanismen, was Experimente mit einer Cdc15-Deletionsmutante von NOSTRIN schließen lassen. Diese Mutante inhibiert die eNOS ebenfalls in dem selben Ausmaß wie das unmodifizierte NOSTRIN, löst aber keine Translokation aus, sondern verbleibt gemeinsam mit eNOS und Caveolin an der Plasmamembran sowie dem Golgi-Apparat⁶⁷. Daher wird vermutet, dass die NOSTRIN-vermittelte Inhibition der eNOS aufgrund einer Verstärkung der Bindung an Caveolin-1 erfolgt, NOSTRIN also innerhalb dieses ternären Komplexes als „molekulare Klammer“ zwischen eNOS und Caveolin-1 fungiert.

Für die Translokation der eNOS postulieren wir folgendes Modell von NOSTRIN als Induktor des caveolären Transports (Abb. IV): Da NOSTRIN über seine Coiled-Coil-Domäne in der Lage ist zu oligomerisieren, können sich größere Komplexe ausbilden, in denen NOSTRIN als Adapter für andere Proteine dient. Über die Bindung an NOSTRINs SH3-Domäne können Proteine als *cargo* (bisher bekannt: eNOS) in Caveolae und Vesikeln transportiert werden. Die Bindung von Dynamin und N-WASP bewirkt den Prozess der Vesikelabspaltung von der Plasmamembran. NOSTRIN ist somit ein wichtiger Interaktionspartner der eNOS, der Einfluss auf die subzelluläre Lokalisation sowie ihre enzymatische Aktivität hat⁵⁰.

Aufgrund der regulativen Einflüsse auf die Aktivität der eNOS durch NOSTRIN scheinen Auswirkungen auf das Herz-Kreislauf-System am naheliegendsten.

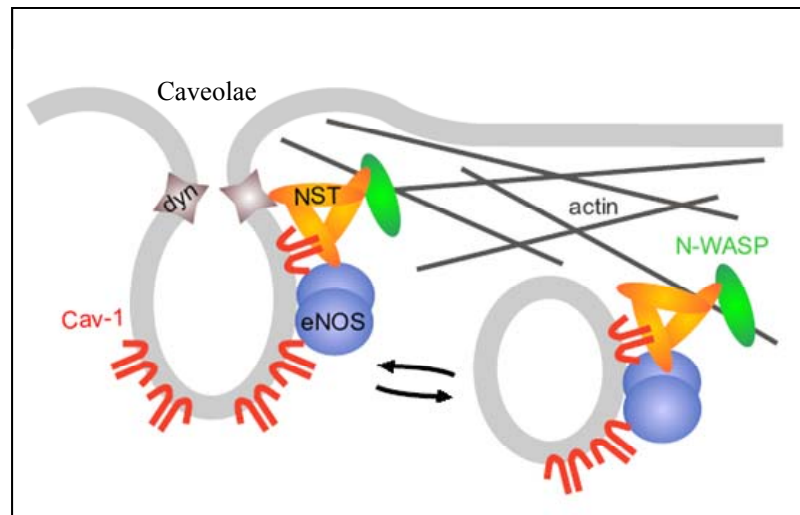


Abbildung IV: Modell von NOSTRIN als Induktor der caveolären Translokation

NOSTRIN (NST) befindet sich durch seine Interaktion mit Caveolin-1 (Cav-1) an Caveolae. Aufgrund seiner Trimerisierung ist NOSTRIN in der Lage, über seine SH3-Domäne als Adapter für mehrere Proteine zu dienen, so dass ein Komplex aus NOSTRIN, eNOS, Caveolin-1, Dynamin (dyn) und N-WASP aufgebaut wird. Werden Dynamin und N-WASP aktiviert, kann das Vesikel von der Membran abgeschnürt werden und über Aktinpolymerisation von der Membran ins Zytoplasma gelangen.

3.3.3 NOSTRIN β – ein alternatives Spleißprodukt

Für das in unserer Arbeitsgruppe gefundene Protein NOSTRIN (ab hier als NOSTRIN α bezeichnet) gibt es seit September 2001 in der NCBI-Datenbank einen Eintrag für ein alternatives Spleißprodukt, das im Rahmen der *Mammalian Gene Collection (MGC)* vom *National Institute of Health* in einer humanen Plazenta-cDNA-Bibliothek gefunden wurde und in der Datenbank unter gi:15559667 zu finden ist (seit August 2003 unter gi:33991502).

Bei dieser Variante (ab hier als NOSTRIN β bezeichnet) wird beim Spleißvorgang Exon-2 aus der mRNA ausgeschlossen und Exon-1 direkt mit Exon-3 verbunden (Abb.V-A). Hierdurch verschiebt sich das Leseraster. Damit wird ein vorzeitigen Stopp-Codon in Exon-3 eingeführt, das 66 Nukleotide vom Exon3-Exon4-Übergang entfernt ist. Ein alternativer Translations-Start ist dann erst wieder in Exon-4 zu finden, wodurch ein am N-Terminus um 77 Aminosäuren verkürztes Protein vorhergesagt wird (Abb.V-B). Somit würde der NOSTRIN β -Variante die FCH-Domäne fast vollständig fehlen. Der weitere Aufbau der beiden Isoformen mit den Coiled-Coil-Motiven, der HR1- und C-terminalen SH3-Domäne ist jedoch identisch.

Diese Isoform von NOSTRIN wurde bisher noch nicht auf Proteinebene bestätigt, so dass auch ein fehlerhafter Spleißprozess als Ursprung für die gefundene cDNA denkbar ist, die vor einer Translation über den *nonsense-mediated mRNA decay* (NMD) abgebaut wird.

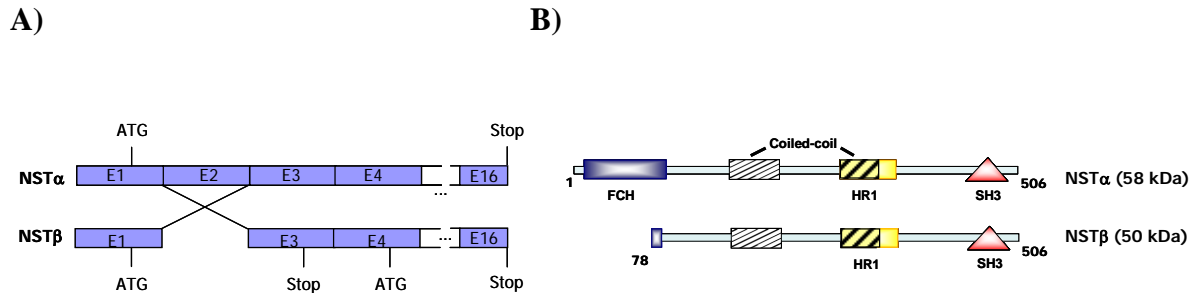


Abbildung V: Schematische Darstellung von NOSTRIN α und NOSTRIN β .

A) Unterschiede auf Ebene der mRNA: Bei NOSTRIN β wird Exon2 (E2) beim Spleißen ausgeschlossen, was auf Proteinebene **B)** zu einem um 77 Aminosäuren verkürzten Konstrukt führt. FCH: *Fes/CIP homology*; HR1: protein kinase C-related kinase homology region 1; SH3: Src homology 3; E: Exon; ATG: funktionelle Startcodons

3.3.4 Alternatives Spleißen und der *nonsense-mediated mRNA decay*

Ganz allgemein wird alternatives Spleißen durch Verstärkung einer schwachen Spleiß-Stelle und / oder Abschwächen einer starken Spleiß-Stelle reguliert⁷⁸. Hierfür werden regulatorische Sequenzen innerhalb der RNA benötigt, durch die *trans*-aktivierende Faktoren Einfluss auf die Wahl der Spleiß-Stelle nehmen^{68, 69}. Auch bei dem eigentlichen Spleißvorgang gibt es unterschiedliche Mechanismen: Meistens werden beim alternativen Spleißen Exons ausgeschlossen⁷⁰, es gibt aber auch Fälle, bei denen im Normalfall ein Exon ausgeschlossen⁷¹ und erst bei Aktivierung der schwachen Spleiß-Stelle hinzugefügt wird⁷². Ebenso kann ein Intron beibehalten werden, was oft zum Abbau der mRNA führt und somit Bestandteil einer negativen Rückkopplung zur Regulation der Genexpression ist⁷³.

Wird bei einem Spleißvorgang ein vorzeitiges Stopp-Codon in die mRNA eingebracht (Abb. VI-2), führt das häufig zum Abbau der mRNA über den Weg des NMD^{74, 75}. Nach dem Spleißvorgang im Zellkern bleiben einige Proteine ca. 20-24 Nukleotide vor den Exon-Exon-Übergängen gebunden, der sogenannte *exon junction complex* (EJC)⁷⁶. Diese Komplexe bleiben auch gebunden, wenn die mRNA nach dem Spleißvorgang ins Zytosol gelangt (Abb. VI-2-A). Hiermit wird eine Art Gedächtnis mit ins Zytosol gebracht, was anzeigt, ob und wenn ja wo Introns in der prä-mRNA enthalten waren^{76, 77}. NMD-Faktoren, wie z. B.

up-frameshift-2 (UPF2), UPF3A und UPF3B, werden an die EJC rekrutiert⁷⁸. Während der Translation werden die EJs von dem ersten Ribosom von den Übergängen verdrängt, sobald es 55 Nukleotide vor diesen ankommt (Abb. VI2-B). Wenn die mRNA keine Fehler aufweist, wird die Translation normal durchgeführt (Abb. VI1A-C). Befindet sich aber ein Stopp-Codon mindestens 55 Nukleotide von dem nächsten Exon-Exon-Übergang, so dass der EJC, die UPFs und das Ribosom gleichzeitig an der mRNA gebunden sind (Abb. VI2-C), wird der NMD ausgelöst und die mRNA abgebaut (Abb. VI2-D). Ist ein Stopp-Codon näher als 55 Nukleotide vor dem nächsten Exon-Exon-Übergang, wird dieser Fehler nicht vom NMD erkannt, denn sobald der EJC verdrängt ist, fehlt ein Erkennungsmerkmal zum Auslösen des NMD^{74, 78}.

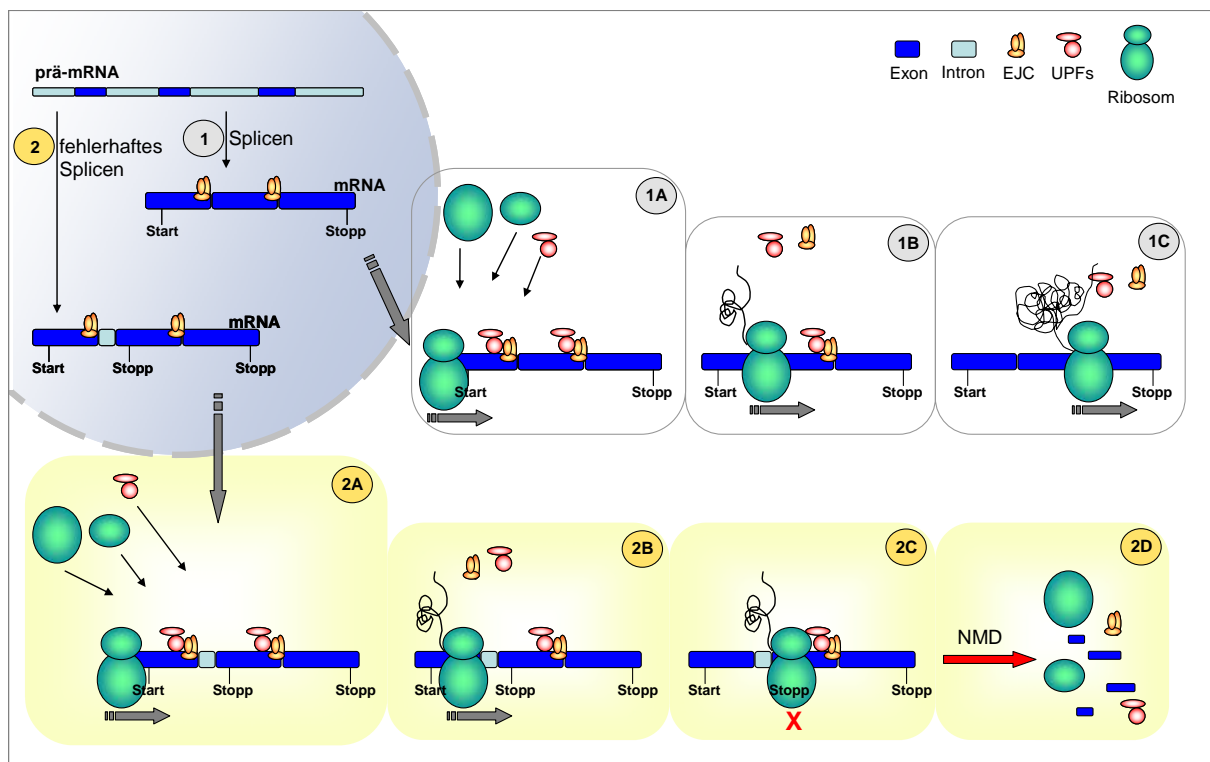


Abbildung VI: Der nonsense-mediated mRNA decay (NMD)

Nach einem Spleißvorgang verbleiben an der Exon-Exon-Übergängen EJs. Im Zytosol werden an diese die NMD-faktoren UPFs rekrutiert. Ist die prä-mRNA richtig prozessiert worden (1), werden die EJs und UPFs von dem ersten Ribosom bei der Translation verdrängt. Wird bei einer fehlerhaften Prozessierung (2) ein vorzeitiges Stopp-Codon >55 Nukleotide vor dem nächsten Exon-Exon-Übergang eingebaut, wird der NMD ausgelöst, sobald das Ribosom dieses erreicht.

3.4 Zirrhose

Die Leber ist die größte Drüse des Körpers und für viele wichtige Aufgaben zuständig. Sie unterstützt die Verdauung, den Blutkreislauf, die Blutgerinnung, den Stoffwechsel und den Hormonkreislauf⁷⁹.

Eine Leberzirrhose ist eine chronische Erkrankung der Leber, die mit einer Zerstörung der Läppchen- und Gefäßarchitektur durch eine entzündliche Fibrose einhergeht⁸⁰. Fast alle Lebererkrankungen können im Endstadium zu einer Zirrhose führen. In Industrieländern ist die häufigste Ursache für die Schädigung Alkoholkonsum, gefolgt von Virushepatiden vom Typ B und C, erheblichen Stoffwechselerkrankungen (z. B. Morbus Wilson⁸¹, Hämochromatose) und seltener auch Autoimmunerkrankungen (Laurell-Erickson-Syndrom)^{82, 83}. Durch ein Nebeneinander von Gewebeerstörung und Regeneration entsteht eine gestörte Architektur des Lebergewebes mit knotigen Veränderungen, zusätzlich kommt es zu einer übermäßigen Bildung von Bindegewebe (Fibrosierung)^{79, 80}. Im frühen Stadium einer Leberzirrhose spielen Stellat-Zellen und ihre Transformation in Fibroblasten eine wichtige Rolle⁸⁴. Unter physiologischen Bedingungen transformieren Stellat-Zellen nach einer Beschädigung von Lebergewebe zu Fibroblasten⁸⁵ und sezernieren dann Kollagen, Laminin, Proteoglykan und Fibronectin⁸⁶⁻⁸⁹, die zur Wundheilung beitragen. Unter pathophysiologischen Bedingungen führt dies zur Vernarbung des Lebergewebes und somit zu einer Fibrose. Nehmen diese narbigen Areale einen größeren Ausmaß an, kommt es zu einer mechanischen Störung der Leberdurchblutung, wodurch sich das Blut im Bereich der Pfortader staut. Eine Reaktion hierauf ist eine Druckerhöhung im Pfortaderkreislauf, eine sogenannte portale Hypertonie⁹⁰. Die Druckerhöhung hat zwei Konsequenzen: Zum einen überdehnt die Vene mit der Zeit, zum anderen wird das Blut um die Leber herum geleitet. Dadurch kann das vom Darm kommende Blut nicht mehr entgiftet werden, so gelangen viele Giftstoffe in den allgemeinen Kreislauf, passieren die Blut-Hirn-Schranke und lösen eine hepatische Enzephalopathie^{91, 92} aus. Des Weiteren kommt es häufig zu inneren Blutungen⁹³, einem Aszites⁹⁴ sowie massiven Störungen der Nierenfunktion⁹⁵.

Der genaue Mechanismus, der zu einer portalen Hypertonie sowie der Störung der gesamten Hämodynamik in der Leber führt, ist noch nicht bis ins letzte Detail aufgeklärt. Es gibt jedoch immer mehr Hinweise aus in Tiermodellen für eine Reduktion der hepatischen eNOS-Aktivität und somit der NO-Freisetzung^{96, 97}, dies aber ohne Änderung des Expressionsspiegels der eNOS⁹⁸. Die verminderte NO-Freisetzung trägt zu einer weiteren

Steigerung des intrahepatischen Widerstands und somit einer Erhöhung der portalen Hypertonie bei⁹⁹⁻¹⁰¹. Die meisten Untersuchungen in Bezug auf die verringerte eNOS-Aktivität haben eNOS-Inhibitoren (z. B. Caveolin-1)^{98, 102}, oder post-translationale Modifikationen des Enzyms⁹⁹ im Fokus. Diese beiden Mechanismen zur Aktivitätsbeeinflussung der eNOS im Krankheitsbild der Leberzirrhose werden kontrovers diskutiert^{98, 101}.

Aber auch Vorgänge bei der Entwicklung einer Leberzirrhose haben einen Einfluss auf die eNOS-Expression und -Aktivität. Während der Transformation von Stellat-Zellen zu Fibroblasten wird die in den Zellen gespeicherte Retinsäure (RA) freigesetzt⁸⁴, wodurch das Expressionsmuster umliegender Zellen beeinflusst wird. Die Expression der eNOS wird durch RA in Endothelzellen stimuliert¹⁰³, dagegen nimmt die NO-Freisetzung unter RA-Einfluss ab¹⁰⁴.

3.4.1 Retinsäure

In der Leber dienen die Stellat-Zellen (auch Ito-Zellen oder Lipozyten genannt) als Speicher für Retinoide (Vitamin-A Derivate)⁸⁴. Während 11-*cis*-Retinoid im Sehprozess eine wichtige Rolle spielt¹⁰⁵, sind die in einander umwandelbaren all-*trans*-RA (atRA) und 9-*cis*-RA wichtige Regulatoren von Wachstum, Reifung und Differenzierung vieler Zelltypen¹⁰⁶. Ferner haben sie einen positiven Einfluss auf das Kardiovaskuläre-System, da sie Prozesse wie Entzündungen, Thrombose und Plättchen-Aggregation hemmen¹⁰⁷⁻¹⁰⁹. Die Funktionen von atRA und 9-*cis*-RA wird über die Bindung an zwei Hormonrezeptorfamilien vermittelt, den RA-Rezeptoren (RAR α , β und γ) und Retinoid-x-Rezeptoren (RXR α , β und γ)^{110, 111}. Die RAR und RXR Proteine bilden Dimere der Form RAR/RXR und RXR/RXR aus, häufiger jedoch Heterodimere. Diese binden direkt an spezifische DNA-Sequenzen, den *retinoid-responsive elements* (RARE oder RXRE). RARE und RXRE-Sequenzen befinden sich meist in der 5'-Region von RA-regulierten Genen, können aber auch in Introns lokalisiert sein¹¹². Neben der direkten Bindung an RARE und RXRE kann unabhängig von diesen auch die Sp1- und AP1-abhängige Genregulationen beeinflusst werden, wobei im Fall von Sp1 die Transkription stimuliert und bei AP1 unterdrückt wird¹¹³⁻¹¹⁵. Des Weiteren ist RXR in der Lage, mit anderen Rezeptoren, z. B. dem *peroxisome proliferator-activated receptor* (PPAR), Dimere zu bilden, und kann somit auch weitere Signalwege beeinflussen¹¹¹. Insgesamt werden ungefähr 500 Gene direkt oder indirekt durch RA reguliert.

4 Zielsetzung

Das erste Ziel der vorliegenden Arbeit war zu überprüfen, ob NOSTRIN - aufgrund seiner postulierten Funktion als Auslöser des caveolären Transports der eNOS und als eNOS-Inhibitor - eine Bedeutung bei der Ausbildung einer portalen Hypertonie in zirrhotischer Leber haben könnte. Ferner sollte die Existenz der im Rahmen des *MGC*-Projekts gefundenen Spleißvariante von NOSTRIN, von nun an NOSTRIN β genannt, verifiziert werden. Nach Bestätigung dessen sollte eine erste Charakterisierung dieser Isoform erfolgen, wobei sie hauptsächlich auf Unterschiede zur bisher bekannten Isoform, ab jetzt NOSTRIN α genannt, hin untersucht werden sollte.

Zur Klärung dieser Fragen wurden als erste methodische Ansätze gewählt:

- Etablierung der qRT-PCR für beide Isoformen
- Analyse der NOSTRIN-Expression in Leber mittels Immunpräzipitation und Immunhistochemie
- Charakterisierung des Expressionsmusters von eNOS, Caveolin-1, NOSTRIN α und NOSTRIN β in normaler und zirrhotischer Leber mittels qRT-PCR und Western Blot
- Lokalisationsstudien mittels Immunfluoreszenz und Zellfraktionierung von NOSTRIN β und diversen NOSTRIN-Mutanten

5 Material und Methoden

5.1 Verwendete Geräte

CLSM 510 Meta inkl. „LSM 5 Image Browser“-Software Fluoreszenzmikroskop Axiovert 2000	Zeiss, Jena
TRI-CARB 2900TR Liquid Scintillation Analyser inkl. QuantaSmart™ Software	Packard BioScience, Kalifornien, USA
iCycler PCR System inkl. iCycler iQ real-time detection system, iCycler™ iQ Optical System Software Version 3.0a	BioRad, München
PROTEAN® II xi Cell	BioRad, München
Mini-PROTEAMN® 3 Cell	BioRad, München
Elektrotransferapparatur, Typ Trans Blot SD und Typ Mini Trans-Blot®	BioRad, München
Gelanalysegerät Gel Doc 2000 inkl. Software „Quantity one“	BioRad, München
CM3050 S-Kryostat	Leica, Nussloch
Optima™ MAX Ultrazentrifuge Beckman	Coulter, Fullerton, USA
Megafuge 1.0R	Heraeus, Hanau
Biofuge pico	Heraeus, Hanau
SmartSpec™3000	BioRad, München

5.2 Verbrauchsmaterialien

Deckgläser, 12mm	Marlenfeld GmbH, Lauda-Königshofen
Röntgenfilm, Typ New RX	Fuji, Tokyo, Japan

BioMax MS Film	Kodak, New York, USA
Nitrocellulose-Transfermembran	Sartorius, Göttingen
Immobilon™-P (PVDF-Transfermembran)	Millipore, Bedford, USA
iCycler iQ™ PCR-Plates, 96well	BioRad, München
Microseal® 'B' Film	BioRad, München
MicroSpin™ G-25 Columns	GE-Healthcare, Buckinghamhire UK

Alle weiteren Plastikwaren und Gefäße wurden von Eppendorf (Hamburg), Greiner (Frickenhausen) bzw. Nunc (Wiesbaden) bezogen.

5.3 Chemikalien und spezielle Reagenzien

Tissue-Tek®	Sakura Finetek, Zoeterwoude, NL
Nanofectin™	PAA, Pasching, Österreich
Metafectene	Biontex, Martinsried
Gel/Mount™	biomeda, Foster City, USA
Complete (Proteasen-Inhibitoren-Cocktail)	Roche GmbH, Penzberg
Protein A/G PLUS-Agarose	Santa Cruz, USA
BugBuster	Novagen / Merck, Darmstadt
Retinsäure	Calbiochem /Merck, Darmstadt
Cycloheximid	SIGMA, Taufkirchen
TRI Reagent™	SIGMA, Taufkirchen
Mayer's Hämatoxylin-Lösung	AppliChem, Darmstadt
Eosin	AppliChem, Darmstadt
Rotiszint® eco plus	Roth, Karlsruhe
Leptomycin B	Sigma, Taufkirchen
Medium 199	Cambrex, Verviers, Belgien
DMEM	Cambrex, Verviers, Belgien
Human Serum Convertet	PAA, Pasching, Österreich

5.4 Enzyme und Kits

Taq DNA-Polymerase	Amersham, Freiburg
Pfu DNA-Polymerase	Stratagene, La Jolla, USA
Benzonase	Novagen / Merck, Darmstadt
Restriktionsendonukleasen	MBI Frementas, St. Leon-Rot
ECL TM <i>western blotting detection kit</i>	Amersham Biosciences, Freiburg
Immobilon TM <i>western blotting detection kit</i>	Millipore, Billerica, USA
iScript TM <i>cDNA Synthesis kit</i>	BioRad, München
QIAquick PCR <i>purification kit</i>	Qiagen, Hilden
QIAprep <i>spin miniprep kit</i>	Qiagen, Hilden
QIAfilter <i>plasmid midi kit</i>	Qiagen, Hilden
QIAquick <i>gel extraction kit</i>	Qiagen, Hilden

5.5 Reagenzien für die Real-Time PCR

UBC: Assay On Demand Hs00824723_m1	Applied Biosystems, Foster City, USA
eNOS: Assay On Demand Hs00167166_m1	Applied Biosystems, Foster City, USA
Caveolin-1: Assay On Demand Hs00184697_m1	Applied Biosystems, Foster City, USA
NOSTRIN β : Assay on Demand Hs00364750_m1	Applied Biosystems, Foster City, USA
NOSTRIN α : Assay On Design Target-Koordinate: 140 (Exon2-3 Übergang)	Applied Biosystems, Foster City, USA
iQ TM Supermix	BioRad, München

Alle weiteren Chemikalien und Lösungsmittel wurden in p.a. Qualität von Appllichem (Darmstadt), Merck (Darmstadt), Sigma (Taufkirchen) und Roth (Karlsruhe) bezogen.

5.6 Antikörper

Anti-Caveolin-1 (polyklonal), Kaninchen

Immunglobulin G (IgG)

(Verdünnung für IB 1:1000; IF: 1:100)

Anti-eNOS (monoklonal), Maus IgG

(Verdünnung für IB 1:1000; IF: 1:100)

Anti-GAPDH (monoclonal), Maus

(Verdünnung für IB 1:10000)

Rhodamin-Phalloidin

Anti-FLAG M2, (monoklonal) Maus IgG

(Verdünnung für IB 1:10000)

Anti-Lamp1 (monoklonal), Maus IgG

(Verdünnung für IB 1:1000)

Anti-Nup62 (monoklonal), Maus IgG

(Verdünnung für IB 1:1000)

Kaninchen-anti-NOSTRIN:

NOSTRIN (polyklonal), Kaninchenserum

gegen GST-NOSTRIN(AS242-506)-Fusionsprotein

(Verdünnung für IB 1:5000; IP 5 µl)

Maus-anti-NOSTRIN:

9C8G6 aus Hybridomazell-Überstand

(Verdünnung für IF 1:100)

9C8G6-Aszites aufgereinigt

(Verdünnung für IB 1:1000)

Anti-Kaninchen- bzw. Anti-Maus-IgG,

Peroxidase-Konjugiert

(Verdünnung für IB 1:20000)

Anti-Kaninchen- bzw. Anti-Maus-IgG,

Cy2- bzw. Cy3-konjugiert

(Verdünnung für IF 1:500)

Cy2: $ex_{max} = 490nm$, $em_{max} = 508nm$

Cy3: $ex_{max} = 553nm$, $em_{max} = 575nm$

BD Transduction,

Heidelberg

BD Transduction,

Heidelberg

Abcam, cambridge, UK

Molecular Probes, Eugene, USA

SIGMA, Taufkirchen

BD Transduction, Heidelberg

BD Transduction, Heidelberg

A. Maidhof, B. Welsch,

Mainz

nanoTools, Teningen

SIGMA, Taufkirchen

Jackson ImmunoRes.,

West Grove, USA

5.7 Vektoren

pcDNA-3.1A myc/his	Invitrogen, Groningen, Niederlande
pcDNA-3.1 A-NOSTRIN-myc/his	S. Matt, ZBC-II der J.W. Goethe Univ. Frankfurt
pcDNAmodHA-AGAP	S. Pioch, ZBC-II der J.W. Goethe Univ. Frankfurt
pRK5-Dab2	I. Dikic, ZBC-II der J.W. Goethe Univ. Frankfurt
pRK5-Synaptojanin	I. Dikic, ZBC-II der J.W. Goethe Univ. Frankfurt

5.8 Bakterienstämme und Zelllinien

<i>E.coli</i> XL1-blue	Stratagene, Heidelberg
<i>E.coli</i> BL-21	Pharmacia, Freiburg
CHO-eNOS	J. Dedio, Aventis, Frankfurt
HEK293	DSMZ, Braunschweig
Hep3B	ATCC, Rockville, USA
HUVEC	S. Schaubek, ZBC-II der J.W. Goethe Univ. Frankfurt

5.9 Agarose-Gelelektrophorese

DNA- und RNA-Fragmente wurden elektrophoretisch in 1 oder 2 %igen (w/v) Agarosegelen inkl. Ethidiumbromid (10 µg/ml) mit TAE-Laufpuffer (40 mM Tris/Acetate, 0,1 mM EDTA, pH 7,6) aufgetrennt und mit Hilfe des Analysegerätes Gel Doc 2000 und der Software „Quantity One“ ausgewertet.

5.10 Klonierungen

Es wurden unterschiedliche Konstrukte von NOSTRIN β kloniert. Für Experimente in Zelllinien handelt es sich um Konstrukte, die in der Sequenz erst mit dem NOSTRIN β -Start-Codon in Exon vier beginnen. Für die Etablierung des qRT-PCR-Assays wurde ein Konstrukt kloniert, das der in der Datenbank unter gi:33991502 angegebenen mRNA-Struktur gleicht. Bei diesem sind Exon-1, Exon-3 und der Anfang von Exon-4 vorhanden, aber es fehlt Exon-2. Die unterschiedliche Klonierungsstrategie ist in Abbildung VII schematisch dargestellt.



Abbildung VII:

Klonierung von NOSTRIN β -Konstrukten. Für Untersuchungen auf Proteinebene wurden DNA-Konstrukte mittels des vorwärts-Primers „BamHI-MKSTADL“ hergestellt, welcher direkt mit dem Start-Codon in Exon 4 aus NOSTRIN α beginnt. Um die qRT-PCR etablieren zu können, wurde ein mRNA-Mimikry mittels des Primers „AtoB“ kloniert, bei welchem Exon-2 ausgeschlossen wird.

Für die Klonierungen wurden jeweils 200 μ M dNTPs eingesetzt, sowie die Pfu- oder Taq-DNA-Polymerase von Stratagene, bzw. Amersham mit ihren zugehörigen Puffern verwendet. Alle Oligonukleotide wurden vom MWG-Biotech, Martinsried, hergestellt und in einer Konzentration von 200 fmol eingesetzt. Die Polymerasen-Kettenreaktion (PCR) erfolgte in 50 μ l-Ansätzen mit folgendem Protokoll:

Voraktivierung	94 °C - 4 min.] 35x
Schmelzen	94 °C - 30 sec.	
Primer-Binden	(50 – 62) °C - 30 sec.	
Elongation	72 °C - (30 sec. – 2 min.)	
Abschluss-Elongation	72 °C - 7 min.	
Abkühlen	10 °C - ∞	

In Tabelle 1 sind alle für diese Arbeit relevanten Primer aufgelistet.

Name	Sequenz	Eigenschaften
BamHI-MKSTADL	CATAGGATCCATGAAATCCACAGCGGACCTG	vorwärts BamHI-Schnittstelle
AlphaToBeta_rev	GACTGTCTAACAGGCCCGTTTGGACCTTAATCG	rückwärts Spleißt E2 aus NST α
AlphaToBeta_for	CTGACAGATTGTCCGGGCAAACCTGGAAATTAG	Vorwärts Spleißt E2 aus NST α
Delta-NLS-1_rev	AGGATTTACATGTTCTCAGTGAAGTGAAC	rückwärts Deletion
Delta-NLS-2_rev	GACCTTAGTCGTTTAAAATTACCAATCATGG	rückwärts Deletion
Delta-NLS-3_rev	GTTAGATACTGACTCGAGGAGTTATTTGAC	rückwärts Deletion
mut-NLS-1_rev	CAAGTGATGCTCTCGCCGCTCTTG	rückwärts Punktmutation
mut-NLS-2_rev	CCATTAATGCCGCCGGCCGCAATTTGC	rückwärts Punktmutation
AlphaOrBeta	CGCCTTCGAGGAGTTATTTG	für Sequenzierung
Mut(3)_NES_rev	CTCGTAACGCCTCCGCCTCCGCCTTCTTAAGTTGAA	EcoRI-Schnittstelle Mutation des NES
Mut_NES_for	CTGGAGCTGGAGAAGGAAAGAATTCAAGCTTTATGC	EcoRI-Schnittstelle Mutation des NES
bp+ BamHI_for	AAGGACAAAAGCCGGATCCATTCAACATGAGG	Vorwärts BamHI-Schnittstelle
bp-stop	CCGTTGTGTCGATGTTCCGTGAGCTCTTCTGAGAC	rückwärts XhoI-Schnittstelle Ohne « Stopp »
13.2-	CCGTTGTGTCGATGTTCCGTATTGAGCTCTGAGA	rückwärts XhoI-Schnittstelle Mit « Stopp »
NSTa-1-20	GTTGAAATGTGTCTGGCTTTTGTC	rückwärts Promotorregion
NSTa-180-200	ACCCAGAGCAGTCTTACTTTCTC	vorwärts Promotorregion

Tabelle 1: Verwendete Primer

In Tabelle 2 sind alle für diese Arbeit relevanten Klonierungen aufgelistet. Für Klonierungen mit mehreren Schritten folgt noch eine ausführliche Beschreibung.

Konstrukt	Vektor	Insert	PCR-Primer	Sonstiges
pcDNA-3.1B-E1NSTβ	pcDNA-3.1B-NSTα	“Spleißen“ bei PCR	AlphaToBeta_for AlphaToBeta_rev	Konstrukt für die qRT-PCR
pcDNA-3.1B-NSTβ	pcDNA-3.1B BamHI / XhoI	Aus PCR mit pME-NSTα, BamHI / XhoI	BamHI-MKSTADEL_for 13.2-	Konstrukt ohne myc/his-Tag, da mit Stopp kloniert
pcDNA-3.1A- NSTβ-ΔNLS-1	pcDNA-3.1A BamHI / XhoI	Aus PCR mit pcDNA-3.1B-NSTβ, BamHI / XhoI	1. BamHI-MKSTADEL_for NSTβ-ΔNLS-1_rev 2. →Δ NLS-1 pb-stop-	→ erst Metaprimer (Δ NLS-1), dann eigentliches Konstrukt
pcDNA-3.1A- NSTβ-ΔNLS-2	pcDNA-3.1A BamHI / XhoI	Aus PCR mit pcDNA-3.1B-NSTβ, BamHI / XhoI	1. BamHI-MKSTADEL_for NSTβ-ΔNLS-2_rev 2. →Δ NLS-2 pb-stop-	→ erst Metaprimer (Δ NLS-2), dann eigentliches Konstrukt
pcDNA-3.1A- NSTβ-ΔNLS-3	pcDNA-3.1A BamHI / XhoI	Aus PCR mit pcDNA-3.1B-NSTβ, BamHI / XhoI	1. BamHI-MKSTADEL_for NSTβ-ΔNLS-3_rev 2. →Δ NLS-3 pb-stop-	→ erst Metaprimer (Δ NLS-3), dann eigentliches Konstrukt
pcDNA-3.1A- NSTβ-ΔNLS-1/2	pcDNA-3.1A BamHI / XhoI	Aus PCR mit pcDNA-3.1A-NST ΔNLS-1 BamHI / XhoI	1. BamHI-MKSTADEL_for NSTβ-ΔNLS-2_rev 2. →Δ NLS-1/2 pb-stop-	→ erst Metaprimer (Δ NLS-1/2), dann eigentliches Konstrukt
pcDNA-3.1A- NSTβ-ΔNLS-1/3	pcDNA-3.1A BamHI / XhoI	Aus PCR mit pcDNA-3.1A-NSTβΔNLS-1 BamHI / XhoI	1. BamHI-MKSTADEL_for NSTβ-ΔNLS-3_rev 2. →Δ NLS-1/3 pb-stop-	→ erst Metaprimer (Δ NLS-1/3), dann eigentliches Konstrukt
pcDNA-3.1A- NSTβ-ΔNLS-2/3	pcDNA-3.1A BamHI / XhoI	Aus PCR mit pcDNA-3.1A-NSTβΔNLS-2 BamHI / XhoI	1. BamHI-MKSTADEL_for NSTβ-ΔNLS-3_rev 2. → NLS-2/3 pb-stop-	→ erst Metaprimer (Δ NLS-2/3), dann eigentliches Konstrukt
pcDNA-3.1A- NSTβ-ΔNLS-1/2/3	pcDNA-3.1A BamHI / XhoI	Aus PCR mit pcDNA-3.1A-NST ΔNLS-3 BamHI / XhoI	1. BamHI-MKSTADEL_for NSTβ-ΔNLS-2_rev 2. →Δ NLS-1/2 pb-stop-	→ erst Metaprimer (Δ NLS-1/2), dann eigentliches Konstrukt
pcDNA-3.1A- NSTβ-mutNLS-1	pcDNA-3.1A BamHI / XhoI	Aus PCR mit pcDNA-3.1A-NSTβ BamHI / XhoI	1. BamHI-MKSTADEL_for NSTβ-mutNLS-1rev 2. → mutNLS-1 pb-stop-	→ erst Metaprimer (mutNLS-1), dann eigentliches Konstrukt
pcDNA-3.1A- NSTβ-mutNLS-2	pcDNA-3.1A BamHI / XhoI	Aus PCR mit pcDNA-3.1A-NSTβ BamHI / XhoI	1. BamHI-MKSTADEL_for NSTβ-mutNLS-2rev 2. → mutNLS-2 pb-stop-	→ erst Metaprimer (mutNLS-2), dann eigentliches Konstrukt
pcDNA-3.1A- NSTβ-mutNLS-1/2	pcDNA-3.1A BamHI / XhoI	Aus PCR mit pcDNA-3.1A- NST β-mutNLS-1 BamHI / XhoI	1. BamHI-MKSTADEL_for NSTβ-mutNLS-2rev 2. → mutNLS-1/2 pb-stop-	→ erst Metaprimer (mutNLS-2), dann eigentliches Konstrukt
pcDNAmodHA-NLS- AGAP-1	pcDNAmodHA- AGAP-1 EcoRI	Aus PCR mit pME-NSTa EcoRI	EcoRI-NLS_for EcoRI-NLS_rev	
pcDNA-3.1A- NSTβmutNES-N-terminus	pcDNA-3.1A BamHI/EcoRI	Aus PCR mit pME-NSTa BamHI / EcoRI	BamHI-MKSTADL_for Mut(3)NES_rev	
pcDNA-3.1A- NSTαmutNES-N-terminus	pcDNA-3.1A BamHI/EcoRI	Aus PCR mit pME-NSTa BamHI / EcoRI	bp+BamHI_for Mut(3)NES_rev	
pcDNA-3.1A- NSTβmutNES	pcDNA-3.1A- NSTβmutNES-N- terminus EcoRI/XhoI	Aus PCR mit pME-NSTa EcoRI/XhoI	MutNES_for 13.2-	
pcDNA-3.1A- NSTαmutNES	pcDNA-3.1A- NSTαmutNES-N- terminus EcoRI/XhoI	Aus PCR mit pME-NSTa EcoRI/XhoI	MutNES_for 13.2-	

Tabelle 2: Verwendete Klonierungskonstrukte

5.10.1 Klonierung der NLS-Mutanten

Für die Klonierung der NLS-Deletions- und NLS-Punktmutations-Konstrukte von NOSTRIN β wurde zunächst in einer ersten PCR ein kurzes 5'-DNA-Fragment (Metaprimer) amplifiziert, indem der Vorwärts-Primer BamHI-MKSTADL sowie der jeweilige Rückwärts-Mutations-Primer verwendet wurde. Als *template* diente pcDNA-3.1B-NOSTRIN β . Die Amplifikate wurden auf 2 %igen Agarosegelen aufgetrennt und mit dem *Gel-Extraction-Kit* von Qiagen aufgereinigt. In einer zweiten PCR wurden die Metaprimer selbst als Vorwärts-Primer verwendet, um das gesamte NOSTRIN β -Konstrukt mit der jeweils eingeführten Mutation zu amplifizieren. Die PCR-Produkte wurden mit dem *PCR-Purification-Kit* von Qiagen aufgereinigt, mit den Enzymen BamHI und XhoI geschnitten und anschließend noch einmal mit dem *PCR-Purification-Kit* von Qiagen aufgereinigt. Der Vektor pcDNA-3.1A wurde ebenfalls mit BamHI und XhoI verdaut, über ein 1 %iges Agarosegel von ungeschnittenem Vektor getrennt und mit *Gel-Extraction-Kit* von Qiagen aufgereinigt. Vektor und Insert wurden unter Verwendung der T4-DNA-Ligase ligiert und der gesamte Ansatz in *E.coli* XL1-blue transformiert. Die Bakterien wurden durch Zugabe von Ampicillin in die Nährplatte auf das Plasmid selektiert. Die Überprüfung der Plasmide erfolgte mittels einer BamHI / XhoI-Restriktion und anschließender Sequenzierung. Die so erhaltenen Einzeldeletions- und Einzelpunktmutations-Konstrukte (NST β Δ NLS1, NST β Δ NLS2, NST β Δ NLS3, NST β mutNLS1, NST β mutNLS2) wurden wiederum in der PCR zum Klonieren von Doppeldeletions- und Doppelpunktmutations-Konstrukten (NST β Δ NLS1/2, NST β Δ NLS1/3, NST β Δ NLS2/3, NST β mutNLS1/2) und einer Tripeldeletionsmutante (NST β Δ NLS1/2/3) als *template* eingesetzt.

5.10.2 Klonierung der NES-Mutanten

Die NOSTRIN α und NOSTRIN β -NES-Mutanten wurden unter Ausnutzung der in dem NES-Motiv liegenden, internen EcoRI-Restriktionsstelle kloniert. Zunächst wurden mit dem Primer bp+, bzw. BamHI-MKSTADL sowie dem rückwärts-Primer Mut(3)NES_rev im 5'-Bereich die Mutationen L135A, L137A und K139A per PCR eingeführt. Parallel hierzu wird in den 3'-Bereich mit den Primern 13.2- sowie MutNES_for die Mutation L144A eingeführt. Die Amplifikate wurden mit dem *PCR-Purification-Kit* von Qiagen aufgereinigt. Der 5'-Bereich wurde mit BamHI / EcoRI verdaut, der 3'-Bereich mit EcoRI / XhoI. In einer ersten Ligation unter Verwendung der T4-DNA-Ligase werden lediglich die 5'-Bereich in den Vektor

pcDNA-3.1A (geschnitten mit BamHI / EcoRI) eingeführt. Die Ligationsansätze werden in *E.coli* XL1-blue transformiert und die Bakterien durch Zugabe von Ampicillin in die Nährplatte auf das Plasmid selektiert. Die Überprüfung der Plasmide erfolgte mittels einer BamHI / EcoRI-Restriktion. Anschließend wurde jeweils ein positives Plasmid für die zweite Ligation mit dem mutierten 3`-Bereich von NOSTRIN mit EcoRI / XhoI geschnitten und aufgereinigt. Die Ligationsansätze wurden wiederum in *E.coli* XL1-blue transformiert, die in den Klonen enthaltenen Plasmide wurden zunächst durch Restriktion mit BamHI / XhoI und anschließend durch Sequenzierung überprüft.

5.11 Zellkultur

Alle Zellen wurden bei 37 °C in Wasserdampf-gesättigter 5 %iger (v/v) CO₂-Atmosphäre kultiviert. Als Medium diente für die HEK293-, Hep3B- und CHO-eNOS-Zellen DMEM mit 10 % (v/v) FCS, 100 U/ml Penicillin und 0,1 mg/ml Streptomycin. Bei den CHO-eNOS-Zellen wurde 200 µM Methothrexat zugegeben. Die Herstellung und Charakterisierung der CHO-eNOS-Zellen erfolgte durch Jürgen Dedio^[60]. Zum Kultivieren der HUVECs wurden Zellkulturschalen mit 0,1 % Gelatine / PBS für zwei Stunden bei RT oder über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die Gelatinelösung wurde abgenommen und die Schale zwei Mal mit PBS gewaschen, bevor die Zellen zugegeben wurden. Als Medium wurde M199 mit 10 % Humanserum verwendet. Zur Subkultivierung wurden konfluent gewachsene Zellen 2 x mit PBS gewaschen, durch zweiminütige Behandlung mit 0,025 % (w/v) Trypsin, 0,05 % (w/v) EDTA abgelöst und nach Verdünnung mit Kulturmedium im Verhältnis 1: 5 oder 1:10 neu ausgesät.

5.12 Transfektion von eukaryotischen Zellen

Die transiente Expression von cDNA in CHO-eNOS- und HeLa-Zellen erfolgte durch Transfektion unter Verwendung von Nanofectin[®]. Für Immunfluoreszenz-Färbungen wurden einen Tag vor der Transfektion 60.000 Zellen auf Deckgläschen mit 12 mm Durchmesser, für die Herstellung von Lysaten 1.200.000 Zellen in Zellkulturschalen mit einem Durchmesser von 10 cm ausgelegt und bis zu einer Konfluenz von ca. 60 % kultiviert. Für Immunfluoreszenz-Färbungen wurden zur Komplexbildung Lösungen von 0,5 µg zu transfizierender DNA in 50 µl NaCl-Lösung (150 mM) sowie 1 µl Nanofectin[®] in 50 µl NaCl gemischt, die beiden Lösungen vereint und 30 min bei RT inkubiert. Für die Transfektion

einer 10 cm-Kulturschale wurden 4 µg DNA in 500 µl NaCl-Lösung sowie 8 µl Nanofectin in 500 µl NaCl-Lösung verwendet. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und 500 µl, bzw. 10 ml DMEM mit 10 % (v/v) FCS und 100 U/ml Penicillin und 0,1 mg/ml Streptomycin zugefügt. Nach weiteren 20 - 24 h erfolgte die entsprechende Verwertung der Zellen.

HEK293 Zellen wurden unter Verwendung von Metafectene transfiziert. Die Zellen wurden am Vortag im 6-well-Format ausgelegt und bis zu einer Konfluenz von 60-80 % inkubiert. In einem Reaktionsgefäß wurden 100 µl serumfreies DMEM mit 4 µl Metafectene, in einem weiteren 100 µl serumfreies DMEM mit 1 µg DNA gemischt. Beide Ansätze wurden vereinigt, gemischt und 15 – 20 min inkubiert. Die Ansätze wurden mit 500 µl DMEM + 20 % FCS gemischt und tropfenweise zu den Zellen gegeben. Nach vorsichtigem Mischen durch Schwenken wurden die Zellen nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden für Experimente eingesetzt.

5.13 Immunblotting

Für einen Immunoblot wurden die Proben in Laemmli-Puffer (63 mM TrisHCl, pH 6,8, 2,5 % (w/v) SDS, 5 % (v/v) Glycerin, 5 % (v/v) β-Mercaptoethanol, 0,005 % (m/v) Bromphenolblau) aufgenommen und mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) entsprechend ihrer Größe aufgetrennt. Hierbei wurden 7,5 %ige, 10 %ige und 12 %ige Gele eingesetzt. Anschließend erfolgte ein Elektrotransfer der Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran nach dem „*semi-dry*“-Verfahren bei 1,5 mA pro cm² Gelfläche für 60 min. Als Transferpuffer diente ein 12,5 mM Tris-Puffer mit 0,96 mM Glycin und 10 % (v/v) Methanol. Zur Überprüfung des Proteintransfers bzw. zur Fixierung wurden die Membranen nach dem „*Blotting*“ mit 0,2 % (w/v) Ponceau S in 3 % (w/v) Trichloressigsäure gefärbt und freie Bindungsstellen durch 60-minütige Behandlung mit PBS, 0,1 % (v/v) Tween20, 5 % (w/v) Magermilchpulver bei RT blockiert. Anschließend erfolgte die Erstantikörperinkubation. Diese wurde in entsprechender Verdünnung entweder bei RT für 90 Minuten oder bei 4 °C über Nacht durchgeführt. Hierauf folgend wurde 3 x 10 min mit PBS, 0,1 % (v/v) Tween20 bei RT gewaschen. Die Zweitantikörper wurden 60 min mit einer Verdünnung von 1:20.000 für Anti-Maus IgG bzw. mit Anti-Kaninchen IgG in PBS, 0,1 % (v/v) Tween20, 5 % (w/v) Magermilchpulver bei RT inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS (je 10 min), 0,1 % (v/v) Tween20 bei RT erfolgte die Detektion der Meerrettich-Peroxidase gekoppelten Zweitantikörper durch Chemilumineszenzreaktion. Hierzu wurde die

Membran 1 min in ECL-Lösung inkubiert. Abschließend wurde ein Röntgenfilm aufgelegt und nach 0,5 bis 20 min Exposition entwickelt.

5.14 Proteinaufreinigung

Mit pGEX2T-NOSTRIN α , bzw. mit pGEX2T transformierte *E.coli* BL21 wurden bis zu einer OD_{600nm} von 0,6 bei 37 °C in 100 ml LB-Medium (mit 100 μ g/ml Ampicillin) inkubiert. Die Expression der GST-Fusionsproteine wurde durch Zugabe von 0,4 mM IPTG über eine Dauer von 3 h induziert. Die Bakterien wurden anschließend sedimentiert (4.000 g bei 4 °C) und mit eiskaltem PBS gewaschen. Zur Lyse wurde das Bakteriensediment mit 2 ml Lysepuffer (BugBuster mit 1kU Lysozym, 25 U Benzonase, 160 μ l Protease-Inhibitor-Cocktail) resuspendiert und 20 min bei RT unter Schwenken inkubiert. Nach 20-minütiger Zentrifugation mit 16.000 x g bei 4 °C wurde der Überstand weiterverwertet. Zur Aufreinigung des Fusionsproteins wurde GSH-Sepharose zunächst durch Zugabe von PBS und anschließender Zentrifugation bei 600 x g gewaschen. Der Vorgang wurde drei Mal wiederholt und die GSH-Sepharose anschließend 1:1 (v/v) in PBS aufgenommen. 120 μ l der gewaschenen GSH-Sepharose wurden mit dem Überstand 2 h bei 4 °C inkubiert. Abschließend folgten drei Sedimentations- und Waschschrte mit PBS bei 600 x g und 4 °C für 3 min. Die mit dem Fusionsprotein gekoppelte GSH-Sepharose wurde anschließend 1:1 (v/v) in PBS aufgenommen. Jeweils 10 μ l wurden in Laemmli-Puffer gekocht, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und durch Coomassi-Färbung quanti- und qualitativ analysiert.

5.15 GST-Pulldown aus Zelllysat

HEK293 Zellen wurden mit pRK5-Dab2 und pRK5-Synaptojanin wie unter Abschnitt 5.12 beschrieben transfiziert. CHO-eNOS-Zellen wurden in 10 cm Zellkulturschalen bis zur Konfluenz kultiviert. Die Zellen wurden dann mit eiskaltem PBS gewaschen und mit jeweils 1 ml OG-Puffer (60 mM β -Octyl-glycosid, 50 mM TrisHCl, pH 7,4, 125 mM NaCl, 2 mM DTT, 50 μ M EGTA, 1:12,5 Protease-Inhibitor-Cocktail) pro Zellkulturschale 1 h bei 4 °C unter Rotation lysiert. Die unlöslichen Bestandteile wurden durch 20-minütige Zentrifugation bei 13.000 g abgetrennt. Das Zelllysate wurde mit vergleichbaren Mengen an GSH-Sepharose gebundenem GST-Fusionsprotein, bzw. GST für 3 h bei 4 °C und unter Rotation inkubiert. Die an der GSH-Sepharose gebundenen Komplexe wurden durch Zentrifugation bei 600 x g und 4 °C für 3 Minuten abgetrennt. Nach dreimaligem Waschen mit Lysepuffer (ohne β -

Octyl-glycosid) erfolgte die Elution der präzipitierten Proteine mit 50 µl Laemmli-Puffer und anschließend der Proteinnachweis mittels Immunoblot.

5.16 Coimmunpräzipitation aus Lebergewebe

Humanes Lebergewebe wurde unter flüssigem Stickstoff mit einem Mörser pulverisiert. Eine Spatelspitze des Pulvers (ca. 20 mg) wurde in ein Reaktionsgefäß überführt und mit 1 ml OG-Lysepuffer (s.o.) versetzt. Die Probe wurden 1 h auf Eis inkubiert, wobei sie alle 10 min durch vortexen neu vermischt wurde. Anschließend erfolgte eine Abtrennung der unlöslichen Bestandteile durch Zentrifugation bei 13.000 x g und 4 °C für 20 min. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, zum Vorklären mit 100 µl Pansorbin versetzt und 30 min bei 4 °C unter Rotation inkubiert. Durch eine erneute Zentrifugation für 3 min bei 4 °C und 13.000 x g wurde das Pansorbin abgetrennt und der Überstand wiederum in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Nun erfolgte die Zugabe von 5 µl Kaninchen-anti-NOSTRIN, bzw. 5 µl Prä-Immunsereum aus Kaninchen. Nach einer Inkubation von 1 h bei 4 °C unter Rotation wurden jeweils 5µl A/G-Plus-Sepharose zugegeben, und alles gemeinsam wurde nochmals für 1 h inkubiert. Die an den Sepharosebeads gebundenen Antikörperkomplexe wurden durch 3 minütige Zentrifugation bei 600 x g und 4 °C sedimentiert und der Überstand verworfen. Die Proteinkomplexe wurden anschließend 3 x gewaschen, indem das Sediment in Waschpuffer (Lysopuffer ohne β-Octyl-glycosid) resuspendiert und jeweils 3 min bei 600 x g zentrifugiert wurde. Die copräzipitierten Proteine wurden durch Immunoblotting mit Maus-anti-NOSTRIN 1:5000, α-Caveolin (Kaninchen) 1:1000, bzw. α-eNOS (Maus) 1:1000 detektiert.

5.17 Immunfluoreszenzmikroskopie

CHO-eNOS und HeLa-Zellen wurden 20-24 h nach der Transfektion auf Deckgläschen kultiviert. Anschließend wurden die Zellen mit kaltem PBS gewaschen und durch Zugabe von eiskaltem Methanol (-20 °C) für 2 Minuten bei -20 °C fixiert. Nach dreimaligem Waschen mit kaltem PBS wurde zum Abblocken freier Bindestellen für 15 min Blocklösung (PBS / 0,1 % (v/v) Tween / 5 % (w/v) BSA) zugegeben. Für Einzel- und Doppelfärbungen wurden die Deckgläschen in eine abgedunkelte Feuchtkammer überführt und dort erfolgte eine 30-minütige Inkubation bei RT mit den entsprechenden Erstantikörpern aus unterschiedlichen Spezies in einer Verdünnung von jeweils 1:100 in PBS / 0,1 % (v/v) Tween / 5 % (w/v) BSA.

Nach dreimaligem, fünfminütigem Waschen mit PBS / 0,1 % (v/v) Tween wurden die Zellen 30 min bei RT mit den gegen die entsprechenden Spezies gerichteten FITC- oder Cy3-markierten Zweitantikörpern (PBS / 0,1 % (v/v) Tween / 5 % (w/v) BSA) inkubiert. Dann wurden die Zellen wiederum dreimal 5 min mit PBS / 0,1 % (v/v) Tween gewaschen, anschließend einmal mit Bidest, um in „Gel/Mount-Lösung“ + DABCO eingebettet zu werden. Anschließend wurden die Präparate am CLSM analysiert; die Dokumentation und Auswertung der Fluoreszenzaufnahmen erfolgte mit Hilfe der zugehörigen „LSM 5 Image Browser“-Software.

5.18 HE-Färbung von Kryoschnitten

Lebergewebe wurde nach der Entnahme kurz in PBS gewaschen und dann direkt in Tissue-Tek auf Trockeneis eingebettet. Die Lagerung des eingebetteten Gewebes erfolgte bei -80 °C. Unter Verwendung eines Kryostat wurden 12 µm dicke Schnitte angefertigt, die ebenfalls unter Feuchtigkeitsausschluss bei -80 °C gelagert wurden. Zur Färbung wurden die Schnitte bei RT für 30 min aufgetaut um anschließend der Reihe nach in folgenden Lösungen inkubiert :

Hematoxylin	1 min
H ₂ O	2 x 1 min
Eosin (0,1 % in 0,01% Essigsäure)	3 min
H ₂ O	1 min
Ethanol 70 %	1 min
Ethanol 80 %	1 min
Ethanol 96 %	1 min
Ethanol 100 %	1 min
Xylol	2 x 1 min

Nach der Färbung wurde auf die Schnitte ein Tropfen Entelan gegeben und alles mit einem Deckglas eingedeckelt.

5.19 Immunhistochemie-Färbung von Lebergewebe

Das Anfertigen der Schnitte und auch die Lagerung wurde wie bei der HE-Färbung durchgeführt. Die Schnitte wurden bei RT für 30 min aufgetaut und anschließend für 20 min in eiskaltem Aceton bei -20 °C fixiert, wobei auch das Tissue-Tek gelöst wird. Nach Abdampfen des Acetons wurde um die Schnitte mit einem Fettstift eine kreisförmige

Umrahmung gezogen. Anschließend erfolgt die Rehydrierung der Schnitte sowie die Demaskierung durch Natriumcitrat-Puffer (10 mM, pH 6) mit folgenden Lösungen:

Xylol	2 x 5 min
Ethanol 96 %	2 min
Ethanol 70 %	2 min
1 M Na-Citratpuffer pH 6	5 min kochen
H ₂ O	2 x 1 min

Die Schnitte wurden anschließend mit 5 % BSA in PBS für 1 h geblockt, um dann den einzelnen Färbungen unterzogen zu werden. Für die Färbungen wurden drei NOSTRIN-Antikörper verwendet: Kaninchen-anti-NOSTRIN, Maus-anti-NOSTRIN und Maus-anti-NOSTRIN(Aszites). Um die Spezifität der Färbung überprüfen zu können, wurde ein Teil der Antikörper mit an GSH-Sepharose gebundenem GST-NOSTRIN für 2 Stunden bei 4 °C rotiert. Hierbei wurden die Antikörperlösungen vorgeklärt, den Lösungen also die NOSTRIN-spezifischen Antikörper entzogen. Nach Zentrifugation zum Abtrennen der Sepharose wurde der Überstand für die negativen Kontrollfärbungen verwendet. Für die Färbung der Schnitte wurden die Antikörper sowie die vorgeklärten Seren in einem Verhältnis von 1:20 in 5 % BSA / 0,1 % (v/v) Tween / PBS verdünnt und für 1 h in einer dunklen Feuchtkammer auf den Schnitten inkubiert. Nach dreimaligem, fünfminütigem Waschen mit PBS / 0,1 % (v/v) Tween / 0,1 % BSA wurden die Schnitte 30 min bei RT mit den Cy3-gekoppelten anti-Maus-, bzw. anti-Kaninchen-Antikörpern (PBS / 0,1 % (v/v) Tween / 5 % (w/v) BSA) inkubiert. Dann wurden die Schnitte wiederum dreimal 5 min mit PBS / 0,1 % (v/v) Tween / 0,1 % BSA gewaschen, anschließend einmal mit Bidest um in „Gel/Mount-Lösung“ + DABCO eingebettet zu werden. Anschließend wurden die Präparate am CLSM analysiert; die Dokumentation und Auswertung der Fluoreszenzaufnahmen erfolgte mit Hilfe der „LSM 5 Image Browser“-Software.

5.20 real-time-PCR: Das Taqman-Prinzip

Der Vorteil dieser Methode zu der in den 80er Jahren von K. B. Mullis entwickelten Polymerasen-Kettenreaktion („*Polymerase Chain Reaction*“, PCR) liegt in der Möglichkeit, durch Detektion von Fluoreszenzsignalen den Verlauf der Reaktion in Echtzeit verfolgen zu können. Hierdurch werden direkt Rückschlüsse auf die Ausgangs cDNA- bzw. mRNA-Menge und des Expressionsspiegel zugelassen. Zur Detektion der Fluoreszenzsignale wurden für alle Ansätze so genannte TaqMan-Sonden verwendet. Bei diesem Prinzip (Abb. VIII), auch 5'-

Nuklease-Assay genannt, binden die mit Reporter und Quencher markierten Hybridisierungs sonden am komplementären Zielstrang zwischen den Primerbindungsstellen. Bei dem Reporter handelt es sich um ein Fluorophor, welches in der Anregungswellenlänge des Quenchers sein Emissionsmaximum hat. Der Quencher sorgt daher im Fall räumlicher Nähe für eine Unterdrückung des Reportersignals (Abb. VIII-A). Bei einer Amplifikation (Abb. VIII-B) wird die Hybridisierungssonde durch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase in kleine Fragmente geschnitten und aus dem Zielstrang freigesetzt. Reporter- und Quencher moleküle liegen dann getrennt im Reaktionsgemisch vor, so dass die gemessene Zunahme an Reporterfluoreszenz mit jedem PCR-Zyklus direkt mit der PCR-Produktzunahme korreliert. Da die Taq-Polymerase ihre 5'-3'-Exonukleaseaktivität nur am DNA-Doppelstrang entfaltet, bleiben nichthybridisierte Sonden moleküle intakt und tragen nicht zum Fluoreszenzsignal bei.

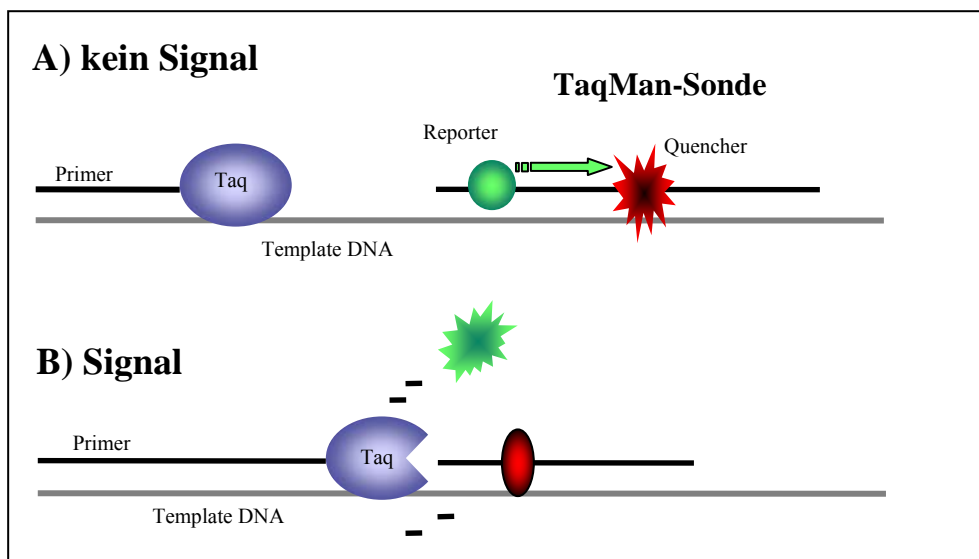


Abbildung VIII: TaqMan-Prinzip

A) Die Taq-Polymerase beginnt am Primer die *template*-DNA abzulesen und den komplementären DNA-Strang zu synthetisieren. Derweil ist die TaqMan-Sonde ebenfalls an der *template*-DNA gebunden, das Reportersignal wird jedoch vom Quencher aufgenommen und somit unterdrückt. **B)** Die Taq-Polymerase spaltet durch ihre 5'-3'-Exonukleaseaktivität die TaqMan-Sonde, wodurch der Reporter freigesetzt und sein Signal zugänglich wird.

In allen Experimenten wurde folgender Ansatz für die Analyse auf das Vorhandensein einer spezifischen cDNA verwendet:

25 µl iQ Supermix (2x)

2,5 µl Gene Expression Assay Mix (Primer und Fam-Sonde)

22,5 µl DNA in H₂O

Diese jeweils 50 µl wurden für eine Doppelbestimmung auf 2 x 25 µl pro *well* in eine „96-*well*“-Platte aufgeteilt, mit einem optischen Film verschlossen und mit nachstehendem Protokoll amplifiziert:

50 °C 2 min (Aktivierung)

95 °C 3 min

(95 °C 30 sec, 60 °C 1 min) 50x

Die Auswertung erfolgte über die iCycler-Software, in welcher die C_T-Werte (*threshold cycle*), d.h. die Zykluszahl, bei welcher der exponentielle Anstieg des Fluoreszenzsignals beginnt, den Probeansätzen zugewiesen wurden. Hierbei berechnet die Software für jede Probe aufgrund ihrer Hintergrundfluoreszenz eine Basislinie, welche von den direkt gemessenen Werten subtrahiert wird. Der *threshold* (Schwellenwert), kann nicht für jede Probe einzeln berechnet werden, sondern wird durch die gemeinsam auszuwertenden Proben über eine maximale Annäherung nach Berechnung der zweiten Ableitung jeder Amplifikationskurve bestimmt. Im Fall der Bestimmung einer Standardkurve werden die so ermittelten C_T-Werte für eine lineare Regression nach der Methode der kleinsten Fehlerquadrate verwendet. Ein weiterer wichtiger Faktor ist die PCR-Effizienz, die bei einer theoretischen Verdopplung des Produktes pro Zyklus bei 100 % liegt. Die iCycler-Software berechnet aus der Steigung der Standardkurve die PCR-Effizienz nach folgender Formel:

$$\text{Exponentielle Amplifikation} = 10^{(-1/\text{Steigung})}$$

$$\text{Effizienz} = [10^{(-1/\text{Steigung})}] - 1$$

Um die Ergebnisse einer vergleichenden qRT-PCR quantitativ in Zahlen ausdrücken zu können, muss die PCR-Effizienz aller verwendeten Assays gleich sein, bzw. müssen die Unterschiede verrechnet werden. Auf Letzteres wurde in dieser Arbeit verzichtet, da lediglich relative Zu- und Abnahmen analysiert wurden. Um sicher zu gehen, dass man die selben cDNA-Mengen pro Experiment analysiert hat, muss im Fall eines Expressionsvergleichs-

Experiments ein so genannter *housekeeper* als Normierungsfaktor ebenfalls amplifiziert werden. Auswahlkriterien für diesen sind ein gleichbleibendes Expressionsmuster in den unterschiedlichen Versuchsbedingungen sowie eine Expressionsrate möglichst ähnlich zu derjenigen der zu untersuchenden Proteine. Hier wurde Ubiquitin-C (UBC) verwendet.

5.20.1 Etablierung der Assays für NOSTRIN α und NOSTRIN β

Jeweils 200 ng, 20 ng, 2 ng, 200 pg, 20 pg, 2 pg und 200 fg der Plasmide pcDNA-3.1A-NOSTRIN α und pcDNA-3.1B-E1NOSTRIN β werden im 50 μ l-Reaktionsansatz zur Bestimmung der Sensitivität und der PCR-Effizienz der beiden Assays verwendet. Um die Spezifität beider Assays zu verifizieren, bzw. eine mögliche Kreuzreaktivität ausschließen zu können, werden Ansätze aus den Assays für NOSTRIN α und NOSTRIN β jeweils mit entweder 40 pg pcDNA-3.1B-E1NOSTRIN β , pcDNA-3.1B-NOSTRIN α oder Wasser getestet. Die Auswertung erfolgte durch die iCycler-Software.

5.20.2 Analyse von Hep3B-Zellen: Retinsäurestimulation und NMD

Hep3B-Zellen wurden im *6-well*-Format ausgelegt und für 6 Tage entweder mit 1 μ M Retinsäure (gelöst in DMSO) oder nur DMSO (*mock*) inkubiert. Für die Untersuchung auf den NMD wurden die Zellen 3 h mit 100 μ M CHX vorinkubiert. Hierauf wurden die Zellen zwei Mal mit PBS gewaschen und die Gesamt-RNA unter Verwendung von 0,5 ml TRI-Reagent® nach Herstellerangaben isoliert. Für die anschließende reverse Transkription mit dem iScript-Kit® wurden jeweils 0,5 μ g RNA im 50 μ l Ansatz verwendet. Mit jeweils 4 μ l der erhaltenen cDNA pro 50 μ l-Ansatz folgte die Analyse mittels qRT-PCR auf Transkriptionsveränderungen der NOSTRIN α - und NOSTRIN β -mRNA, als *housekeeper* diente UBC.

5.20.3 Analyse von Lebergewebe

Leberbiopsie-Proben wurden nach der Entnahme direkt in flüssigen Stickstoff schockgefroren und gelagert. Lebergewebe von Patienten mit Zirrhose, mit zusätzlicher alkoholischer Hepatitis sowie gesunden Personen wurden im einfachen Blindversuch untersucht. Unter flüssigem Stickstoff wurde das Gewebe durch Mörsern zerkleinert. Die Proben wurden

komplett in ein Reaktionsgefäß überführt und unter Verwendung von 0,5 ml TRI-Reagent® die Gesamt-RNA und - wenn aufgrund der Probengröße möglich - der Proteinanteil isoliert und nach grober Mengenabschätzung in entsprechenden Volumen Laemmli-Puffer aufgenommen. Ungefähr gleiche Proteinmengen wurden per SDS-PAGE aufgetrennt und im Immunoblot analysiert. Die gesamte erhaltene RNA wurde über reverse Transkription in cDNA umgeschrieben und von dieser anschließend gleiche Mengen mittels qRT-PCR auf die mRNA-Menge von eNOS, Caveolin-1, NOSTRIN α und NOSTRIN β analysiert. Die TaqMan-Assays für eNOS und Caveolin-1 waren bereits etabliert, als *housekeeper* wurde wieder UBC verwendet. Die Auswertung der C_T-Werte erfolgte durch die iCycler-Software.

5.21 Electromobility Shift Assay (EMSA)

Bei dieser Methode wird die Interaktion eines markierten DNA-Oligomers mit Proteinen anhand einer Veränderung der Laufstrecke des Oligomers, einen sogenannten *shift*, in einem nativen Polyacrylamid-Gel detektiert. Da nur das veränderte Laufverhalten des Oligomers beobachtet wird, ist bei einem Experiment unter Verwendung des gesamten nukleären Extraktes noch nicht klar, welches Protein an das DNA-Oligomer gebunden hat. Um die Bindung bestimmter Proteine nachzuweisen, wird zusätzlich ein spezifischer Antikörper gegen dieses Protein zu dem Ansatz gegeben. Dieser bildet dann mit dem DNA-Oligomers und dem bereits gebundenen Protein einen noch größeren Komplex, was wiederum eine Verkürzung der Laufstrecke im Gel verursacht und als *supershift* detektiert wird.

Für die Herstellung der Sonde wurde der Sequenzbereich von -1 bis -200 vor dem NOSTRIN α -Start-Codon unter Verwendung der Primer NST-1-20_rev und NST-180-200_for mittels PCR aus DNA von Hep3B-Zellen kloniert. Nach Aufreinigung über ein 2 %iges Agarosegel und Isolierung aus diesem mit dem *Gel-Extraction-Kit* von Qiagen wurde das DNA-Oligomer an seinem 5'-Ende mit ³²P-markiert: 400 ng Oligo, 50 μ Ci γ -³²P-ATP, 1 U T4-Polynukleotidkinase sowie der T4-PNK-Puffer wurden im 20 μ l Ansatz für 30 min bei 37 °C inkubiert. Die markierte Sonde wurde anschließend mit dem *PCR-Purification-Kit* von Qiagen aufgereinigt und ebenso wie das unmarkierte DNA-Oligomer bei -20 °C aufbewahrt. Direkt vor der Verwendung im EMSA wurde die Aktivität der Sonde unter Verwendung eines *Liquid Scintillation Analyser* bestimmt, in dem 1 μ l in 1 ml Szintillationsflüssigkeit vermessen wurde.

Mit pcDNA-3.1B-NST β , bzw. *mock*-transfizierte HeLa-Zellen auf 10 cm-Schalen wurden 20 h nach der Transfektion zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und anschließend mit 960 μ l EMSA-Puffer A (10 mM HEPES pH 7,8; 10 mM KCl; 0,1 mM EDTA; 0,1 mM EGTA; 1 mM DTT; 1: 25 Protease-Inhibitor-Cocktail) auf Eis inkubiert. Nach 15 min wurden 40 μ l 10 %iges TritonX100 zugegeben und alles für weitere 15 min inkubiert. Anschließend wurden die Zellen abgeschabt und die Zellsuspension in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Nach Zentrifugation von 20 min bei 13.000 rpm („Biofuge pico“) bei 4 °C wurde der Überstand abgenommen und das Pellet in 100 μ l EMSA-Puffer B (10 mM HEPES pH 7,8; 400 mM NaCl; 1 mM EDTA; 1 mM EGTA; 1mM DTT; 20 % (v/v) Glycerin; 1: 25 Protease-Inhibitor-Cocktail) aufgenommen. Nach Resuspendieren wurde die Lösung für 30 min auf Eis inkubiert und anschließend wieder zentrifugiert (20 min, 4 °C, 13.000 rpm). Der Überstand („Kernextrakt“) wurde in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, die Proteinkonzentration nach Bradford bestimmt.

Für den EMSA wurden 5 μ g Kernextrakt, 0,1 μ g Poly(dI-dC), 1×10^6 cpm der Sonde und 1 x EMSA-Puffer (5mM HEPES pH 7,8; 5 mM MgCl₂; 100mM KCl; 0,5 mM DTT; 10 % (v/v) Glycerin) im 30 μ l Ansatz für 30 min auf Eis inkubiert. Als Kontrolle der spezifischen Bindung des DNA-Oligomers wurde zu jedem Ansatz eine Kompetitionskontrolle mitgeführt. Zu diesem Zweck wurde der Kernextrakt vor der Zugabe der markierten Sonde für 10 min mit einem 100fachen Überschuss des unmarkierten DNA-Oligomers vorinkubiert. Als Kontrolle der spezifischen Bindung von NOSTRIN β an die Sonde wurde des Weiteren für jeden Ansatz noch eine Supershift-Kontrolle mitgeführt. Hierfür wurde nach der Inkubation des Kernextraktes mit der markierten Sonde jeweils 1 μ l Kaninchen-anti-NOSTRIN zugegeben und alles weitere 30 min auf Eis inkubiert. Da es sich bei diesem Antikörper um einen Serumhaltigen Antikörper handelt, wurde als letzte Kontrolle auf unspezifische Bindungen des Antikörpers und der Sonde eine Kontrolle mitgeführt, in der sich kein Kernextrakt befindet. Anschließend erfolgte die Auftrennung der Proben unter nicht reduzierenden und nicht denaturierenden Bedingungen in einem 5 %igen Polyacrylamid-Gel (10 % Dichtungsgel) bei 180 V für 6 Stunden. Nach der Gelelektrophorese wurde das Gel auf Chromatographiepapier mit Frischhaltefolie abgedeckt in einem Gelrockner bei 80 °C für 2 Stunden getrocknet. Der Nachweis des gebundenen Oligos erfolgte auf Kodak Biomax MS Filmen.

6 Ergebnisse

6.1 *NOSTRIN* in zirrhotischer Leber

Wie bereits einführend erwähnt, ist die eNOS-Aktivität in zirrhotischer Leber im Vergleich zu normaler Leber verringert. Bei einer weiteren Verschärfung des Krankheitsbildes durch eine zusätzliche alkoholische Hepatitis werden nochmals verminderte NO-Freisetzungen gemessen, und das Ausmaß der Abnahme kann auch hier nicht durch eine Verminderung der eNOS-Expression erklärt werden. Der Mechanismus, der zu einer Verringerung der eNOS-Aktivität bei einer portalen Hypertonie während einer Zirrhose führt, ist noch nicht vollständig aufgeklärt und wird derzeit kontrovers diskutiert. Ob *NOSTRIN* eine Bedeutung innerhalb dieses Prozesses haben könnte, wird in den folgenden Experimenten untersucht.

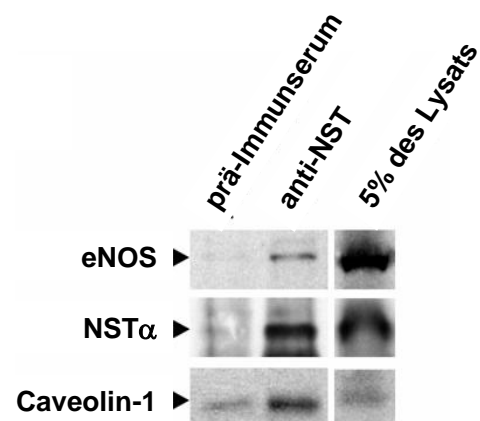
6.1.1 *NOSTRIN* α interagiert mit eNOS und Caveolin-1 in Leber

Im Hinblick auf die erniedrigte eNOS-Aktivität bei einer Leberzirrhose soll überprüft werden, ob *NOSTRIN* α als „molekulare Klammer“ für eNOS und Caveolin-1 in Lebergewebe fungieren kann. In einem ersten Versuch wird daher eine Co-Immunpräzipitation mit anti-*NOSTRIN* und humanem Leberlysat durchgeführt. Wie in Abbildung 1 zu sehen ist, co-präzipitieren eNOS und Caveolin-1 mit *NOSTRIN* α aus komplettem Leberlysat, was darauf hinweist, dass der Komplex auch in Leber vorliegen kann.

Ob die drei Proteine im intakten Gewebe in den selben Zelltypen vorkommen und somit wirklich die Möglichkeit zur Interaktion gegeben ist, wird im Folgenden analysiert.

Abbildung 1:

NOSTRIN α interagiert mit eNOS und Caveolin in Leber. Humane Leber wurde unter flüssigem Stickstoff zerkleinert und anschließend lysiert. Die Co-Immunpräzipitation wurde mit Kaninchen-anti-*NOSTRIN* durchgeführt. Western-Blots der Co-Immunpräzipitate und Lysate wurden mit anti-eNOS, anti-*NOSTRIN* and anti-Caveolin-1 aus der Maus entwickelt. eNOS und Caveolin-1 Co-Immunpräzipitieren mit *NOSTRIN* aus totalem Leberlysat.



6.1.2 NOSTRIN ist innerhalb der Leber in vaskulärem Endothel und Hepatozyten exprimiert

Um zu überprüfen in welchen Zelltypen der Leber NOSTRIN exprimiert wird, werden Immunhistochemie-Färbungen angefertigt. Hierfür werden aus humaner Leber 12 µm Kryoschnitte angefertigt, die anschließend entweder für HE-Färbungen oder für Antikörperfärbungen eingesetzt werden. Um die Spezifität der Antikörperfärbung nachweisen zu können, werden zwei unterschiedliche NOSTRIN-Antikörper verwendet: Kaninchen-anti-NOSTRIN (12.3-2) sowie Maus-anti-NOSTRIN (G6), letzterer in zwei unterschiedlichen Aufreinigungen (G6 und G6A). Um spezifische von unspezifischen Signalen unterscheiden zu können, werden die Antikörperlösungen mit an GSH-Sepharose gebundenem GST-NOSTRIN vorgeklärt. In Abbildung 2a-g sind sieben im Gewebe aufeinander folgende Schnitte gezeigt, die den unterschiedlichen Färbungen unterzogen wurden. Abb. 2a) zeigt eine HE-Färbung, in welcher durch die violette Zellkernfärbung zum einen das vaskuläre Endothel

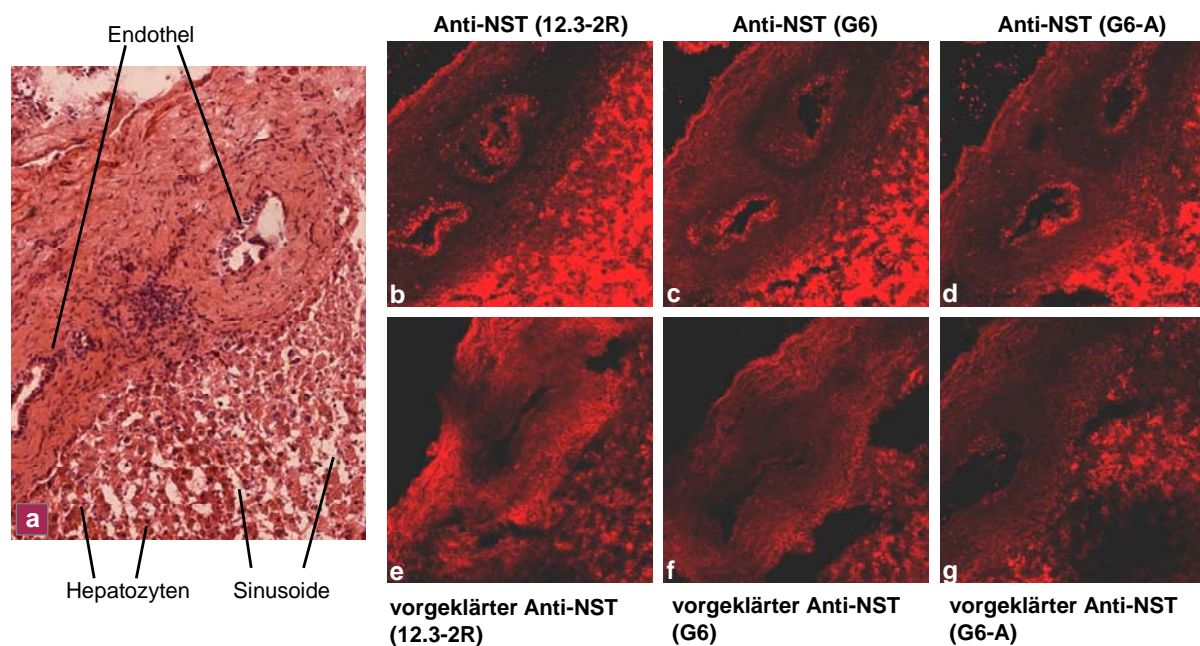


Abbildung 2:

NOSTRIN wird sich im vaskulärem Endothel und in Hepatozyten exprimiert. Leberproben wurden in TissueTek zur Kryokonservierung eingebettet. 12 µm Schnitte wurden zur HE-Färbung (a) oder Immunhistochemie eingesetzt (b-g). Ein polyklonaler (b) und monoklonaler (in zwei unterschiedlichen Aufreinigungen) (c+d) NOSTRIN-Antikörper wurde zum Markieren verwendet. Zur Kontrolle wurden die Antikörper vor der Verwendung mit GST-NOSTRIN (e-g) vorgeklärt.

zweier Gefäße deutlich sichtbar ist, und zum anderen die schwammartige Struktur der Sinusoide mit den umgebenden Hepatozyten. In den Färbungen mit den verschiedenen NOSTRIN-Antikörpern (Abb. 2b-d) ist jeweils sowohl ein Signal im Endothel zu sehen als auch eine starke Färbung der Hepatozyten. Im Vergleich hierzu sind die Signale mit den vorgeklärten Antikörpern (Abb. 2e-g) deutlich schwächer. Hierdurch ist gezeigt, dass NOSTRIN in Lebergewebe in den selben Zelltypen vorkommt wie die eNOS und somit eine Interaktion zwischen den beiden Proteinen *in vivo* in der Leber möglich ist.

6.1.3 Etablierung der qRT-PCR

Die in unserem Labor verfügbaren NOSTRIN-Antikörper sind alle gegen ein Epitop im C-terminalen Bereich von NOSTRIN gerichtet. Somit detektieren sie zwar beide Isoformen, NOSTRIN β kann aber nicht spezifisch von Abbauprodukten des NOSTRIN α unterschieden werden. Da die beiden Isoformen sich auf der mRNA-Ebene unterscheiden lassen, werden für NOSTRIN α und NOSTRIN β qRT-PCR-Assays etabliert. Hierzu wird zunächst ein mRNA-Mimikry der NOSTRIN β -mRNA kloniert, indem während einer PCR das Spleißen von Exon-2 simuliert wird. Als *template* dient das bereits vorhandene Plasmid pcDNA-3.1B-NOSTRIN α , so dass als Produkt das Plasmid pcDNA-3.1B-E1NOSTRIN β erhalten wird.

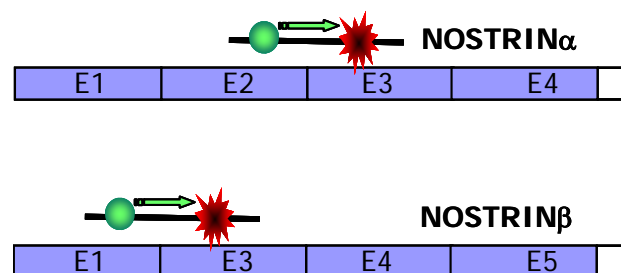


Abbildung 3:

Etablierung der qRT-PCR für NOSTRIN α und NOSTRIN β . Um die beiden Isoformen in der qRT-PCR unterscheiden zu können, wurden zwei TaqMan-Assays entwickelt. Im TaqMan-Ansatz befinden sich spezifische Primer sowie eine spezifische Sonde, an welcher das Signalmolekül (Reporter, grün) als auch ein Quencher (rot) gekoppelt sind. Während der Elongation spaltet die Taq-Polymerase den Reporter ab und das Signal wird freigesetzt. Im Fall von NOSTRIN α bindet die Reporter-Sonde am Exon2-Exon3-Übergang, die Sonde gegen die NOSTRIN β -cDNA dagegen am Exon1-Exon3-Übergang, so dass eine Kreuzreaktivität ausgeschlossen werden kann.

Die qRT-PCR wird mittels TaqMan-Assays durchgeführt, da mit diesem Ansatz am einfachsten spezifisch zwischen NOSTRIN α und NOSTRIN β unterschieden werden kann. Hierfür werden Sonden entworfen, die im Fall von NOSTRIN α am Exon2-Exon3-Übergang, im Fall von NOSTRIN β am Exon1-Exon3-Übergang binden (Abb. 3).

Die beiden Assays werden mittels der Plasmide, die die entsprechende cDNA enthalten, auf ihre Effizienz sowie ihre Sensitivität überprüft. Anhand der erhaltenen *threshold cycles* (C_T -Wert), also den Zykluswerten, bei welchen der Detektionsschwellenwert überschritten wird, kann die tatsächliche PCR-Effizienz (theoretisch 100 %) über Lineare Regression berechnet werden. Die Sensitivität der Assays wird über den minimalen und maximalen C_T -Wert bestimmt, bei denen das Signal noch immer mit einer linear verlaufenden PCR-Effizienz beschrieben werden kann. Im Fall des NOSTRIN α -Assays beträgt die PCR-Effizienz 97,5 % im Bereich von $C_T = 10$ bis $C_T = 25$, für den NOSTRIN β -Assay beträgt die PCR-Effizienz 103,9 % im Bereich von $C_T = 10$ bis $C_T = 25$. Anzumerken ist hier, dass die Sonde des NOSTRIN α -Assays ab ca. Zyklus 33 falsch-positive Signale gibt, für die Sonde des NOSTRIN β -Assays wird dagegen bis zu Zyklus 60 kein Signal in der Negativkontrolle (H_2O) detektiert.

Da in beiden Assays die selben Primer verwendet wurden und auch die Sonden beide mit einer Hälfte an Exon-3 binden, muss die Spezifität beider Assays noch verifiziert werden. Hierfür werden Ansätze aus den Assays für NOSTRIN α und NOSTRIN β jeweils mit entweder 40 pg pcDNA-3.1B-E1NOSTRIN β , pcDNA-3.1B-NOSTRIN α oder H_2O getestet. Wie in Tabelle 3 zu sehen ist, sind die jeweiligen Assays für die Isoformen spezifisch. Die Sonde gegen NOSTRIN β gibt kein Signal für NOSTRIN α , ebenfalls kein Signal unter Verwendung von H_2O . Die Sonde von NOSTRIN α hingegen gibt hier ab Zyklus 33 falsch positive Signale.

Plasmid	NOSTRIN β	NOSTRIN β	H_2O	NOSTRIN α	NOSTRIN α	H_2O
Assay	NOSTRIN β	NOSTRIN α	NOSTRIN β	NOSTRIN α	NOSTRIN β	NOSTRIN α
C_T -Wert	11,4	35,95	-	12,12	-	33

Tabelle 3:

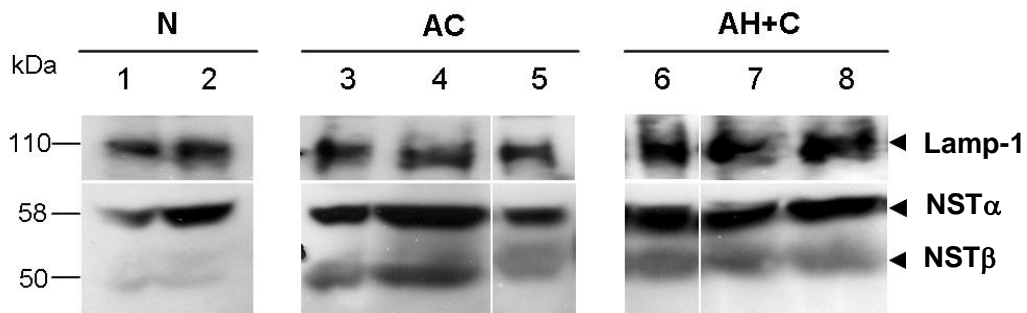
Die qRT-PCR-Assays gegen NOSTRIN α und NOSTRIN β weisen keine Kreuzreaktivität auf. Um die Spezifität der hergestellten Assays zu überprüfen, wurden Ansätze aus den Assays für NOSTRIN α und NOSTRIN β jeweils mit entweder pcDNA-3.1B-E1NOSTRIN β , pcDNA-3.1B-NOSTRIN α oder aber Bidest verwendet.

6.1.4 Die Expression der NOSTRIN-Isoformen ist in krankhaftem Gewebe erhöht

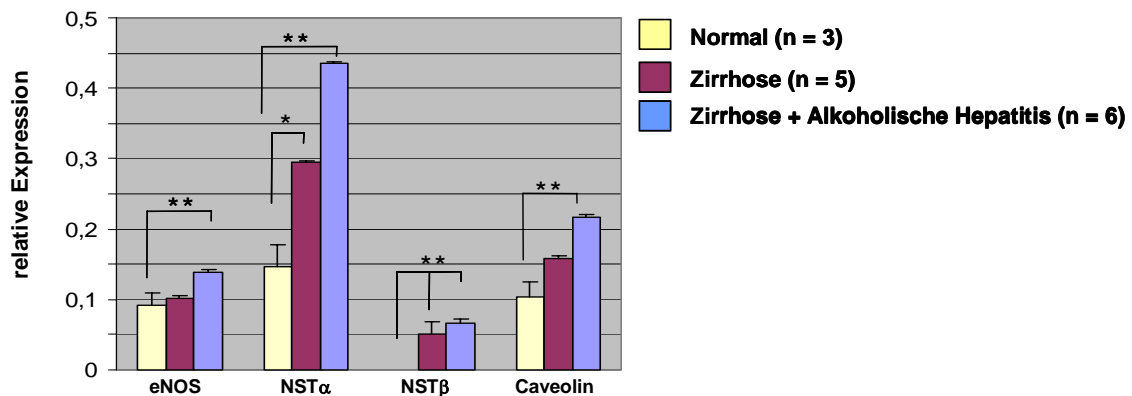
Ob NOSTRIN Einfluss auf die eNOS-Aktivität in der Leberzirrhose haben könnte, soll im Folgenden über eine Expressionsanalyse in Leberproben untersucht werden (zur Verfügung gestellt und charakterisiert von Dr. Jalan am *UCL Institute of Hepatology, Division of Medicine, University College London, UK*). Hierfür werden Leberbiopsien aus Patienten mit alkoholischer Zirrhose (AC) oder einer zusätzlichen alkoholischen Hepatitis (AC+H), sowie von gesunden Testpersonen entnommen. Bei allen Patienten wird zuvor das Ausmaß der portalen Hypertonie sowie die NO-Freisetzung im Gewebe bestimmt, das Ergebnis ist eine reverse Korrelation: Je höher der messbare portale Druck, umso weniger NO wird freigesetzt (Daten von Dr. Mookerjee, *UCL Institute of Hepatology, Division of Medicine, University College London, UK*)¹¹⁶. Die Proben werden mittels qRT-PCR auf die mRNA-Menge von eNOS, NOSTRIN α , NOSTRIN β sowie den bekannten eNOS Inhibitor Caveolin-1 analysiert. Die TaqMan-Assays für eNOS und Caveolin-1 wurden bereits zuvor etabliert⁶⁷, als *housekeeper* wird Ubiquitin-C verwendet. Genügend große Leberproben werden zusätzlich auf die Protein-Expression von NOSTRIN α und NOSTRIN β analysiert. Hierbei wird die aufgetragene Proteinmenge an die der kleinsten Proben angepasst. Zur Kontrolle der verwendeten Proteinmenge pro Probe wird die Membran mit einem Antikörper gegen Lamp-1 inkubiert. Lamp-1 ist ein Markerprotein für Lysosomen, das anders als z. B. die gängigen Protein-Ladekontrollen Aktin oder GAPDH während einer Zirrhose in seiner Expression nicht beeinflusst wird. Die Proteinexpression von NOSTRIN α und NOSTRIN β in den Proben aus den Zirrhose-Patienten liegt deutlich höher als in denjenigen aus gesunden Testpersonen (Abb. 4A, vgl. N mit AC und AH+C).

Dieses Ergebnis wird auf der RNA-Ebene durch *real-time-PCR* bestätigt (Abb. 4B). Als Mittelwert über alle Proben einer Patientengruppe sind die Ergebnisse als Wert der relativen Expression für die gemessenen Menge an mRNA für eNOS, NOSTRIN α , NOSTRIN β und Caveolin-1 gezeigt. Für eNOS wird eine leichte, aber signifikante Erhöhung ($p < 0,01$) im Vergleich der Proben aus Patienten mit alkoholischer Zirrhose und zusätzlicher Hepatitis zu den Proben aus gesunder Leber festgestellt. Eine Erhöhung im Vergleich dieser beiden Gruppen wird auch für Caveolin-1 festgestellt, ebenfalls signifikant mit $p < 0,01$. Auch die *real-time-PCR* bestätigt die bereits im Western-Blot detektierte erhöhte Expression von NOSTRIN α . Bereits im Vergleich der Proben aus normaler Leber mit der von zirrhotischer

A)



B)

**Abbildung 4:**

Das Expressionsniveau von *NOSTRIN α* und *NOSTRIN β* ist im pathogenen Gewebe stark erhöht. RNA und Protein wurde aus Biopsieproben alkoholisch-zirrotischer (AC), alkoholisch-zirrotischer mit zusätzlicher Hepatitis (AH+C) sowie normaler (N) Leber isoliert. **A)** Proteine wurden per SDS-PAGE sowie anschließendem Western Blot mit Maus-anti-NOSTRIN auf die Expression von *NOSTRIN α* und *NOSTRIN β* untersucht. Um die Gesamtmenge der aufgeladenen Proteine abzuschätzen ist Lamp-1 als Marker gezeigt. **B)** Die RNA wurde in cDNA umgeschrieben und mit qRT-PCR analysiert. Die Werte sind auf Ubiquitin-C normiert und als relative Expression angegeben. AH+C-Patienten haben im Vergleich zu AH-Patienten signifikant erhöhte eNOS- und Caveolin-1 mRNA-Menge (beide: $p < 0,01$). AH Patienten zeigen für beide mRNAs hingegen keine signifikante Veränderung im Vergleich zu Proben aus Normalgewebe. Die *NOSTRIN α* und *NOSTRIN β* mRNA-Menge in AH+C-Patienten im Vergleich zu AH-Patienten sind ebenfalls signifikant erhöht ($p < 0,01$), ebenfalls signifikant ist hier auch die Erhöhung im Vergleich AH-Patienten gegen Normalgewebe ($p < 0,05$). Interessanter Weise konnte *NOSTRIN β* nicht in normalem Lebergewebe detektiert werden, sondern ausschließlich in Proben aus AH- und AH+C-Patienten. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$

Leber zeigt sich eine Verdopplung der *NOSTRIN α* -Werte (signifikant mit $p < 0,05$). Im Vergleich von Proben aus normaler Leber mit denen aus Patienten mit einer zusätzlichen alkoholischen Hepatitis sogar eine Verdreifachung ($p < 0,01$). *NOSTRIN β* hingegen wird in Proben aus gesunder Leber nicht detektiert, sehr wohl aber in den Proben aus beiden

Patientengruppen ($p < 0.01$). Jedoch steigt die Menge bei einer zusätzlichen Hepatitis nicht mehr signifikant an (vgl. AC mit AH+C).

Die starke Erhöhung der NOSTRIN α - und NOSTRIN β -Mengen auf mRNA- und Proteinebene in zirrhotischer Leber könnte gemeinsam mit der schwachen Erhöhung der Caveolin-1-mRNA-Menge eine Erklärung für die verringerte eNOS-Aktivität sein.

6.2 Charakterisierung von NOSTRIN β

Nachdem die zuvor unbekannte Isoform NOSTRIN β in zirrhotischer Leber auf mRNA-Ebene nachgewiesen werden konnte, und auf Proteinebene mit dem NOSTRIN-Antikörper auch eine Bande auf 50 kDa detektiert wurde, soll diese Isoform im Folgenden näher charakterisiert werden.

6.2.1 Stimulation der Expression von NOSTRIN α und NOSTRIN β

Die endogene Expression von NOSTRIN α in der Zellkultur konnte bisher nur in primären Endothelzellen nachgewiesen werden, NOSTRIN β wurde bisher nicht detektiert. Mit einem neuen monoklonalen Antikörper (Maus-anti-NOSTRIN), werden nochmals die verfügbaren Zelllinien auf endogene NOSTRIN-Expression untersucht. Hierbei zeigt sich, dass nicht nur HUVECs, sondern auch die humane Hepatozyten-Zelllinie Hep3B NOSTRIN α endogen exprimieren. Auch im Lebergewebe konnte eine Expression von NOSTRIN in Hepatozyten gezeigt werden (Abb. 2). 2002 wurde für das PCH-Protein CIP4 berichtet, dass sich dessen Expression durch Retinsäure stimulieren lässt¹⁷. Da Retinsäure innerhalb der Leber ein wichtiger Botenstoff ist und die Expression von über 500 Genen reguliert, soll im Folgenden der Einfluss einer Retinsäure-Stimulation untersucht werden.

Hep3B-Zellen und HUVECs werden für 1-6 Tage mit 1 μ M Retinsäure, bzw. *mock*-inkubiert (DMSO). Die Analyse der Lysate mit Maus-anti-NOSTRIN im Western-Blot zeigt für HUVECs keine erhöhte NOSTRIN-Expression (Daten nicht gezeigt). Wie jedoch in Abb. 5A) zu sehen ist, wird die Expression von NOSTRIN α in Hep3B-Zellen bereits nach 3 Tagen hochreguliert, nach 6 Tagen ist die maximale Expression erreicht (längere Inkubation der Hep3B-Zellen mit RA bewirkt keine weitere Veränderung). Unter längerer Belichtung des Films (Abb. 5B) kann nach Retinsäure-Stimulation zusätzlich eine Bande von 50 kDa

detektiert werden, wobei es sich um NOSTRIN β handeln könnte. Zur Kontrolle und besseren Identifikation wurden zum Vergleich Lysate von CHO-eNOS-Zellen (CHO-Zellen, die stabil eNOS überexprimieren), die nach Transfektion transgen NOSTRIN α und NOSTRIN β exprimieren, ebenfalls im Western-Blot analysiert. Die Bande, die nach Retinsäure-Stimulation bei 50 kDa in Hep3B-Zellen auftritt, befindet sich genau auf Höhe der NOSTRIN β -Bande im CHO-eNOS-Lysat. Im Kontrolllysat befindet sich dagegen keine der Abbaubanden von NOSTRIN α auf der selben Höhe wie NOSTRIN β , so dass es sich bei der 50 kDa-Bande im Hep3B-Lysat wohl um die verkürzte Isoform NOSTRIN β handelt.

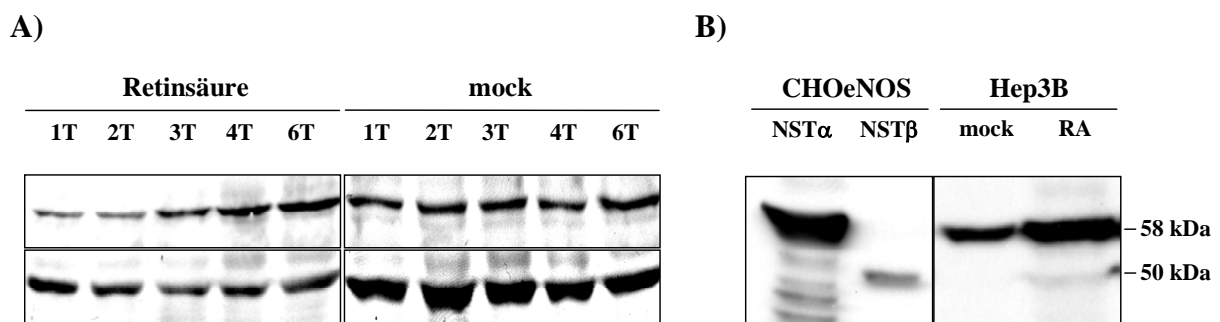


Abbildung 5:

Hep3B Zellen exprimieren NOSTRIN α und NOSTRIN β nach Retinsäure-Stimulation. **A)** Hep3B-Zellen wurden für 1 bis 6 Tage (T) mit 1 μ M Retinsäure inkubiert und die Lysate der Zellen anschließend im Western-Blot mit Maus-anti-NOSTRIN und anti-Aktin analysiert. **B)** CHO-eNOS-Zellen wurden mit NOSTRIN α - und NOSTRIN β -cDNA transfiziert, Hep3B-Zellen wurden für 6 Tage mit 1 μ M Retinsäure inkubiert. Die Lysate der Zellen wurden anschließend im Western-Blot mit Maus-anti-NOSTRIN analysiert.

6.2.2 Bestätigung der Immunoblot-Daten mittels qRT-PCR

Um die Daten aus dem vorherigen Versuch zu bestätigen und um zu überprüfen, ob es sich bei der 50 kDa-Bande tatsächlich um NOSTRIN β handelt, werden mit Retinsäure stimulierte Hep3B-Zellen mittels qRT-PCR untersucht. Gesamt-cDNA aus Hep3B-Zellen (\pm RA) wird auf Veränderungen der NOSTRIN α - und NOSTRIN β -mRNA Mengen analysiert. Abbildung 6 zeigt, dass Sowohl für NOSTRIN α (orange / rot) als auch NOSTRIN β (hellgrün / dunkelgrün) die CT-Werte nach Retinsäure-Stimulation geringer sind, das heißt es ist mehr mRNA vorhanden (Abb. 6). Die interne Kontrolle Ubiquitin-C (schwarz) belegt, dass die selben cDNA-Mengen eingesetzt wurden.

Da die Sensitivität des NOSTRIN β -Assays sehr gut ist, zeigt dieses Ergebnis zusätzlich, dass Hep3B-Zellen selbst ohne die Stimulation durch Retinsäure bereits endogen eine geringe Menge an NOSTRIN β -mRNA aufweisen. Die daraus resultierende Proteinmenge ist scheinbar zu gering für die Detektion im Western-Blot.

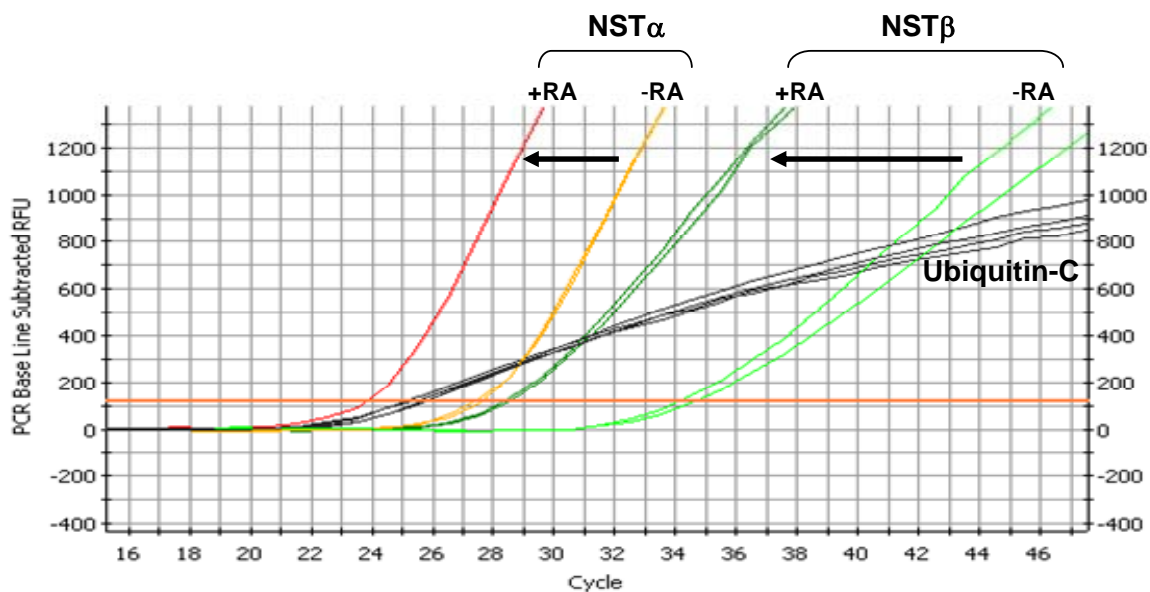


Abbildung 6:

Die Transkriptmenge von NOSTRIN α und NOSTRIN β wird durch Retinsäure erhöht. Hep3B Zellen wurden für 6 Tage entweder mit 1 μ M Retinsäure oder *mock* inkubiert. Nach Isolation der RNA sowie der reversen Transkription in cDNA folgte die Analyse mittels qRT-PCR auf Expressionsveränderungen von NOSTRIN α (rot / orange) und NOSTRIN β (grün / hellgrün). Als Kontrolle wurde Ubiquitin-C verwendet (schwarz).

6.2.3 NOSTRIN β ist kein Produkt fehlerhaften Spleißens

NOSTRIN α und NOSTRIN β weisen sowohl in der Leber als auch Hep3B-Zellen stark unterschiedliche Expressionsebenen auf. Die Menge von NOSTRIN β liegt nur knapp über der Detektionsgrenze. In der Leber ist NOSTRIN β nur in pathologischem Gewebe detektierbar, in Hep3B-Zellen erst nach Stimulation mit Retinsäure. Da durch RA die Transkriptions- und Expressionsmengen von NOSTRIN α und auch NOSTRIN β steigen, kann nicht ausgeschlossen werden, dass NOSTRIN β lediglich durch einen Spleißfehler entsteht, der bei erhöhter Transkription von NOSTRIN α erwartungsgemäß auch häufiger auftreten muss. Durch das Fehlen von Exon-2 wird ein Stopp-Codon in Exon-3 eingeführt, das 66 Nukleotide

vom Exon3-Exon4-Übergang entfernt ist. Dieses Stopp-Codon erfüllt damit eine der Bedingungen, die für den Abbau von mRNA durch den NMD-Komplex auftreten müssen (siehe Einleitung, Abb.V).

Um zu überprüfen, ob NOSTRIN β das Produkt eines fehlerhaften Spleißvorgangs ist und die geringe Menge an mRNA durch den Abbau über den NMD erklärt werden kann, werden Hep3B-Zellen im Doppelansatz jeweils für 6 Tage unter 1 μ M Retinsäure, bzw. *mock* kultiviert. Bevor die Zellen dann für die qRT-PCR aufbereitet werden, erfolgt in der Hälfte der Ansätze eine dreistündige Inkubation mit 100 μ M Cycloheximid (CHX). CHX hemmt die Peptidyltransferaseaktivität der 60S-Untereinheit des Ribosoms und stoppt daher die Translation – und somit auch den NMD. In Abbildung 7 ist die relative Expression der

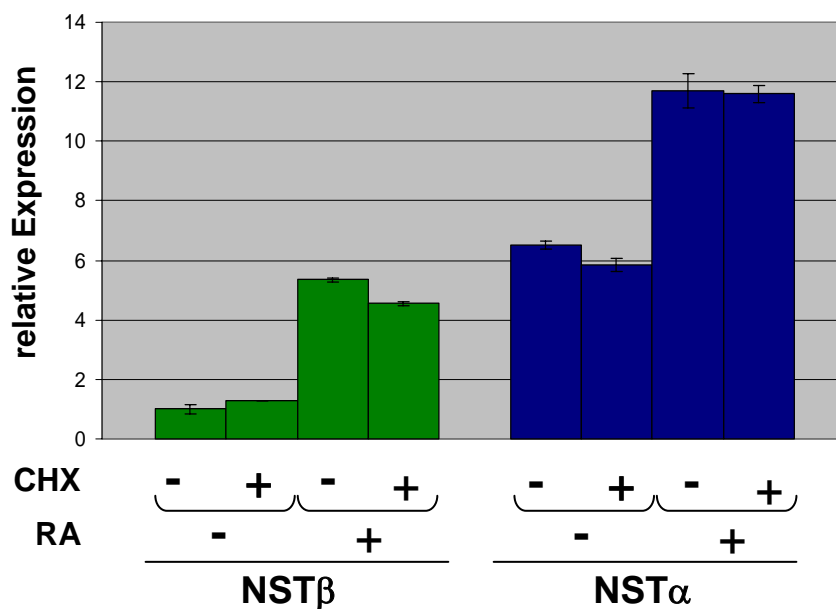


Abbildung 7:

Die mRNA von NOSTRIN β ist kein Abbauprodukt der NOSTRIN α -mRNA. Hep3B Zellen wurden jeweils 6 Tage entweder mit 1 μ M Retinsäure oder DMSO inkubiert. Anschließend folgte eine Inkubation mit 100 μ M CHX für 3 Stunden, bevor die Zellen für die qRT-PCR aufbereitet wurden. Gezeigt sind die auf Ubiquitin-C normalisierten und intern skalierten Werte der relativen Expression.

unterschiedlichen Ansätze auf Ubiquitin-C normiert, sowie auf den kleinsten internen Wert skaliert dargestellt. Deutlich ist wieder die Zunahme beider Isoformen nach Retinsäure-Stimulation zu sehen; ein stabilisierender Effekt auf die mRNA von NOSTRIN β durch CHX ist jedoch nicht zu verzeichnen. Somit kann ausgeschlossen werden, dass die NOSTRIN β -mRNA, und somit auch das Protein, lediglich aufgrund eines fehlerhaften Spleißvorgangs existiert.

6.2.4 NOSTRIN β ist hauptsächlich im Zellkern lokalisiert

NOSTRIN β unterscheidet sich von NOSTRIN α auf Proteinebene lediglich durch das Fehlen der ersten 77 Aminosäuren. Diese machen den Großteil der FCH-Domäne von NOSTRIN α aus, die für die Membranassoziation dieser Isoform verantwortlich ist. Eine erste und offensichtliche Frage ist daher, wie NOSTRIN β in der Zelle lokalisiert ist.

Für die Studien auf Proteinebene werden zunächst unterschiedliche Vektorkonstrukte von NOSTRIN β kloniert (siehe Klonierungstabelle, Abschnitt 5.10), die direkt mit dem Start-Codon in Exon-4 beginnen (Abb. VII, Material und Methoden). Bei Verwendung dieser Konstrukte zeigte sich, dass die stärkste Expression und eine gleichmäßige Expressionsmenge mit dem Konstrukt pcDNA-3.1A-NOSTRIN β erhalten wird (Daten nicht gezeigt).

CHO-eNOS-Zellen werden mit NOSTRIN α und NOSTRIN β transfiziert und nach der Färbung mit Maus-anti-NOSTRIN am konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (CLSM) analysiert. NOSTRIN α lokalisiert in CHO-eNOS-Zellen an perinukleären und vesikulären Strukturen (Abb. 8A). NOSTRIN β hingegen lokalisiert vor allem im Zellkern, ist aber auch im Zytoplasma zu erkennen, zum Teil an filamentösen Strukturen. Um diese intrazelluläre Verteilung von NOSTRIN β durch eine weitere Methode zu bestätigen, wird eine Zellfraktionierung durchgeführt. Hierfür werden wiederum CHO-eNOS-Zellen mit pcDNA-3.1A-NOSTRIN β transfiziert. Nach Homogenisierung der Zellen mit einem „*tissue grinder*“ werden die Zellkerne durch einen Zentrifugationsschritt bei 600 x g vom restlichen Lysat abgetrennt. Der Überstand der ersten Zentrifugation wird im folgenden Schritt bei 10.000 x g zentrifugiert, wobei Organellen wie z. B. der Golgi und große filamentöse Strukturen sedimentieren. Der Überstand dieser zweiten Trennung wird durch Zentrifugation noch einmal bei 100.000 x g aufgetrennt, wodurch Plasmamembran vom Zytoplasma abgetrennt wird. Anschließend werden alle Fraktionen mittels Western-Blot auf ihren Proteingehalt untersucht (Abb. 8B). Um die saubere Trennung der einzelnen Fraktionen zu überprüfen, werden Antikörper gegen Proteine des ER (BIP/GRP78), des Zellkerns (Nup62) sowie des zytoplasmatischen Proteins GAPDH im Western-Blot verwendet. NOSTRIN β wird mit Maus-anti-NOSTRIN in der Fraktion der Zellkerne sowie in der zytoplasmatischen Fraktion detektiert, was das Ergebnis der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie bestätigt.

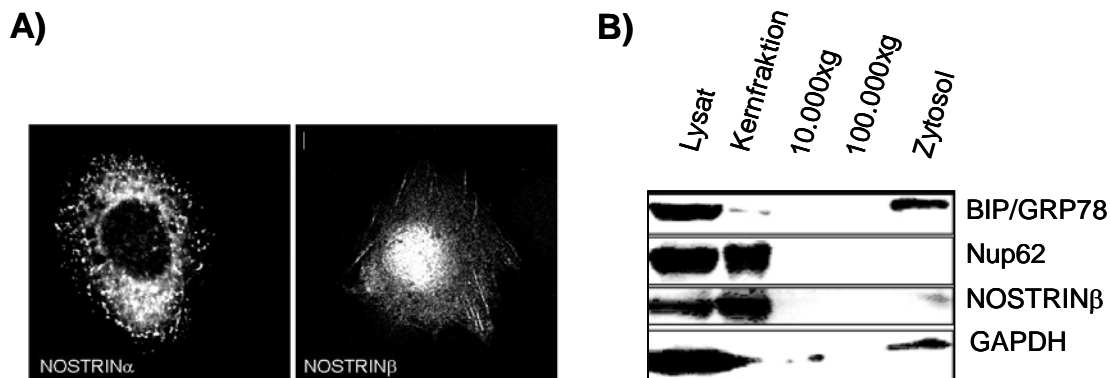


Abbildung 8:

Die Isoformen von *NOSTRIN* zeigen unterschiedliche subzelluläre Verteilungen. **A)** CHO-eNOS Zellen wurden mit pME-NOSTRIN α oder pcDNA-3.1A-NOSTRIN β transfiziert. Anschließend folgte eine Immunfluoreszenzfärbung mit dem monoklonalen NOSTRIN-Antikörper G6. **B)** CHO-eNOS Zellen wurden mit pcDNA-3.1A-NOSTRIN β transfiziert, nach 20 Stunden wurden die Zellen fraktioniert. Die erhaltenen Fraktionen wurden mittels Western-Blot auf NOSTRIN β und verschiedene Markerproteine untersucht.

6.2.5 NLS-Motive bestimmen die Kernlokalisierung von NOSTRIN β

Da NOSTRIN β hauptsächlich im Zellkern lokalisiert, wird die Aminosäuresequenz mit Hilfe des Programms PSORT-II (Kenta Nakai, Paul Horton, SWISS-PROT) auf potentielle *nuclear localization sequence* (NLS) Motive untersucht. NLS-Motive zeichnen sich meist durch einen Cluster von vier oder sieben direkt aufeinander folgenden Lysinen und Argininen aus, wobei diese Abfolge jedoch auch durch andere AS unterbrochen sein kann. Das Programm PSORT-II erkennt in NOSTRIN β ein potentielles NLS-Motiv von Lys32 - Lys35 der Sequenz KKRK (NLS1) (Abb. 9). Diesem Motiv folgen zwei weitere Lysin-Arginin-Cluster der Sequenz KAKKK (NLS2) und KEKRK (NLS3), die zwar nicht von PSORT-II erkannt, aber dennoch als mögliche NLS in Betracht gezogen werden.

Um die NLS-Motive auf ihre Funktionalität zu überprüfen, werden entsprechende Mutanten von NOSTRIN β kloniert. In einem ersten Ansatz werden die drei potentiellen NLS-Motive einzeln, doppelt und dreifach deletiert (siehe Klonierungstabelle, Abschnitt 5.10).

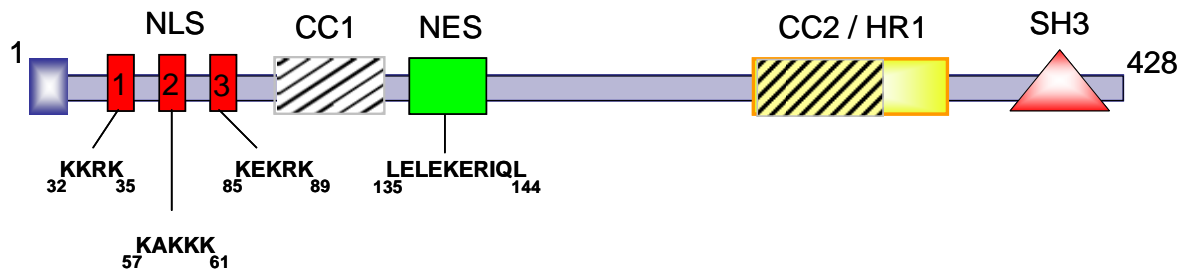


Abbildung 9:

NOSTRINβ hat drei potentielle NLS-Motive sowie ein NES-Motiv. Das NES-Motiv (grün) wurde mit Hilfe des Programms NetNES 1.1 ermittelt, wohingegen lediglich das erste NLS-Motiv (rot) von dem Programm PSORT-II erkannt wurde. Die beiden anderen Motive wurden als ebenfalls potentielle in Betracht gezogen. CC: Coiled-coil; HR1: protein kinase C-related kinase homology region 1; SH3: Src homology 3

HeLa-Zellen werden mit den Deletionsmutanten von *NOSTRINβ* transfiziert und nach Färbung mit Maus-anti-*NOSTRIN* mittels Immunfluoreszenz-Mikroskopie auf die intrazelluläre Lokalisation der Konstrukte untersucht. In Abbildung 10 ist exemplarisch jeweils eine Zelle pro Deletionskonstrukt gezeigt. Bereits bei den Einzeldelationen zeigt sich durch die ausbleibende Zellkernfärbung deutlich, dass NLS1 (Abb. 10b) und NLS2 (Abb. 10c) funktionale Motive sind, NLS3 (Abb. 10d) hingegen nur einen geringen Einfluss hat. Bei den Doppelmantanten bestätigt sich dieses Ergebnis, da die Kombination der Deletionen des ersten und zweiten Motivs (Abb. 10e) den deutlichsten Effekt auf die Lokalisation von *NOSTRINβ* aufweist. Auch Kombinationen von Δ NLS-1 oder Δ NLS-2 mit Δ NLS-3 führen zu einem klaren Kernausschluss von *NOSTRINβ* (exemplarisch nur die Doppeldeletion des NLS-2 und -3 gezeigt, Abb. 10f). Eine komplett zytosolische Verteilung wird daher ebenfalls mit der Tripelmutante erhalten (Abb. 10g).

Deletionen bedeuten einen starken Eingriff und können zu strukturellen Veränderungen des gesamten Proteins führen. Daher werden im folgenden Konstrukte untersucht, bei denen in den ersten beiden NLS-Motiven Punktmutationen eingeführt werden, indem sämtliche Lysine durch Alanine ersetzt werden. Es werden die jeweiligen Einzelmutanten (NST β mutNLS-1, NST β mutNLS-2) sowie die Doppelmantante (NST β mutNLS-1/2) kloniert. Die Lokalisation der Mutanten wird wiederum in transfizierten HeLa-Zellen mittels Immunfluoreszenz-Mikroskopie unter Verwendung von Maus-anti-*NOSTRIN* überprüft. Für beide Einzelmutanten (Abb. 10h, 10k) und auch die Doppelmantante (Abb. 10l) ist die Verteilung komplett zytosolisch, was die Bedeutung der beiden NLS bestätigt.

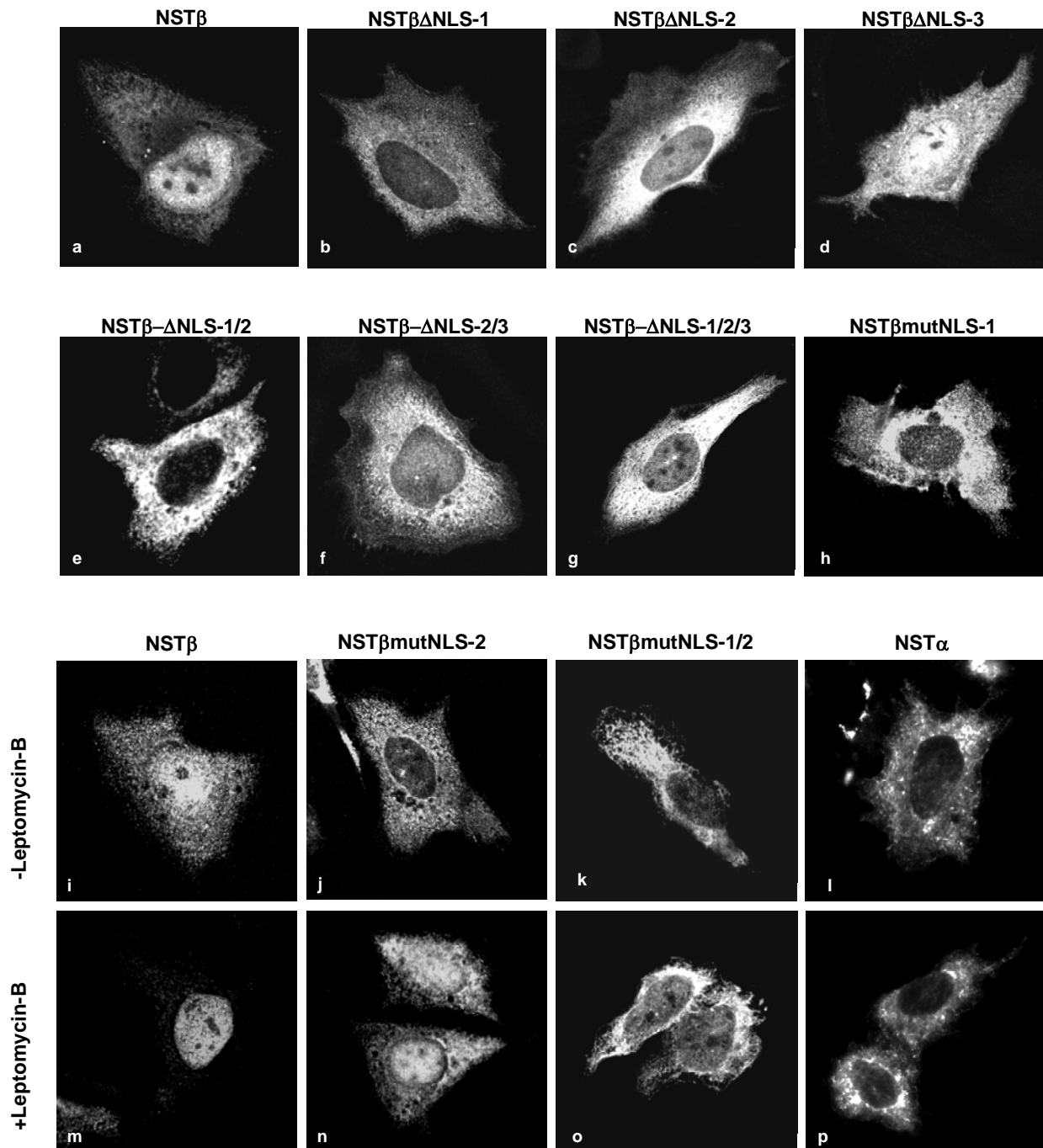


Abbildung 10:

*NOSTRIN*β hat zwei unabhängige NLS-Motive. **(a-p)** HeLa-Zellen wurden mit unterschiedlichen NOSTRIN-Konstrukten transfiziert. Nach der Methanol-Fixierung folgte eine Immunfluoreszenzfärbung mit Maus-anti-NOSTRIN. **(m-p)** Vor der Methanol-Fixierung wurden die Zellen für zwei Stunden mit Leptomycin-B (5 ng/ml) inkubiert.

6.2.6 Die NLS-Motive sind funktional voneinander unabhängig

Durch die oben aufgeführten Experimente wurde bisher nicht geklärt, ob die beiden ersten NLS-Motive unabhängig voneinander oder aber gekoppelt (bipartit) funktional sind. Im Fall einer bipartiten NLS würde bei der Deletion eines der Teile ein kompletter Kernausschluss erfolgen, wie ja auch beobachtet wurde. Wenn aber durch Deletion eines von zwei unabhängigen Motiven das Gleichgewicht zwischen Kernimport und Kernexport (siehe auch Abschnitt 6.2.5) zugunsten des Kernexports verschoben wird, so könnte NOSTRIN β immer noch in den Zellkern gelangen, würde aber gleich wieder exportiert und somit dort nicht detektiert werden. Um zwischen diesen beiden Möglichkeiten unterscheiden zu können, wird Leptomycin-B verwendet. Leptomycin-B inhibiert den Kernexport über Crm-1, der in über 90 % an Kernexporten beteiligt ist. Für diesen Versuchsansatz wird angenommen, dass der Export von NOSTRIN β aus dem Kern ebenfalls über diesen Mechanismus abläuft. HeLa-Zellen werden mit NOSTRIN β , NOSTRIN β -mutNLS-2 und NOSTRIN β -mutNLS-1/2 transfiziert und 3 h vor der Fixierung mit 5 ng/ml Leptomycin-B versetzt. NOSTRIN β akkumuliert nach Zugabe von Leptomycin-B verstärkt im Kern, die zytosolische Fraktion wird geringer (vergleiche Abb. 10i und Abb. 10m). Die Mutante NST β mutNLS-2 (Abb. 10o) lokalisiert nach Behandlung mit Leptomycin-B im Zellkern, was unter den selben Bedingungen bei der Doppelmutante NST β mutNLS-1/2 (Abb. 10p) ausbleibt. NOSTRIN β -mutNLS-1 verhält sich wie NOSTRIN β -mutNLS-2 (Daten nicht gezeigt). In Kombination der Ergebnisse kann man zwei Aussagen treffen: 1. Der Kernexport von NOSTRIN β verläuft über Crm-1 und 2. es handelt sich um zwei voneinander unabhängige NLS-Motive.

Des Weiteren werden die Zellen ebenfalls mit NOSTRIN α transfiziert und einmal mit und einmal ohne Zugabe von Leptomycin-B analysiert. Da NOSTRIN α bisher nie im Zellkern zu sehen war, aber ebenfalls die NLS Motive enthält, soll überprüft werden, ob diese Isoform wirklich nicht in den Kern gelangt, oder ob ein möglicher Export den Import überwiegt. Wie der Vergleich von Abbildung 10l und 10p zeigt, ist für NOSTRIN α keine intrazelluläre Umverteilung in den Zellkern hinein zu sehen.

6.2.7 NLS-Transfer zeigt allgemeine Funktionalität der NLS-Motive

Um zu überprüfen, ob die beiden NLS-Motive auch allgemein funktional sind oder aber nur in der umgebenden Domänstruktur von NOSTRIN, wird ein NLS-Transfer durchgeführt.

Hierfür werden NLS1 und NLS2 vor das Protein AGAP-1 (Arf GAP-1) kloniert („NLS-AGAP“). Die Lokalisation von AGAP ist als rein zytoplasmatisch bekannt¹¹⁸. Abbildung 11A zeigt jeweils ein exemplarisches Bild der AGAP-Verteilung und eines der NLS-Mutante in HeLa-Zellen. Im Fall der Mutante ist deutlich die Translokation aus dem Zytoplasma in den Kern zu erkennen. In Abbildung 11B ist die Auswertung von jeweils über 200 Zellen pro Konstrukt graphisch dargestellt. Unterschieden wurde, ob eine Kernfärbung auftritt oder nicht. Die Umverteilung der NLS-AGAP-Mutante wird hier sehr deutlich.

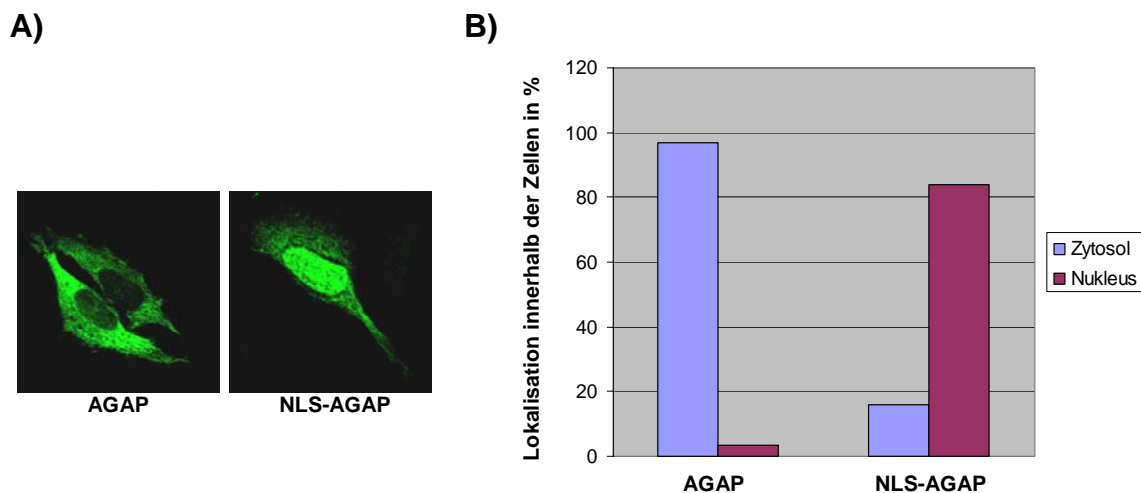


Abbildung 11:

NOSTRINs NLS-Motive sind allgemein funktional. HeLa-Zellen wurden entweder mit AGAP-HA oder NLS-AGAP-HA transfiziert. Nach Färbung mit anti-HA erfolgte die Analyse mittels konfokaler Mikroskopie. In **A)** ist die typische Verteilung der Konstrukte zu sehen und in **B)** die Auswertung von jeweils > 200 Zellen.

6.2.8 NOSTRIN β hat ein Crm-1-abhängiges NES-Motiv

NES-Motive (*nuclear export sequence*) sind gegenüber den NLS-Motiven weit weniger gut in ihrer Sequenz konserviert. Eine der häufigsten Konsensussequenzen lautet $\Phi X_{2-3} \Phi X_{2-3} \Phi X \Phi$, was für den Fall eines Crm-1-abhängigen Transport noch auf $LX_{2-3}(F,I,L,V,M)X_{2-3} LX(L/I)$ spezifiziert werden kann. Zur Analyse der NOSTRIN β -Sequenz wird das Programm NetNES 1.1¹¹⁹ verwendet, welches ein potentiell NES-Motiv ab L135 der Sequenz **LELEKERIQL** findet, das dem Konsensusmotiv für einem Crm-1-abhängigen Export fast komplett entspricht.

Die Experimente mit Leptomycin-B legen nahe, dass der Kernexport von NOSTRIN β über Crm-1 vermittelt wird (Abb. 10). Um zu verifizieren, dass das potentielle NES-Motiv

tatsächlich für den Kernexport verantwortlich ist, werden für NOSTRIN α und NOSTRIN β Punktmutationen in das Motiv eingeführt (L135A, L137A, K139A und L144A). Zur Überprüfung der intrazellulären Lokalisation der Mutanten werden HeLa-Zellen mit den Konstrukten im Doppelansatz transfiziert und jeweils einer davon vor der Fixierung für die Immunfluoreszenzfärbung mit Leptomycin-B versetzt.

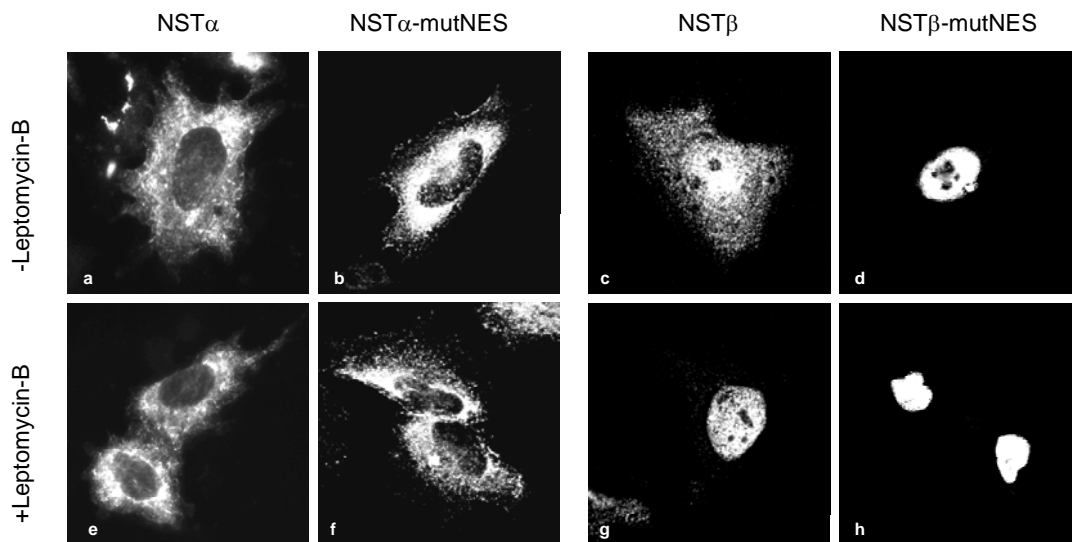


Abbildung 12:

Verifizierung des NES-Motives von NOSTRIN durch Punktmutationen. Im Doppelansatz wurden HeLa-Zellen mit NOSTRIN α (a + e), NOSTRIN β (c + g) sowie deren NES-Mutations-Konstrukten (b, d, f und h) transfiziert. Vor der Fixierung wurde jeweils zu einem der Ansätze (e –h) für zwei Stunden Leptomycin-B (5 ng/ml) zugesetzt. Anschließend folgte eine Immunfluoreszenzfärbung mit Maus-anti-NOSTRIN und die Analyse mittels konfokaler Mikroskopie.

In Abbildung 12b ist die NES-Mutante von NOSTRIN α zu sehen. Im Vergleich mit dem Wildtyp (Abb. 12a) ist keine Veränderung der Lokalisation festzustellen. Beide zeigen eine Färbung von zytoplasmatischen Vesikeln, im Zellkern wird kein Signal detektiert. Auch unter Zugabe von Leptomycin-B (Abb. 12e + f) verändert sich die Lokalisation dieser beiden Konstrukte nicht. Daher wird die Vermutung weiter gestützt, dass NOSTRIN α nicht in den Zellkern gelangt.

Ganz anders verhält es sich für die NES-Mutante von NOSTRIN β (Abb. 12d). Hier sieht man im Vergleich zum Wildtyp (Abb.12 c) eine deutliche Akkumulation der Mutante im Zellkern. Wie bereits gezeigt lokalisiert NOSTRIN β auch nach Zugabe von Leptomycin-B stärker im Zellkern (Abb. 12g). Für die NES-Mutante ist dieser Effekt nochmals verstärkt; die Mutante

ist nach Leptomycin-B Behandlung ausschließlich im Zellkern zu finden (Abb. 12h). Somit ist die Funktionalität des gefundenen Crm-1-abhängigen NES-Motiv bestätigt.

6.2.9 Die Funktion von NOSTRIN β im Zellkern

NOSTRIN β unterscheidet sich von NOSTRIN α lediglich durch das Fehlen der ersten 77 Aminosäuren. Die bisher bekannten Interaktionspartner von NOSTRIN α binden an der C-terminalen Hälfte, also dem Anteil, der in NOSTRIN β ebenfalls vorhanden ist. Um zu überprüfen, ob NOSTRIN β *in vivo* aufgrund seiner intrazellulären Lokalisation mit den bekannten Bindungspartnern von NOSTRIN α überhaupt interagieren kann, werden Co-Lokalisationsstudien in CHO-eNOS-Zellen durchgeführt. Besonderes Interesse gilt dabei der Möglichkeit, dass Interaktionspartner durch NOSTRIN β in den Zellkern gelangen könnten. Im Fall der eNOS gibt es Berichte, dass sie in Adipozyten¹²⁰ sowie Hepatozyten¹²¹ im Zellkern gefunden wurde, bzw. die eNOS im Nukleus eine starke Aktivität aufweist¹²², aber ein Mechanismus für den Kernimport ist bisher unbekannt. Auf *Pull-down*-Experimente und Immunpräzipitationen zum Nachweis einer Interaktion wurde verzichtet, da im Zelllysat die unterschiedliche Lokalisation von NOSTRIN α und NOSTRIN β nicht mehr ins Gewicht fällt und durch die fast identische Domänenstruktur viele falsch positive Interaktionen wahrscheinlich werden.

Für die Co-Lokalisationsstudien werden CHO-eNOS-Zellen verwendet, die transient NOSTRIN α oder NOSTRIN β exprimieren. Um die Interaktion von NOSTRIN β mit Dynamin und N-WASP zu untersuchen, erfolgt zusätzlich die Transfektion der CHO-eNOS-Zellen mit pEGFP-N1-Dynamin oder pEGFP-N1-N-WASP. In Abb. 13 ist jeweils ein repräsentatives Bild der Lokalisationen von NOSTRIN α und NOSTRIN β mit dem jeweiligen Interaktionspartner gezeigt. Im Fall von NOSTRIN α ist die Co-Lokalisation mit Dynamin (Abb. 13c) und eNOS (Abb. 13a) fast vollständig, und die Translokation der eNOS in vesikuläre Strukturen ist zu erkennen. In der Co-Färbung mit Caveolin-1 sieht man eine partielle Co-Lokalisation der beiden Proteine (Abb. 13b), wie ebenfalls für NOSTRIN α und GFP-N-WASP (Abb. 13d).

Ein ganz anderes Bild erhält man mit NOSTRIN β : die eNOS wird nicht in vesikuläre Strukturen umverteilt, sie gelangt auch nicht in den Zellkern (Abb. 13e). Es wird keine Co-Lokalisation detektiert. Das selbe trifft für Caveolin-1 (Abb. 13f) und auch Dynamin (Abb.

13g) zu, beide Proteine sind in gänzlich anderen Strukturen der Zelle zu finden als NOSTRIN β . Lediglich das Protein N-WASP, dessen normale Verteilung bereits zytoplasmatisch und auch nukleär ist, weist eine partielle Co-Lokalisation mit NOSTRIN β auf (Abb. 13h). Eine mögliche Funktion von NOSTRIN β in der Translokation der eNOS in den Zellkern erscheint somit unwahrscheinlich.

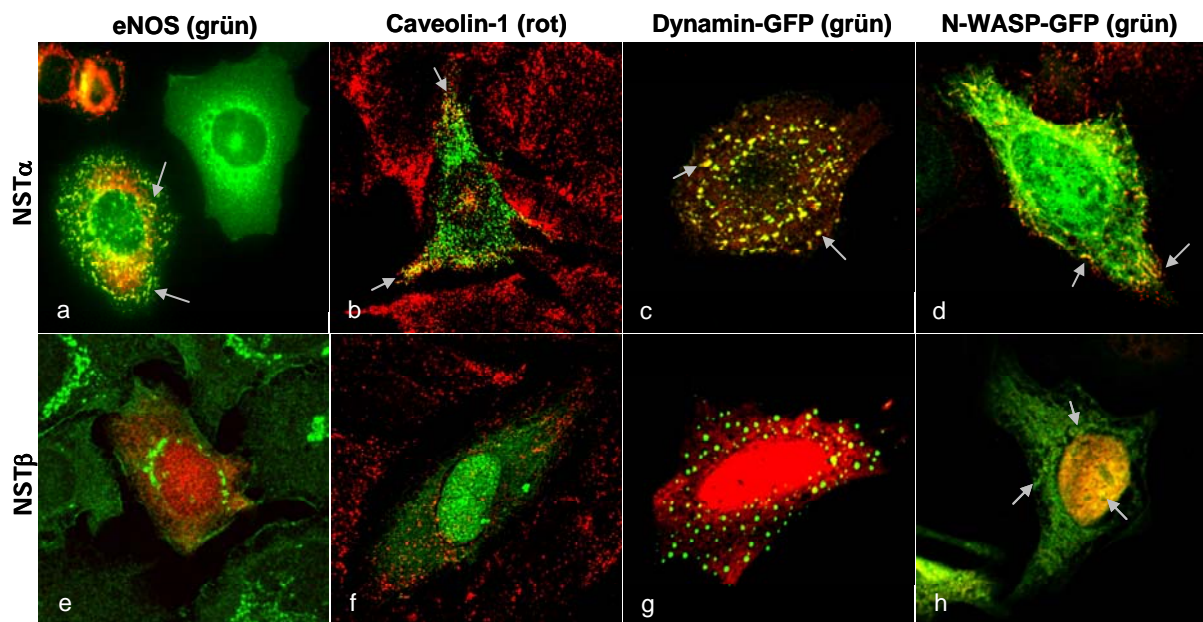


Abbildung 13:

NOSTRIN β co-lokalisiert in der Zelle nicht mit allen Interaktionspartnern von NOSTRIN α . CHO-eNOS Zellen wurden mit den angegebenen Konstrukten transfiziert und nach 20 Stunden für die Immunfluoreszenzfärbung eingesetzt. Zur Färbung von NST α und NST β diente der Maus-anti-NOSTRIN. In (a+e) wurde mit anti-eNOS, in (b+f) mit anti-Caveolin-1 co-markiert. Pfeile deuten auf Stellen partieller Co-Lokalisationen (gelb) hin, die im Fall von NST β lediglich mit N-WASP (h) auftritt.

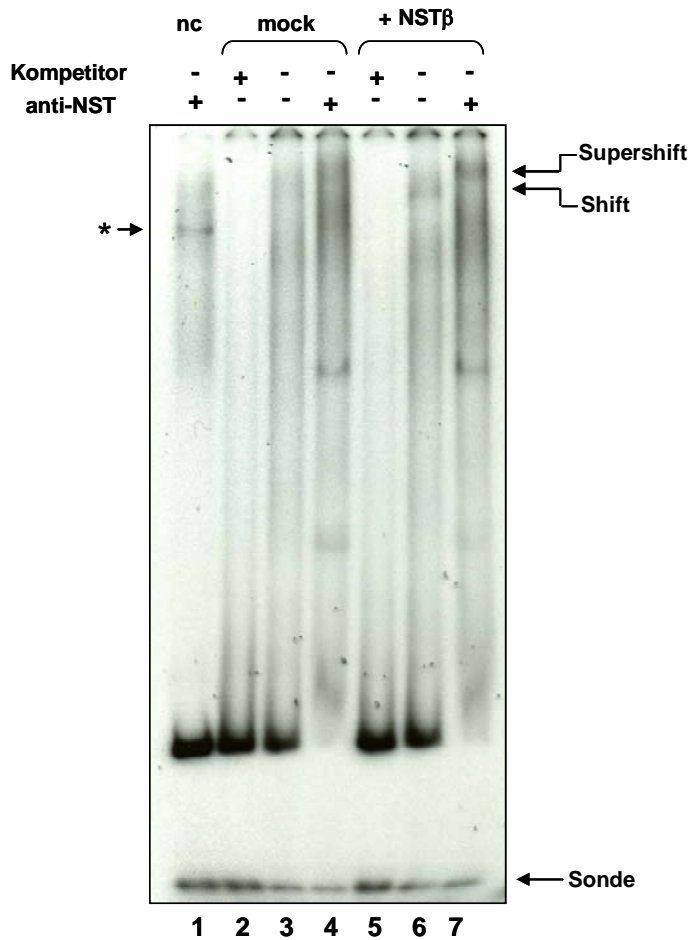
Eine andere mögliche Funktion von Proteinen im Zellkern ist die einer DNA-Protein-Wechselwirkung, z.B. in Form eines Transkriptionsfaktors. Hierfür müsste NOSTRIN β die Fähigkeit der DNA-Bindung aufweisen. Bei den Stimulationsexperimenten mit Retinsäure (Abschnitt 6.2.1/6.2.2) wurde beobachtet, dass NOSTRIN β nur bei einer gleichzeitig stark erhöhten Expression von NOSTRIN α detektiert werden kann. Daher liegt die Vermutung nahe, dass NOSTRIN β in Form einer negativen Rückkopplung einen Einfluss auf die

NOSTRIN α -Expression haben könnte. In diesem Fall muss NOSTRIN β an die DNA im Gen aufwärts von dem NOSTRIN α Start-Codon binden können.

Zur Überprüfung dieser Möglichkeit wird die Methode des *electrophoretic-mobility-shift-assay* (EMSA) angewendet. Die Promotorregion von NOSTRIN ist bisher nicht bekannt. Um die Bindung von NOSTRIN β an die eigene, bzw. die *upstream*-Region von NOSTRIN α zu testen, wird daher per PCR der relativ große Nukleotid-Bereich von -200 bis -1 vor dem Start-Codon von NOSTRIN α amplifiziert. Von dem Produkt wird ein Teil mit ^{32}P markiert, unmarkiertes DNA-Oligomer wird als Kompetitor zur Überprüfung der Spezifität eines möglichen *shifts* verwendet. Als Modellsystem werden einmal mit NOSTRIN β und zur Kontrolle mit leerem Vektor („*mock*“) transfizierte HeLa-Zellen verwendet. Die Zellkerne werden in einem hypertonen Puffer aufgenommen, wodurch die Kernmembran aufgebrochen und die DNA-Protein-Interaktionen aufgehoben werden. Die Ansätze werden zentrifugiert und der Überstand als nukleärer Extrakt im EMSA eingesetzt. Zusätzlich zur Negativkontrolle durch Verwendung von *mock*-transfizierten HeLa-Zellen wird jeweils pro EMSA-Ansatz eine Kontrolle mit Kompetitor sowie eine mit Kaninchen-anti-NOSTRIN versetzte Kontrolle mitgenommen. Um auszuschließen, dass bereits durch im Serum enthaltene Bestandteile falsch positive Ergebnisse erhalten werden, wird das markierte DNA-Oligomer in einem Ansatz ohne Kernextrakt nur mit dem Antikörper versetzt. Die Ansätze werden über ein natives Polyacrylamid-Gel aufgetrennt.

Abbildung 14A zeigt, dass NOSTRIN β an der verwendeten DNA-Sonde bindet (vergleiche Spur 3 und 6, *shift* durch Transfektion von NOSTRIN β). Der Supershift nach Zugabe des NOSTRIN-Antikörpers (vgl. Spur 4 und 7) bestätigt, dass der *shift* in Spur 6 tatsächlich durch NOSTRIN β ausgelöst wird. Kontrollen ohne HeLa-Extrakt (Spur 1), bzw. mit unmarkierter Sonde als Kompetitor (vgl. Spur 2 und 5) weisen keine Bande auf der Höhe des *shifts* oder *supershifts* auf, was die Spezifität des Experiments verdeutlicht. Der Immunoblot der im EMSA verwendeten HeLa-Extrakte (Abb. 14B) weist nach, dass die selben Proteinmengen in beiden Kernextrakte vorhanden sind und dass die Fraktionierung von Zytosol und Kernextrakt mit der selben Effizienz durchgeführt wurde. Dieses Experiment zeigt, dass NOSTRIN β in der Lage ist, innerhalb der *upstream*-Region des NOSTRIN α -Gens zu binden.

A)

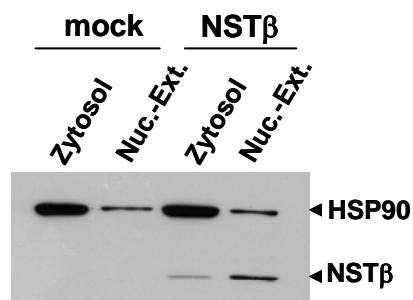
**Abbildung 14:**

NOSTRIN β bindet an die NOSTIN α Promotorregion.

A) HeLa-Zellen wurden mit pcDNA-NOSTRIN β , bzw. Leervektor („mock“) transfiziert. Nach 20 Stunden wurden die Zellen in Zytosol und nukleären Extrakt aufgetrennt. Von letzterem wurden jeweils 5 μ g pro Ansatz im EMSA verwendet. Als Sonde wurde die 32 P-markierte *upstream*-Region -200 bis -1 von NOSTRIN eingesetzt, als Kompetitor ein 100x-Überschuß des unmarkierten Oligomers. Kaninchen-anti-NOSTRIN wurde für den Supershift verwendet. Die 32 P-Detektion erfolgte auf Röntgenfilm. nc = Kontrolle ohne HeLa-Extrakt; * unspezifische Interaktion des Antikörperserums mit der Sonde

B) Jeweils 10 μ g der zytosolischen Fraktion und des Kern-Extraktes wurden im Western-Blot analysiert.

B)



7 Diskussion

NOSTRIN α ist als Bindungspartner der eNOS bekannt. Bisherige Untersuchungen deuten auf eine Funktion innerhalb der caveolären Endozytose und der Aktivitätsregulation der eNOS hin. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass NOSTRIN α in humaner Leber exprimiert ist, und dass die Expression im Vergleich von normalem zu zirrhotischem Lebergewebe stark ansteigt. Dieser Anstieg korreliert mit einer verringerten NO-Freisetzung sowie einer erhöhten portalen Hypertonie der Patienten. Des Weiteren konnte eine neue NOSTRIN-Isoform, NOSTRIN β , im zirrhotischem Lebergewebe nachgewiesen werden.

Die anschließende Charakterisierung von NOSTRIN β lässt aufgrund der Lokalisation im Zellkern sowie der nachgewiesenen Bindung an DNA auf eine Funktion als Transkriptionsfaktor schließen.

7.1 Alternatives Spleißen in der PCH-Familie

NOSTRIN β ist im Vergleich zu NOSTRIN α sowohl in Hep3B-Zellen als auch in den Leberproben nur sehr schwach exprimiert. Über qRT-PCR-Experimente konnte ausgeschlossen werden, dass es sich bei NOSTRIN β um eine Spleißvariante handelt, die im Normalfall als fehlerhaft erkannt und über den NMD wieder abgebaut wird. Ein weiteres Indiz dafür, dass NOSTRIN β nicht durch zufälliges oder falsches Spleißen, sondern durch einen gezielten Prozess entsteht, findet sich in der PCH-Familie selbst. Innerhalb der Familie gibt es mehrere Isoformen, die durch alternatives Spleißen entstehen. Als ein Beispiel kann CIP4 genannt werden, von dem bereits vier Isoformen (a, b, c und h) bekannt sind¹¹⁷. Als weiteres interessantes Mitglied der PCH-Familie ist FCHSD1 (*FCH and double SH3 domain 1*) zu nennen, von dem eine zweite Isoform, FCHSD2, existiert. Bei dieser Spleißvariante FCHSD2 wird wie im Fall von NOSTRIN β Exon-2 ausgeschlossen, und es entsteht daraufhin ein am N-Terminus verkürztes Produkt¹²³. Über dieses Familienmitglied ist leider noch nicht viel bekannt, aber über bioinformatische Studien konnten ebenfalls Maushomologe gefunden werden, die auf Aminosäure-Ebene jeweils über 90% zu den humanen Proteinen identisch sind¹²³.

7.2 Die Stimulation durch Retinsäure

Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, ist die Expression sowohl von NOSTRIN α als auch von NOSTRIN β in einer Hepatozyten-Zelllinie (Hep3B) durch Retinsäure (RA) stimulierbar, was auf Proteinebene durch Western-Blots und auf mRNA-Ebene über die Methode der qRT-PCR nachgewiesen wurde. Da eine Expressionserhöhung erst nach dreitägiger Inkubation der Hep3B-Zellen mit RA zu detektieren ist, scheint es sich hierbei um einen sekundären Effekt zu handeln. RA reguliert die Expression von über 500 Genen. Bei einer direkten Regulation ist in der Umgebung des Gens ein RARE-Motiv (*retinoic acid responds element*) zu finden, an welchem der Retinsäure-Rezeptor nach seiner Translokation von der Plasmamembran in den Zellkern bindet¹⁰⁵. Ein solches Motiv konnte in der Umgebung des NOSTRIN-Lokus jedoch nicht gefunden werden, was ebenfalls darauf hindeutet, dass die Expression durch einen sekundären, durch die RA ausgelösten Effekt stattfindet. Unabhängig von diesen Studien wurde murines NOSTRIN im Jahr 2005 als Interaktionspartner von Dab2 (*disabled homolog 2*) gefunden¹²⁴. Die Arbeitsgruppe von S. S. Park konnte zudem zeigen, dass die Expression von Dab2 und NOSTRIN in F9-Zellen (eine Fibroblastenzelllinie aus der Maus) durch RA stimulierbar ist. Wie auch in unseren Ergebnissen findet eine Expressionserhöhung erst nach einigen Tagen statt, in der Maus konnte ebenfalls kein RARE-Motiv in der Umgebung von 0 bis – 2000 aufwärts des NOSTRIN-Gens gefunden werden¹²⁵.

7.3 Die intrazelluläre Lokalisation der NOSTRIN-Varianten

Der auffälligste Unterschied von NOSTRIN α und NOSTRIN β liegt in ihrer unterschiedlichen intrazellulären Lokalisation: Während NOSTRIN α hauptsächlich an der Plasmamembran sowie an Caveolin-1-haltigen, vesikulären Strukturen im Zytoplasma zu finden ist, befindet sich der Hauptanteil von NOSTRIN β im Zellkern. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, über welche Motive NOSTRIN β in und wieder aus dem Zellkern gelangt: Es enthält zwei voneinander unabhängige NLS-Motive sowie ein Crm-1-abhängiges NES-Motiv. Das Auftreten von zwei unabhängigen NLS-Motiven ist nicht ungewöhnlich, als Beispiele können hier der bereits gut charakterisierte humane Glucocorticoid-Rezeptor (hGR) aus der Familie

der Steroidrezeptoren genannt werden^{126, 127}, sowie der muskelspezifische Transkriptionsfaktor MyoD¹²⁸. Ein weiteres Beispiel ist das bei der DNA-Reperatur beteiligte Protein c-Abl mit sogar drei unabhängigen NLS-Motiven¹²⁹. Das Vorkommen mehrerer NLS-Motive wird meist durch differentielle Regulation begründet. Für c-Abl wird vermutet, dass das erste Motiv durch Phosphorylierung aktiviert werden könnte, wohingegen die anderen beiden Motive auf andere Stimuli reagieren und die Funktion der einzelnen NLS-Motive auch Zelltyp-abhängig sein könnte¹²⁹.

Die gefundenen NLS- und NES-Motive befinden sich auch in NOSTRIN α , welches dennoch nicht in den Zellkern gelangt. Nach dem jetzigen Wissenstand ist der wahrscheinlichste Grund hierfür die von der FCH-Domäne vermittelte Membranassoziation. Wie von unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden konnte⁵³, hängt die intrazelluläre Lokalisation von NOSTRIN α von dieser N-terminalen Domäne ab. Auch Studien der erweiterten FCH-Domäne anderer PCH-Familienmitglieder zeigen, dass diese Domäne eine Membranassoziation vermittelt, vor allem über die Bindung an Phosphoinositide^{57, 64, 130}. Durch Überexpression der erweiterten FCH-Domäne von FBP17, Toca1 oder CIP4 wird die Plasmamembran verformt und zieht sich tubulär durch die ganze Zelle⁶³. Bei NOSTRIN β fehlt fast die gesamte FCH-Domäne, so dass es wohl nicht an die Membran bindet, und damit ein Zellkernimport möglich wird.

Für keines der anderen PCH-Familienmitglieder wurde bisher eine Kernlokalisierung berichtet. Allerdings lokalisiert auch eine FCH-Deletionsmutante von FBP17 (FBP17 Δ FCH) partiell im Kern⁶³. Analysiert man weitere Familienmitglieder mit dem Programm PSORT-II findet man auch fast für jedes potentielle NLS-Motive. Nur in einem Fall konnte allerdings auch ein potentiell NES-Motiv mit NetNES gefunden werden. Interessanterweise handelt es sich dabei wieder um FCHSD2, welches ja schon beim Spleißvorgang eine starke Ähnlichkeit mit NOSTRIN β aufweist.

7.4 Funktionen von NOSTRIN β

Obwohl NOSTRIN β über sämtliche Bindungsstellen verfügt, co-lokalisiert es fast mit keinem der bekannten Interaktionspartner von NOSTRIN α . Lediglich im Fall von N-WASP kann eine Co-Lokalisation in Immunfluoreszenz-Studien beobachtet werden. Außerdem co-lokalisieren die im Zytoplasma auftretenden filamentösen Strukturen von NOSTRIN β mit Aktinfilamenten (nicht gezeigte Daten). Letzteres unterscheidet sich aber deutlich von der NOSTRIN α -Co-Lokalisation, welche hauptsächlich punktuell stattfindet⁵³. Somit kann

NOSTRIN β mit keiner der bekannten Funktionen von NOSTRIN α in Verbindung gebracht werden, da für einen Beitrag in der caveolären Endozytose oder auch in der Aktivitätsregulierung der eNOS keine Anhaltspunkte gefunden wurden.

Dass es sich bei NOSTRIN β um einen Transkriptionsfaktor handelt, wird durch die gefundene Interaktion mit der eigenen DNA-Region von -1 bis -200 aufwärts des NOSTRIN α -Transkriptionstarts unterstützt. In diesem Fall könnte es sich bei der Verschiebung zur zytoplasmatischen Lokalisation, sowie auch der Entstehung durch den alternativen Spleißvorgang an sich, um einen Regulationsmechanismus handeln. Die Kontrolle von Transkriptionsfaktoren kann auf vielen Ebenen stattfinden: Die subzelluläre Lokalisation, intrazelluläre molekulare Interaktionen, post-translationale Modifikationen wie Phosphorylierung oder Ubiquitinierung, alternative Translations-Startpunkte als auch alternatives Spleißen spielen – oftmals auch in Kombination - wichtige Rollen¹³¹. Als Beispiel kann wiederum der Glucocorticoid-Rezeptor genannt werden, von dem es wie bei NOSTRIN aufgrund von alternativem Spleißen zwei Isoformen gibt, hGR α und hGR β ¹³¹. Letztere ist am C-Terminus um 50 Aminosäuren verkürzt und enthält dort ebenfalls 15 abgeänderte Aminosäuren. hGR β wird in den selben Geweben exprimiert wie hGR α , allerdings immer in geringeren Mengen, vergleichbar mit dem Expressionsverhältnis von NOSTRIN β zu NOSTRIN α . Im Unterschied zu hGR α befindet sich hGR β immer im Zellkern^{132, 133}. hGR α befindet sich in Abwesenheit eines Liganden in einem großen, zytoplasmatischen multi-Proteinkomplex. Wenn ein Hormon bindet, ändert der Rezeptor seine Konformation. Das führt zu einer zur Dissoziation von dem Komplex, zum anderen werden erst in dieser Konformation die NLS-Motive zugänglich¹³⁴. In Zellkultur überexprimiertes hGR β fungiert als dominant negativer Inhibitor der hGR α -vermittelten Transaktivierungen¹³⁵, wodurch ihm eine Rolle in der gewebespezifischen Regulation der Glucocorticoid-Sensitivität zugesprochen wird. Auch für NOSTRIN β wäre die Funktion einer negativen Rückkopplung für die NOSTRIN α -Expression denkbar, da NOSTRIN β immer nur zu finden ist, wenn NOSTRIN α massiv exprimiert wird. Unterstützend für diese Hypothese sind die Daten für das Maushomolog von NOSTRIN α ¹²⁵. Bei diesem wurde ebenfalls die Bindung an die eigene „Promotorregion“ gezeigt, und über einen Luciferase-Assay die Abnahme der Expression bei Bindung beobachtet. Allerdings wurde in dem Fall davon ausgegangen, dass das Homolog zu NOSTRIN α in den Zellkern gelangen kann - eine zweite Isoform wird nicht erwähnt und untersucht. Die hier gezeigten Daten mit den NES-Mutanten und Leptomycin-B zeigen

jedoch, dass humanes NOSTRIN α nicht in den Kern gelangt. In der murinen NOSTRIN-Sequenz ist ebenfalls das Methionin in Exon-4 enthalten, welches in humanem NOSTRIN als Translationsstart für NOSTRIN β fungiert. Des Weiteren gibt es die NLS-Motive und auch das NES-Motiv ebenfalls in murinem NOSTRIN, und sie sind zu 100 % auf Aminosäure-Ebene mit den humanen Sequenzen identisch. So kann spekuliert werden, dass es auch in der Maus zwei NOSTRIN-Isoformen gibt und diese sich wie die humanen verhalten.

Wie NOSTRIN β an die DNA bindet, ist noch nicht geklärt. Möglich wäre die direkte Bindung über ein potentiell Leuzin-Zipper-Motiv, das sich im Bereich von Aminosäure L135 bis I177 befindet. Dieses Motiv wird zwar nicht als solches von dem Programm PSORT-II erkannt, entspricht mit seiner Abfolge von Leuzinen und Isoleuzinen im Abstand von jeweils sieben AS einem wichtigen Kriterium. Interessant ist hier wiederum die Ähnlichkeit zu FCHSD2, dem einzigen PCH-Familienmitglied, für das ein Leuzin-Zipper von dem Programm PSORT-II (von Aminosäure L71 bis L92) vorhergesagt wird.

7.5 NOSTRIN: Ein Marker für portale Hypertonie?

In dieser Arbeit konnte auf mRNA und auch auf Proteinebene gezeigt werden, dass die Expression von NOSTRIN α und NOSTRIN β in Lebergewebe aus Patienten mit Leberzirrhose im Vergleich zu Normalgewebe stark erhöht ist¹¹⁶. Das Ausmaß der Erhöhung korreliert mit einer verstärkten portalen Hypertonie, die wiederum mit einer verminderten NO-Freisetzung einhergeht. Wie durch die qRT-PCR-Daten gezeigt wurde, ist die stark verminderte NO-Menge in den Patientenproben nicht durch die zwar signifikante, aber geringe Verminderung der eNOS-Expression zu erklären. Auch durch die gefundene, leichte Erhöhung des eNOS-Inhibitors Caveolin-1 kann lediglich eine leichte Verminderung der NO-Freisetzung bei Patienten mit portaler Hypertonie begründet werden, jedoch nicht das tatsächlich gefundene Ausmaß¹¹⁶. Somit wurden die bereits bekannten Daten der verringerten eNOS-Aktivität bei annähernd gleich bleibender Expressionsebene bestätigt⁹⁶⁻⁹⁸. Die massive Erhöhung der NOSTRIN α -Expression könnte die verringerte eNOS-Aktivität erklären. Für die Leber kann somit folgende Hypothese aufgestellt werden: Während des Prozesses der Fibrosilierung wird in der Leber Retinsäure freigesetzt, die – wie hier gezeigt - eine Erhöhung der NOSTRIN α -Expression verursacht. Durch die erhöhten Mengen an NOSTRIN α wird mehr eNOS gebunden und somit die eNOS-Aktivität inhibiert. Die resultierende geringere

Menge an freiem NO wiederum verursacht eine Abnahme der Vasodilatation und trägt somit zu einer Hypertonie bei, oder löst sie sogar erst aus.

NOSTRIN β könnte als Transkriptionsfaktor ebenfalls eine bedeutende Rolle für den Verlauf der portalen Hypertonie haben. Auffällig ist, dass NOSTRIN β ausschließlich in pathogenem Gewebe detektiert werden konnte. Dies korreliert mit den Zellkulturdaten, wo NOSTRIN β ebenfalls nur bei einer gleichzeitig starken Expression von NOSTRIN α gefunden wird. Damit könnte NOSTRIN β als Transkriptionsfaktor eine negative Rückkopplung der NOSTRIN α -Expression bewirken, wie bereits in Abschnitt 7.4 diskutiert. Möglicherweise kann NOSTRIN β auch an weitere Promotorregionen binden und Einfluss auf die Expression anderer - in der Zirrhose relevanter Gene - ausüben, was in noch folgenden Studien geklärt werden muss.

Während der laufenden Untersuchungen wurden zwei weitere Arbeiten veröffentlicht, die NOSTRIN ebenfalls im Zusammenhang mit Hypertonie bringen. So wurde eine Erhöhung der NOSTRIN-Protein-Menge in Plazentagewebe von schwangeren Frauen mit Präeklampsie gefunden¹³⁶. Dabei handelt es sich um eine weitverbreitete, schwere Komplikation von Schwangerschaften, die durch Gefäßkontraktion, Fehlfunktionen im vaskulären Endothel sowie Hypertonie charakterisiert ist. Einige Studien zeigten, dass eine veränderte eNOS-Aktivität zu dem Krankheitsbild beiträgt¹³⁷⁻¹³⁹. Wie die eNOS-Aktivität reguliert wird, ist hierbei noch nicht geklärt, und NOSTRIN kommt daher als ein möglicher Kandidat in Frage. Kalmyrzaev et al. fanden NOSTRIN in einem Gen-Lokus, der für eine vererbliche Anfälligkeit für Bluthochdruck und Herzinfarkt verantwortlich sein könnte¹⁴⁰. Hier wurde eine Genomanalyse einer kirgisischen Familie durchgeführt, in der jeder zehnte bereits vor seinem 35. Lebensjahr an Hypertonie erkrankt ist oder einen Infarkt erlitten hat. In dieser Studie konnte der verantwortliche Genbereich auf Chromosom 2q24.3 bis 2q31.1 eingegrenzt werden. In diesem Bereich liegen 36 Gene mit bekannter oder vorhergesagter Funktion, doch lediglich vier davon mit einem funktionalen Bezug zum Herz-Kreislauf-System - unter anderem NOSTRIN.

7.6 Ausblick

Eine Aussage über eine mögliche Funktion von NOSTRIN β im zirrhotischen Gewebe kann erst getroffen werden, wenn geklärt wurde, ob es neben der Bindung an die Promotorregion von NOSTRIN α auch an andere Promotorregionen bindet und dadurch einen Einfluss auf die Expression weiterer Proteine hat. Denkbar wären eine Hemmung der NOSTRIN α -

Expression, oder die Expressionsveränderungen weiterer hypertonie-relevanter Proteine. Erste Untersuchungen in Bezug hierauf könnten mit Hilfe eines *Microarrays* durchgeführt werden, indem HeLa-Zellen mit und ohne transientser NOSTRIN β -Expression auf Veränderungen im Expressionsmuster untersucht werden. Auch der Ansatz einer ChIP (*Chromatin immunoprecipitation*) ist eine gute Möglichkeit, weitere Promotorregionen, an die NOSTRIN β bindet, aufzufinden. Die gefundene Interaktion von NOSTRIN β mit der DNA aufwärts des NOSTRIN-Gens muss auch noch weiter analysiert werden. Zum einen kann die Bindungsstelle von beiden Seiten noch weiter eingetrenzt werden, zum anderen die Auswirkung der Interaktion auf die NOSTRIN α -Expression mittels Reporter-gen-Assays untersucht werden.

Ebenfalls ungeklärt blieb der komplette Stimulationsweg der NOSTRIN-Expression über Retinsäure. Interessant wäre daher zum einen eine detaillierte Promotoranalyse, um eventuell mit RARE/RXRE-interagierende Transkriptionsfaktoren zu ermitteln (z. B. SP1¹¹³, AP1¹¹⁴). Zum anderen kann ebenfalls ein *Microarray* mit unterschiedlich lang stimulierten sowie unstimulierten Hep3B-Zellen durchgeführt werden, um eine Abfolge von Signalwegen identifizieren zu können, die durch Retinsäure ausgelöst werden und zur NOSTRIN-Expression führen könnten.

Um die Rolle von NOSTRIN bei der Leberzirrhose weiter zu definieren, sind Studien in zirrhotischen Mausmodellen geplant. Hierbei soll die Frage geklärt werden, ob NOSTRIN beim Ablauf einer Hypertonieentwicklung eine ursächliche oder sekundäre Rolle spielt. Parallel werden gerade NOSTRIN-*knock-out*-Mäuse hergestellt, die durch einen eigenen Phänotyp oder aber nach Kreuzung mit anderen *knock-out*-Mäusen (eNOS, Caveolin-1) weitere Einblicke in die Funktionen liefern können. In diesen *knock-out*-Mäusen kann wiederum eine Leberzirrhose-Modell etabliert werden, um den Verlauf der Zirrhose zwischen den Mausmodellen zu vergleichen. Unabhängig von diesen Ansätzen kann in weiteren Krankheitsmodellen mit einer auftretenden Hypertonie (z. B. arterielle Hypertonie) die NOSTRIN-Expression in Maus und Mensch überprüft werden, um die Hypothese einer generellen Beteiligung von NOSTRIN an der Ausbildung einer Hypertonie zu unterstützen.

8 Literaturverzeichnis

1. Kojda, G. & Harrison, D. Interactions between NO and reactive oxygen species: pathophysiological importance in atherosclerosis, hypertension, diabetes and heart failure. *Cardiovasc Res* 43, 562-71 (1999).
2. Loscalzo, J. & Vita, J. A. *Nitric Oxide and the Cardiovascular System* (Humana Press, Totowa, New Jersey, 2000).
3. Jeremy, J. Y., Rowe, D., Emsley, A. M. & Newby, A. C. Nitric oxide and the proliferation of vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc Res* 43, 580-94 (1999).
4. Rudic, R. D. et al. Direct evidence for the importance of endothelium-derived nitric oxide in vascular remodeling. *J Clin Invest* 101, 731-6 (1998).
5. Ziche, M. et al. Nitric oxide synthase lies downstream from vascular endothelial growth factor-induced but not basic fibroblast growth factor-induced angiogenesis. *J Clin Invest* 99, 2625-34 (1997).
6. Andrew, P. J. & Mayer, B. Enzymatic function of nitric oxide synthases. *Cardiovasc Res* 43, 521-31 (1999).
7. Fulton, D., Gratton, J. P. & Sessa, W. C. Post-translational control of endothelial nitric oxide synthase: why isn't calcium/calmodulin enough? *J Pharmacol Exp Ther* 299, 818-24 (2001).
8. Govers, R. & Rabelink, T. J. Cellular regulation of endothelial nitric oxide synthase. *Am J Physiol Renal Physiol* 280, F193-206 (2001).
9. Marletta, M. A. Another activation switch for endothelial nitric oxide synthase: why does it have to be so complicated? *Trends Biochem Sci* 26, 519-21 (2001).
10. Fulton, D. et al. Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature* 399, 597-601 (1999).
11. Dimmeler, S. et al. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature* 399, 601-5 (1999).
12. Michell, B. J. et al. Coordinated control of endothelial nitric-oxide synthase phosphorylation by protein kinase C and the cAMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 276, 17625-8 (2001).
13. Butt, E. et al. Endothelial nitric-oxide synthase (type III) is activated and becomes calcium independent upon phosphorylation by cyclic nucleotide-dependent protein kinases. *J Biol Chem* 275, 5179-87 (2000).
14. Chen, Z. P. et al. AMP-activated protein kinase phosphorylation of endothelial NO synthase. *FEBS Lett* 443, 285-9 (1999).
15. Harris, M. B. et al. Reciprocal phosphorylation and regulation of endothelial nitric-oxide synthase in response to bradykinin stimulation. *J Biol Chem* 276, 16587-91 (2001).
16. Garcia-Cardena, G., Oh, P., Liu, J., Schnitzer, J. E. & Sessa, W. C. Targeting of nitric oxide synthase to endothelial cell caveolae via palmitoylation: implications for nitric oxide signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 6448-53 (1996).
17. Shaul, P. W. et al. Acylation targets endothelial nitric-oxide synthase to plasmalemmal caveolae. *J Biol Chem* 271, 6518-22 (1996).
18. Feron, O., Saldana, F., Michel, J. B. & Michel, T. The endothelial nitric-oxide synthase-caveolin regulatory cycle. *J Biol Chem* 273, 3125-8 (1998).
19. Michel, J. B., Feron, O., Sase, K., Prabhakar, P. & Michel, T. Caveolin versus calmodulin. Counterbalancing allosteric modulators of endothelial nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 272, 25907-12 (1997).

20. Michel, T. & Feron, O. Nitric oxide synthases: which, where, how, and why? *J Clin Invest* 100, 2146-52 (1997).
21. Lundstrom, K. et al. High-level expression of G protein-coupled receptors with the aid of the Semliki Forest virus expression system. *J Recept Signal Transduct Res* 15, 23-32 (1995).
22. Dedio J, K. P., Wohlfart P, Schroeder C, Kummer W, Müller-Esterl W. NOSIP, a novel modulator of endothelial nitric oxide synthase activity. *FASEB J* 15, 79-89 (2001).
23. Zimmermann, K. et al. From the Cover: NOSTRIN: A protein modulating nitric oxide release and subcellular distribution of endothelial nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 17167-72 (2002).
24. Lodish, H., Baltimore, D., Berk, A., Zipursky, S. L., Matsudaira, P. und Darnell, J. *Molecular cell biology* (ed. Lodish, H.) (Scientific American Books, New York, 1995).
25. Simons, K. & Ikonen, E. Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387, 569-72 (1997).
26. Harder, T. & Simons, K. Caveolae, DIGs, and the dynamics of sphingolipid-cholesterol microdomains. *Curr Opin Cell Biol* 9, 534-42 (1997).
27. Kurzchalia, T. V. & Parton, R. G. Membrane microdomains and caveolae. *Curr Opin Cell Biol* 11, 424-31 (1999).
28. Rothberg, K. G. et al. Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. *Cell* 68, 673-82 (1992).
29. Lisanti, M. P., Tang, Z. L. & Sargiacomo, M. Caveolin forms a hetero-oligomeric protein complex that interacts with an apical GPI-linked protein: implications for the biogenesis of caveolae. *J Cell Biol* 123, 595-604 (1993).
30. Brown, D. A. & Rose, J. K. Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell* 68, 533-44 (1992).
31. Dupree, P., Parton, R. G., Raposo, G., Kurzchalia, T. V. & Simons, K. Caveolae and sorting in the trans-Golgi network of epithelial cells. *Embo J* 12, 1597-605 (1993).
32. Anderson, R. G. The caveolae membrane system. *Annu Rev Biochem* 67, 199-225 (1998).
33. Li, S., Song, K. S. & Lisanti, M. P. Expression and characterization of recombinant caveolin. Purification by polyhistidine tagging and cholesterol-dependent incorporation into defined lipid membranes. *J Biol Chem* 271, 568-73 (1996).
34. Murata, M. et al. VIP21/caveolin is a cholesterol-binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 10339-43 (1995).
35. Scherer, P. E. et al. Identification, sequence, and expression of caveolin-2 defines a caveolin gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 131-5 (1996).
36. Scherer, P. E. et al. Caveolin isoforms differ in their N-terminal protein sequence and subcellular distribution. Identification and epitope mapping of an isoform-specific monoclonal antibody probe. *J Biol Chem* 270, 16395-401 (1995).
37. Scherer, P. E. et al. Cell-type and tissue-specific expression of caveolin-2. Caveolins 1 and 2 co-localize and form a stable hetero-oligomeric complex in vivo. *J Biol Chem* 272, 29337-46 (1997).
38. Tang, Z. et al. Molecular cloning of caveolin-3, a novel member of the caveolin gene family expressed predominantly in muscle. *J Biol Chem* 271, 2255-61 (1996).
39. Smart, E. J. et al. Caveolins, liquid-ordered domains, and signal transduction. *Mol Cell Biol* 19, 7289-304 (1999).
40. Monier, S. et al. VIP21-caveolin, a membrane protein constituent of the caveolar coat, oligomerizes in vivo and in vitro. *Mol Biol Cell* 6, 911-27 (1995).

41. Song, K. S., Tang, Z., Li, S. & Lisanti, M. P. Mutational analysis of the properties of caveolin-1. A novel role for the C-terminal domain in mediating homo-typic caveolin-caveolin interactions. *J Biol Chem* 272, 4398-403 (1997).
42. Fra, A. M., Masserini, M., Palestini, P., Sonnino, S. & Simons, K. A photo-reactive derivative of ganglioside GM1 specifically cross-links VIP21-caveolin on the cell surface. *FEBS Lett* 375, 11-4 (1995).
43. Sargiacomo, M., Sudol, M., Tang, Z. & Lisanti, M. P. Signal transducing molecules and glycosyl-phosphatidylinositol-linked proteins form a caveolin-rich insoluble complex in MDCK cells. *J Cell Biol* 122, 789-807 (1993).
44. Sargiacomo, M. et al. Oligomeric structure of caveolin: implications for caveolae membrane organization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 9407-11 (1995).
45. Li, S., Couet, J. & Lisanti, M. P. Src tyrosine kinases, Galpha subunits, and H-Ras share a common membrane-anchored scaffolding protein, caveolin. Caveolin binding negatively regulates the auto-activation of Src tyrosine kinases. *J Biol Chem* 271, 29182-90 (1996).
46. Garcia-Cardena, G., Fan, R., Stern, D. F., Liu, J. & Sessa, W. C. Endothelial nitric oxide synthase is regulated by tyrosine phosphorylation and interacts with caveolin-1. *J Biol Chem* 271, 27237-40 (1996).
47. Drab, M. et al. Loss of caveolae, vascular dysfunction, and pulmonary defects in caveolin-1 gene-disrupted mice. *Science* 293, 2449-52 (2001).
48. Opitz, N. Dissertationsschrift, FB Humanmedizin, Universitätsklinikum Frankfurt. (2006).
49. Zimmermann, K. Dissertationsschrift, FB Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften, Universität Frankfurt. (2002).
50. Zimmermann, K. et al. NOSTRIN: a protein modulating nitric oxide release and subcellular distribution of endothelial nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 17167-72 (2002).
51. Schilling, K. et al. Translocation of endothelial nitric-oxide synthase involves a ternary complex with caveolin-1 and NOSTRIN. *Mol Biol Cell* 17, 3870-80 (2006).
52. Icking, A. et al. NOSTRIN functions as a homotrimeric adaptor protein facilitating internalization of eNOS. *J Cell Sci* 118, 5059-69 (2005).
53. Icking, A., Schilling, K., Wiesenthal, A., Opitz, N. & Muller-Esterl, W. FCH/Cdc15 domain determines distinct subcellular localization of NOSTRIN. *FEBS Lett* 580, 223-8 (2006).
54. Lippincott, J. & Li, R. Involvement of PCH family proteins in cytokinesis and actin distribution. *Microsc Res Tech* 49, 168-72 (2000).
55. Aspenstrom, P. A Cdc42 target protein with homology to the non-kinase domain of FER has a potential role in regulating the actin cytoskeleton. *Curr Biol* 7, 479-87 (1997).
56. Spencer, S. et al. PSTPIP: a tyrosine phosphorylated cleavage furrow-associated protein that is a substrate for a PEST tyrosine phosphatase. *J Cell Biol* 138, 845-60 (1997).
57. Modregger, J., Ritter, B., Witter, B., Paulsson, M. & Plomann, M. All three PACSIN isoforms bind to endocytic proteins and inhibit endocytosis. *J Cell Sci* 113 Pt 24, 4511-21 (2000).
58. Kessels, M. M. & Qualmann, B. The syndapin protein family: linking membrane trafficking with the cytoskeleton. *J Cell Sci* 117, 3077-86 (2004).
59. Ho, H. Y. et al. Toca-1 mediates Cdc42-dependent actin nucleation by activating the N-WASP-WIP complex. *Cell* 118, 203-16 (2004).

60. Tian, L., Nelson, D. L. & Stewart, D. M. Cdc42-interacting protein 4 mediates binding of the Wiskott-Aldrich syndrome protein to microtubules. *J Biol Chem* 275, 7854-61 (2000).
61. Chitu, V. et al. The PCH family member MAYP/PSTPIP2 directly regulates F-actin bundling and enhances filopodia formation and motility in macrophages. *Mol Biol Cell* 16, 2947-59 (2005).
62. Qualmann, B. & Kelly, R. B. Syndapin isoforms participate in receptor-mediated endocytosis and actin organization. *J Cell Biol* 148, 1047-62 (2000).
63. Kamioka, Y. et al. A novel dynamin-associating molecule, formin-binding protein 17, induces tubular membrane invaginations and participates in endocytosis. *J Biol Chem* 279, 40091-9 (2004).
64. Itoh, T. et al. Dynamin and the actin cytoskeleton cooperatively regulate plasma membrane invagination by BAR and F-BAR proteins. *Dev Cell* 9, 791-804 (2005).
65. Tsujita, K. et al. Coordination between the actin cytoskeleton and membrane deformation by a novel membrane tubulation domain of PCH proteins is involved in endocytosis. *J Cell Biol* 172, 269-79 (2006).
66. Chitu, V. & Stanley, E. R. Pombe Cdc15 homology (PCH) proteins: coordinators of membrane-cytoskeletal interactions. *Trends Cell Biol* 17, 145-56 (2007).
67. Wiesenthal, A. Diplomarbeit, FB Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften, Universität Frankfurt. (2004)
68. Lopez, A. J. Alternative splicing of pre-mRNA: developmental consequences and mechanisms of regulation. *Annu Rev Genet* 32, 279-305 (1998).
69. Chabot, B. Directing alternative splicing: cast and scenarios. *Trends Genet* 12, 472-8 (1996).
70. Lynch, K. W. & Maniatis, T. Assembly of specific SR protein complexes on distinct regulatory elements of the *Drosophila* doublesex splicing enhancer. *Genes Dev* 10, 2089-101 (1996).
71. Adams, M. D., Rudner, D. Z. & Rio, D. C. Biochemistry and regulation of pre-mRNA splicing. *Curr Opin Cell Biol* 8, 331-9 (1996).
72. Min, H., Turck, C. W., Nikolic, J. M. & Black, D. L. A new regulatory protein, KSRP, mediates exon inclusion through an intronic splicing enhancer. *Genes Dev* 11, 1023-36 (1997).
73. Smith, C. W. & Valcarcel, J. Alternative pre-mRNA splicing: the logic of combinatorial control. *Trends Biochem Sci* 25, 381-8 (2000).
74. Maquat, L. E. Nonsense-mediated mRNA decay: splicing, translation and mRNP dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 89-99 (2004).
75. Wollerton, M. C., Gooding, C., Wagner, E. J., Garcia-Blanco, M. A. & Smith, C. W. Autoregulation of polypyrimidine tract binding protein by alternative splicing leading to nonsense-mediated decay. *Mol Cell* 13, 91-100 (2004).
76. Tange, T. O., Nott, A. & Moore, M. J. The ever-increasing complexities of the exon junction complex. *Curr Opin Cell Biol* 16, 279-84 (2004).
77. Le Hir, H., Moore, M. J. & Maquat, L. E. Pre-mRNA splicing alters mRNP composition: evidence for stable association of proteins at exon-exon junctions. *Genes Dev* 14, 1098-108 (2000).
78. Wilkinson, M. F. & Shyu, A. B. RNA surveillance by nuclear scanning? *Nat Cell Biol* 4, E144-7 (2002).
79. Kumar V, A. A., Fausto N. Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease (ed. JM, C.) (Elsevier Saunders, Philadelphia, 2005).
80. Goldman L, A. D. Cecil Textbook of Medicine (ed. Firedmann S, S. T.) (Goldman, Philadelphia, 2004).

81. Neimark, E., Schilsky, M. L. & Shneider, B. L. Wilson's disease and hemochromatosis. *Adolesc Med Clin* 15, 175-94, xi (2004).
82. Heidelbaugh, J. J. & Bruderly, M. Cirrhosis and chronic liver failure: part I. Diagnosis and evaluation. *Am Fam Physician* 74, 756-62 (2006).
83. United Network For Organ Sharing, (2006).
84. Leyland, H., Gentry, J., Arthur, M. J. & Benyon, R. C. The plasminogen-activating system in hepatic stellate cells. *Hepatology* 24, 1172-8 (1996).
85. Burt, A. D., Robertson, J. L., Heir, J. & MacSween, R. N. Desmin-containing stellate cells in rat liver; distribution in normal animals and response to experimental acute liver injury. *J Pathol* 150, 29-35 (1986).
86. Friedman, S. L., Roll, F. J., Boyles, J. & Bissell, D. M. Hepatic lipocytes: the principal collagen-producing cells of normal rat liver. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 8681-5 (1985).
87. Maher, J. J., Friedman, S. L., Roll, F. J. & Bissell, D. M. Immunolocalization of laminin in normal rat liver and biosynthesis of laminin by hepatic lipocytes in primary culture. *Gastroenterology* 94, 1053-62 (1988).
88. Arenson, D. M., Friedman, S. L. & Bissell, D. M. Formation of extracellular matrix in normal rat liver: lipocytes as a major source of proteoglycan. *Gastroenterology* 95, 441-7 (1988).
89. Ramadori, G., Rieder, H., Knittel, T., Dienes, H. P. & Meyer zum Buschenfelde, K. H. Fat storing cells (FSC) of rat liver synthesize and secrete fibronectin. Comparison with hepatocytes. *J Hepatol* 4, 190-7 (1987).
90. Friedman S, S. T. Cirrhosis and its sequelae. Goldmann, Cecil Textbook of Medicin 22nd ed., 936-44 (2004).
91. Cordoba, J. et al. Normal protein diet for episodic hepatic encephalopathy: results of a randomized study. *J Hepatol* 41, 38-43 (2004).
92. Naylor, C. D., O'Rourke, K., Detsky, A. S. & Baker, J. P. Parenteral nutrition with branched-chain amino acids in hepatic encephalopathy. A meta-analysis. *Gastroenterology* 97, 1033-42 (1989).
93. Jalan, R. & Hayes, P. C. UK guidelines on the management of variceal haemorrhage in cirrhotic patients. *British Society of Gastroenterology. Gut* 46 Suppl 3-4, III1-III15 (2000).
94. Runyon, B. A. Management of adult patients with ascites due to cirrhosis. *Hepatology* 39, 841-56 (2004).
95. Better, O. S. Renal and cardiovascular dysfunction in liver disease. *Kidney Int* 29, 598-607 (1986).
96. Gupta, T. K., Toruner, M., Chung, M. K. & Groszmann, R. J. Endothelial dysfunction and decreased production of nitric oxide in the intrahepatic microcirculation of cirrhotic rats. *Hepatology* 28, 926-31 (1998).
97. Rockey, D. C. & Chung, J. J. Reduced nitric oxide production by endothelial cells in cirrhotic rat liver: endothelial dysfunction in portal hypertension. *Gastroenterology* 114, 344-51 (1998).
98. Shah, V. et al. Impaired endothelial nitric oxide synthase activity associated with enhanced caveolin binding in experimental cirrhosis in the rat. *Gastroenterology* 117, 1222-8 (1999).
99. Morales-Ruiz, M. et al. Transduction of the liver with activated Akt normalizes portal pressure in cirrhotic rats. *Gastroenterology* 125, 522-31 (2003).
100. Fiorucci, S. et al. NCX-1000, a nitric oxide-releasing derivative of ursodeoxycholic acid, ameliorates portal hypertension and lowers norepinephrine-induced intrahepatic resistance in the isolated and perfused rat liver. *J Hepatol* 39, 932-9 (2003).

101. Van de Casteele, M. et al. In vivo gene transfer of endothelial nitric oxide synthase decreases portal pressure in anaesthetised carbon tetrachloride cirrhotic rats. *Gut* 51, 440-5 (2002).
102. Ashburn, J. H. et al. Remote trauma sensitizes hepatic microcirculation to endothelin via caveolin inhibition of eNOS activity. *Shock* 22, 120-30 (2004).
103. Achan, V. et al. all-trans-Retinoic acid increases nitric oxide synthesis by endothelial cells: a role for the induction of dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Circ Res* 90, 764-9 (2002).
104. Cho, D. H. et al. Retinoic acid decreases nitric oxide production in endothelial cells: a role of phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase at Ser(1179). *Biochem Biophys Res Commun* 326, 703-10 (2005).
105. Ross, A. C. Retinoid production and catabolism: role of diet in regulating retinol esterification and retinoic Acid oxidation. *J Nutr* 133, 291S-296S (2003).
106. De Luca, L. M. Retinoids and their receptors in differentiation, embryogenesis, and neoplasia. *Faseb J* 5, 2924-33 (1991).
107. Thacher, S. M., Vasudevan, J. & Chandraratna, R. A. Therapeutic applications for ligands of retinoid receptors. *Curr Pharm Des* 6, 25-58 (2000).
108. Barstad, R. M., Hamers, M. J., Stephens, R. W. & Sakariassen, K. S. Retinoic acid reduces induction of monocyte tissue factor and tissue factor/factor VIIa-dependent arterial thrombus formation. *Blood* 86, 212-8 (1995).
109. Koyama, T. & Hirosawa, S. Anticoagulant effects of synthetic retinoids and activated vitamin D3. *Semin Thromb Hemost* 24, 217-26 (1998).
110. Altucci, L. & Gronemeyer, H. Nuclear receptors in cell life and death. *Trends Endocrinol Metab* 12, 460-8 (2001).
111. Mangelsdorf, D. J. et al. The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 83, 835-9 (1995).
112. Love, J. M. & Gudas, L. J. Vitamin A, differentiation and cancer. *Curr Opin Cell Biol* 6, 825-31 (1994).
113. Akiyama, H. et al. Induction of VEGF gene expression by retinoic acid through Sp1-binding sites in retinoblastoma Y79 cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43, 1367-74 (2002).
114. Diaz, B. V. et al. Regulation of vascular endothelial growth factor expression in human keratinocytes by retinoids. *J Biol Chem* 275, 642-50 (2000).
115. Gonzalez, M. V., Gonzalez-Sancho, J. M., Caelles, C., Munoz, A. & Jimenez, B. Hormone-activated nuclear receptors inhibit the stimulation of the JNK and ERK signalling pathways in endothelial cells. *FEBS Lett* 459, 272-6 (1999).
116. R. P. Mookerjee*, A. Wiesenthal*, A. Icking, S. J. Hodges N. A. Davies, K. Schilling, S. Sen, R. Williams, M. Novelli, W. Müller-Esterl, R. Jalan. Increased gene and protein expression of the novel eNOS regulatory protein NOSTRIN and a variant in alcoholic hepatitis. *Gastroenterology* (accepted October 2006).
117. Wang, L. et al. Identification and genetic analysis of human and mouse activated Cdc42 interacting protein-4 isoforms. *Biochem Biophys Res Commun* 293, 1426-30 (2002).
118. Meurer, S., Pioch, S., Wagner, K., Muller-Esterl, W. & Gross, S. AGAP1, a novel binding partner of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase. *J Biol Chem* 279, 49346-54 (2004).
119. la Cour, T. et al. Analysis and prediction of leucine-rich nuclear export signals. *Protein Eng Des Sel* 17, 527-36 (2004).
120. Giordano, A. et al. Evidence for a functional nitric oxide synthase system in brown adipocyte nucleus. *FEBS Lett* 514, 135-40 (2002).

121. McNaughton, L. et al. Distribution of nitric oxide synthase in normal and cirrhotic human liver. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 17161-6 (2002).
122. Jagnandan, D., Sessa, W. C. & Fulton, D. Intracellular location regulates calcium-calmodulin-dependent activation of organelle-restricted eNOS. *Am J Physiol Cell Physiol* 289, C1024-33 (2005).
123. Katoh, M. & Katoh, M. Identification and characterization of human FCHSD1 and FCHSD2 genes in silico. *Int J Mol Med* 13, 749-54 (2004).
124. Choi, Y. J. et al. Cloning and characterization of mouse disabled 2 interacting protein 2, a mouse orthologue of human NOSTRIN. *Biochem Biophys Res Commun* 326, 594-9 (2005).
125. Kim, H. W. et al. Mouse disabled 2 interacting protein 2 functions as a transcriptional repressor through direct binding onto its own promoter. *Biochem Biophys Res Commun* 337, 75-81 (2005).
126. Cadepond, F. et al. Hormonal regulation of the nuclear localization signals of the human glucocorticosteroid receptor. *Exp Cell Res* 201, 99-108 (1992).
127. Jewell, C. M. et al. Immunocytochemical analysis of hormone mediated nuclear translocation of wild type and mutant glucocorticoid receptors. *J Steroid Biochem Mol Biol* 55, 135-46 (1995).
128. Vandromme, M. et al. Two nuclear localization signals present in the basic-helix 1 domains of MyoD promote its active nuclear translocation and can function independently. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 4646-50 (1995).
129. Wen, S. T., Jackson, P. K. & Van Etten, R. A. The cytostatic function of c-Abl is controlled by multiple nuclear localization signals and requires the p53 and Rb tumor suppressor gene products. *Embo J* 15, 1583-95 (1996).
130. Cote, J. F. et al. PSTPIP is a substrate of PTP-PEST and serves as a scaffold guiding PTP-PEST toward a specific dephosphorylation of WASP. *J Biol Chem* 277, 2973-86 (2002).
131. Duma, D., Jewell, C. M. & Cidlowski, J. A. Multiple glucocorticoid receptor isoforms and mechanisms of post-translational modification. *J Steroid Biochem Mol Biol* 102, 11-21 (2006).
132. Oakley, R. H., Jewell, C. M., Yudt, M. R., Bofetiado, D. M. & Cidlowski, J. A. The dominant negative activity of the human glucocorticoid receptor beta isoform. Specificity and mechanisms of action. *J Biol Chem* 274, 27857-66 (1999).
133. Oakley, R. H., Webster, J. C., Sar, M., Parker, C. R., Jr. & Cidlowski, J. A. Expression and subcellular distribution of the beta-isoform of the human glucocorticoid receptor. *Endocrinology* 138, 5028-38 (1997).
134. Isohashi, F. & Okamoto, K. ATP-stimulated translocation promoter that enhances the nuclear binding of activated glucocorticoid receptor complex. *Biochemical properties and its function (mini-review)*. *Receptor* 3, 113-24 (1993).
135. Barnes, P. J. Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: molecular mechanisms. *Clin Sci (Lond)* 94, 557-72 (1998).
136. Xiang, W., Chen, H., Guo, Y. & Shen, H. Expression of endothelial nitric oxide synthase traffic inducer in the placenta of pregnancy induced hypertension. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 26, 356-8 (2006).
137. Smarason, A. K., Allman, K. G., Young, D. & Redman, C. W. Elevated levels of serum nitrate, a stable end product of nitric oxide, in women with pre-eclampsia. *Br J Obstet Gynaecol* 104, 538-43 (1997).
138. Davidge, S. T., Stranko, C. P. & Roberts, J. M. Urine but not plasma nitric oxide metabolites are decreased in women with preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 174, 1008-13 (1996).

139. Diejomaoh, F. M. et al. Nitric oxide production is not altered in preeclampsia. *Arch Gynecol Obstet* 269, 237-43 (2004).
140. Kalmyrzaev, B. et al. Genome-wide scan for premature hypertension supports linkage to chromosome 2 in a large Kyrgyz family. *Hypertension* 48, 908-13 (2006).

9 Abkürzungsverzeichnis

α -...	Antikörper gegen ...
Abb.	Abbildung
AS	<u>A</u> minosäure
BH ₄	Tetrahydrobiopterin
BLAST	<u>B</u> asic <u>l</u> ocal <u>a</u> lignment <u>s</u> earch <u>t</u> ool
bp	<u>B</u> asenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (<u>b</u> ovine <u>s</u> erum <u>a</u> lbumin)
CaM	Calmodulin
CHO-Zellen	Zellen des Ovars eines chinesischen Zwerghamsters (<u>c</u> hinese <u>h</u> amster <u>o</u> vary <u>c</u> ells)
CHO-eNOS-Zellen	stabil eNOS exprimierende CHO-Zellen
cpm	<u>c</u> ounts <u>p</u> er <u>m</u> inute
cDNA	<u>c</u> opy- <u>D</u> N <u>A</u>
C _T	Schwellenwert-Zyklus (<u>T</u> hreshold <u>c</u> ycle)
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<u>d</u> eoxyribo <u>n</u> ucleic <u>a</u> cid)
EMSA	<u>e</u> lectrophoretic <u>m</u> obility <u>s</u> hift <u>a</u> ssay
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid(<u>N</u> O)-Synthase
FCS	fötale Kälberserum (<u>f</u> etal <u>c</u> alf <u>s</u> erum)
GSH	Glutathion
GST	<u>G</u> lutathion- <u>S</u> - <u>T</u> ransferase
HUVEC	humane Nabelschnurendothelzellen (<u>h</u> uman <u>u</u> mbilical <u>c</u> ord <u>v</u> ein <u>e</u> ndothelial <u>c</u> ells)
HMVEC	humane mikrovaskuläre Endothelzellen (<u>h</u> uman <u>m</u> icrovascular <u>e</u> ndothelial <u>c</u> ells)
IB	<u>I</u> mmunoblot
IF	<u>I</u> mmunfluoreszenz
kDa	<u>K</u> ilodalton
$\lambda_{\text{ex,max}}$	Maximum der Exitationswellenlänge
$\lambda_{\text{em,max}}$	Maximum der Emissionswellenlänge
NO	Stickstoffmonoxid
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung

	<i>(phosphate buffered saline)</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion <i>(polymerase chain reaction)</i>
qRT-PCR	quantitative Echtzeit PCR <i>(quantitative real time PCR)</i>
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
RT	Raumtemperatur
SDS-PAGE	<u>SDS</u> (<i>sodium dodecylsulfate</i> , Natriumdodecylsulfat) <u>Polyacrylamid-Gelelektrophorese</u>
U	Einheit (<i>unit</i>)
Y2H-System	Hefe-zwei-Hybrid-Sytem (<i>yeast two-hybrid-</i>)

10 Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name: Anja Wiesenthal
Geburtsdatum: 11.07.1979
Geburtsort: Detmold / Lippe - NRW
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig
Adresse: Dalbergergasse 8
64625 Bensheim

Schulausbildung

08.1985 Einschulung in die Grundschule Klüt
08.1989 Wechsel auf die Geschwister-Scholl-Gesamtschule Detmold, Besuch der Sek. I und Sek. II
10.06.1998 Aushändigung des Zeugnisses der Allgemeinen Hochschulreife

Studium

18.08.1998 Beginn des Studiums der Biochemie an der Universität Bielefeld
19.04.2001 Aushändigung des Prüfungszeugnis der Diplom-Vorprüfung in Biochemie
04.2001-01.2004 Studienortswechsel an die Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main, Fortführung des Biochemie-Studiums
08.2003 – 01.2004 Diplomarbeit bei Prof. Müller-Esterl, am Institut für Biochemie II, Universität Frankfurt / Main
09.01.2004 Aushändigung des Diplomzeugnisses, Verleihung des akademischen Grads Diplom-Biochemikerin
18.08.2004 Annahme als Doktorand im Arbeitskreis von Prof. Müller-Esterl am Institut für Biochemie II, Universität Frankfurt / Main

Auslandsaufenthalt

08.2002 - Aufenthalt in Nara / Japan als Internship-Studentin der Firma Bayer
02.2003 im Research Center Kyoto (RCK)

11 Veröffentlichungen

11.1 Publikationen

Rajeshwar P. Mookerjee*, **Anja Wiesenthal***, Ann Icking, Stephen J. Hodges, Nathan A. Davies, Kirstin Schilling, Sambit Sen, Roger Williams, Marco Novelli, Werner Müller-Esterl, Rajiv Jalan

Increased gene and protein expression of the novel eNOS regulatory protein NOSTRIN and a variant in alcoholic hepatitis

Gastroenterology, accepted Oct. 12, 2006, in press

Kirstin Schilling*, Nils Opitz*, **Anja Wiesenthal**, Stefanie Oess, Ritva Tikkanen, Werner Müller-Esterl and Ann Icking

Translocation of endothelial nitric-oxide synthase involves a ternary complex with caveolin-1 and NOSTRIN.

Mol Biol Cell. 2006;17:3870-80.

Ann Icking*, Kirstin Schilling*, **Anja Wiesenthal**, Nils Opitz, Werner Müller-Esterl

FCH/Cdc15 domain determines distinct subcellular localization of NOSTRIN.

FEBS Lett. 2006;580:223-8.

Ann Icking*, Simone Matt*, Nils Opitz, **Anja Wiesenthal**, Werner Müller-Esterl and Kirstin Schilling

NOSTRIN functions as a homotrimeric adaptor protein facilitating internalization of eNOS.

J Cell Sci. 2005;118:5059-69.

11.2 Vorträge / Präsentationen

30.05.2006 Posterpräsentation auf dem FEBS Special Meeting, Cellular Signaling in Dubrovnik / Kroatien
„NOSTRIN functions as a multivalent adaptor in caveolar trafficking of eNOS“

15.03.2005 Vortrag auf der 46. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie (DGPT) in Mainz
„Differentielle Expression der NOSTRIN-Varianten alpha und beta in zirrhotischen Lebererkrankungen“

* geteilte Erstautorenschaft

12 Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides Statt, dass ich meine Dissertation selbständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt und dass ich noch keinen Promotionsversuch unternommen habe.

Frankfurt a. M., den

.....
(Anja Wiesenthal)