

**NOSTRIN – ein neuer Interaktionspartner der  
endothelialen NO-Synthase**

**Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften**

**vorgelegt beim Fachbereich  
Chemische und pharmazeutische Wissenschaften  
der Johann Wolfgang Goethe – Universität  
in Frankfurt am Main**

**von  
Kirstin Zimmermann  
aus Altdöbern**

**Frankfurt 2002**

vom Fachbereich Chemische und pharmazeutische Wissenschaften der  
Johann Wolfgang Goethe – Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. Walter E. Müller

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

Datum der Disputation: 20.12.2002

## Danksagung

Ich danke Prof. Dr. Werner Müller-Esterl für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, für hilfreiche und richtungsweisende Diskussionen sowie für die Schaffung eines großzügigen und konstruktiven wissenschaftlichen Umfeldes.

Prof. Dr. Bernd Ludwig danke ich für die freundliche Bereitschaft, die Betreuung dieser Arbeit innerhalb des Fachbereiches Chemische und pharmazeutische Wissenschaften zu übernehmen.

Weiterhin danke ich Prof. Dr. Joseph Pfeilschifter und besonders Dr. Andrea Huwiler sowie Simone Dorsch für die Unterstützung bei der Durchführung der konfokalen Immunfluoreszenzmikroskopie.

Ich danke Dr. Jürgen Dedio für seine Betreuung und die Einführung in die Geheimnisse und Tücken der Molekularbiologie, wobei er für mich zum Vorbild für effiziente Arbeitsweise wurde.

Ganz besonders danke ich Nils Opitz für die exzellente Zusammenarbeit, mit welcher durch ständige Diskussionen und kritisches Hinterfragen sowie viele neue Ideen und wilde Hypothesen die Erforschung von NOSTRIN vorangetrieben wurde.

Dr. Stefanie Oess danke ich herzlich für die kompetente und engagierte Betreuung, die andauernde Förderung dieses Projektes sowie viele hilfreiche Ratschläge und Diskussion. Vielen Dank.

Ich danke allen Laborkollegen für ihre Hilfsbereitschaft und ein ausgesprochen gutes Arbeitsklima. Besonders bedanke ich mich bei Sabine Meurer für ihre Hilfe bei Problemen des Laboralltages sowie das sorgfältige Korrekturlesen dieser Arbeit und bei Dr. Thomas Renné für unzählige Diskussionen und stetes Anspornen. Sabine Graf danke ich für 5 Wochen intensives und erfolgreiches „Westernblotten“. Ein Dankeschön auch an Stefan Kieß, Sylke Pioch, Michael Schleicher und Freddy Brundin für das Korrekturlesen dieser Arbeit. Dr. Armin Maidhof und Frau Brigitte Welsch sowie Dr. Georg Voelcker und Frau Barbara Pfeiffer danke ich für die Herstellung zahlreicher Antikörper. Nicht zuletzt danke ich Mirjam Weisser für die freundliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe in Mainz und für die Einführung in die experimentellen Grundlagen der Molekularbiologie.

Vor allem danke ich Ingo Schilling und meinen Eltern für die moralische und finanzielle Unterstützung, für ihr Verständnis und Interesse an meiner Arbeit.

---

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Summary</b>	<b>3</b>
<b>3</b>	<b>Einleitung</b>	<b>4</b>
3.1	Stickstoffmonoxid – ein wichtiger Botenstoff in biologischen Systemen	4
3.2	Die endotheliale NO-Synthase	5
3.2.1	Physiologische und pathophysiologische Bedeutung der eNOS	5
3.2.2	Die Struktur der eNOS	5
3.2.3	Die Regulation der eNOS-Aktivität	6
3.2.4	Der Signaltransduktionszyklus der eNOS	7
3.3	Zielsetzung	9
<b>4</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>10</b>
4.1	Spezielle Geräte	10
4.1.1	Fluoreszenz-Imagingsysteme	10
4.1.2	Andere Geräte	10
4.2	Materialien	10
4.2.1	Verbrauchsmaterialien	10
4.2.2	Chemikalien und spezielle Reagenzien	11
4.2.3	Antikörper	11
4.2.4	Enzyme und Kits	12
4.2.5	Vektoren	13
4.2.6	Oligonukleotide	13
4.2.7	Bakterienstämme	13
4.2.8	Zelllinien	13
4.3	Datenbankanalysen	14
4.4	Molekularbiologische Methoden	14
4.4.1	Elektrophoresetechnik zur Analyse von Nukleinsäuren	14
4.4.2	Herstellung von cDNA und 5'-RACE	14
4.4.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	15
4.4.4	Klonierung von cDNA-Fragmenten	16
4.5	Zellbiologische Methoden	17
4.5.1	Zellkultur	17

Inhaltsverzeichnis	V	
4.5.2	Transfektion von eukaryotischen Zellen	17
4.5.3	Infektion eukaryotischer Zellen mit Semliki Forest Virus (SFV)	18
4.6	Proteinchemische Methoden	19
4.6.1	Probenaufbereitung	19
4.6.2	Proteinaufreinigung und –konzentrationsbestimmung	19
4.6.3	Translation von [ <sup>35</sup> S]-markierter eNOS <i>in vitro</i>	20
4.6.4	Immunoblotting	21
4.6.5	Copräzipitationsexperimente	22
4.6.5.1	Coimmunpräzipitation nach Coexpression von NOSTRIN und eNOS	22
4.6.5.2	GST-Pulldown mit [ <sup>35</sup> S]-markierter eNOS	22
4.6.6	GST-Pulldown mit CHO-eNOS-Zelllysat	22
4.7	Immunofluoreszenzmikroskopie	23
4.8	Bestimmung der eNOS-Aktivität	24
<b>5</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>26</b>
5.1	Identifizierung von NOSTRIN	26
5.1.1	Vorarbeiten zur Identifizierung von NOSTRIN	26
5.1.2	Klonierung der NOSTRIN-cDNA in voller Länge	26
5.1.3	Analyse der DNA-Sequenz	28
5.1.4	Analyse der Proteinsequenz	30
5.1.5	Expression von NOSTRIN	31
5.2	Herstellung und Expression verschiedener Konstrukte von NOSTRIN bzw. der eNOS	32
5.2.1	Herstellung und Analyse von SFV-NOSTRIN, SFV-NOSTRIN $\Delta$ SH3 und SFV-NOSTRIN $\Delta$ Cdc15	32
5.2.2	Expression und Reinigung der GST-Fusionsproteine GST-NOSTRIN und GST-NOSTRIN $\Delta$ SH3	33
5.2.3	<i>In-vitro</i> -Herstellung [ <sup>35</sup> S]-markierter eNOS	34
5.3	Die Interaktion zwischen eNOS und NOSTRIN	35
5.3.1	Coimmunpräzipitation von eNOS und NOSTRIN in Zelllysaten	35
5.3.2	Copräzipitation von eNOS und NOSTRIN <i>in vitro</i>	36
5.4	Subzelluläre Lokalisation von NOSTRIN	38
5.4.1	Colokalisation von NOSTRIN und eNOS	38
5.4.2	Colokalisation von NOSTRIN und Caveolin-1	40
5.4.3	Der ternäre Komplex aus NOSTRIN, eNOS und Caveolin-1	42
5.5	Der Einfluss von NOSTRIN auf die eNOS-Aktivität	43
5.6	Das endogene NOSTRIN in Primärzellen des humanen Endothels	45

Inhaltsverzeichnis	VI	
5.6.1	Das Vorkommen von NOSTRIN in HUVEC und HMVEC	45
5.6.2	Die Lokalisation des endogenen NOSTRIN	46
5.6.3	Die Colokalisation von NOSTRIN und eNOS in HUVEC	47
<b>6</b>	<b>Diskussion und Ausblick</b>	<b>49</b>
6.1	NOSTRIN - ein neues humanes Protein	49
6.1.1	Die Identifizierung von NOSTRIN	49
6.1.2	Die Expression von NOSTRIN	50
6.1.3	Die Struktur von NOSTRIN	51
6.2	NOSTRIN - ein neuer Interaktionspartner der eNOS	52
6.3	NOSTRIN- ein Modulator der subzellulären Verteilung der eNOS	53
6.4	NOSTRIN - ein Modulator der eNOS-Aktivität	54
6.5	NOSTRIN, eNOS und Caveolin-1 – ein ternärer Komplex	56
6.6	NOSTRIN - Physiologische Bedeutung und Ausblick	58
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>59</b>
<b>8</b>	<b>Anhang</b>	<b>62</b>
8.1	Abkürzungsverzeichnis	62
8.2	NOSTRIN-spezifische Antikörper	64
<b>9</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>65</b>
<b>10</b>	<b>Eidesstattliche Erklärung</b>	<b>67</b>

## 1 Zusammenfassung

Stickstoffmonoxid (NO) ist ein gasförmiger Botenstoff, der über die Regulation des Vasotonus, die Hemmung der Thrombocytenaggregation sowie die Stimulation der Angiogenese auf die vaskuläre Homöostase einwirkt. Das wichtigste NO-produzierende Enzym im kardiovaskulären System ist die endotheliale NO-Synthase (eNOS), deren Aktivität durch posttranslationale Modifikationen wie Phosphorylierung und Acylierung, durch Interaktionen mit regulatorischen Proteinen wie  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin und Caveolin sowie durch differentielle subzelluläre Lokalisation reguliert wird. Dabei sind die Faktoren, welche die (Trans-)Lokation der eNOS zwischen subzellulären Kompartimenten wie den Caveolae der Plasmamembran und dem Golgi-Apparat dirigieren, weitgehend unbekannt.

Zur Identifizierung neuer Interaktionspartner wurde humane eNOS im „yeast two-hybrid“-System als „Köderprotein“ eingesetzt und dabei das Fragment eines neuen humanen Proteins identifiziert, das vorläufig NOSTRIN (für: eNOS traffic inducer) genannt wurde. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit gelang nun die Klonierung der kompletten NOSTRIN-cDNA, der Nachweis einer spezifischen Interaktion von eNOS und NOSTRIN in Säugerzellen sowie die Charakterisierung von NOSTRIN als Modulator der subzellulären Lokalisation und Aktivität von eNOS.

Nach der kompletten Klonierung der NOSTRIN-cDNA mit Hilfe einer 5'-RACE resultierte ein offenes Leseraster von 506 Aminosäuren entsprechend einer Größe von ca. 58 kDa für NOSTRIN. Eine Datenbankrecherche zum Vergleich der NOSTRIN-Sequenz mit Sequenzen bekannter Proteinmotive ergab die Vorhersage einer N-terminalen Cdc15-Domäne sowie einer C-terminalen SH3-Domäne. Die direkte Interaktion zwischen eNOS und NOSTRIN konnte durch Copräzipitation *in vivo* und *in vitro* bestätigt werden. Weiterhin wurde nachgewiesen, dass die SH3-Domäne von NOSTRIN essentiell für die Bindung an eNOS ist. Zur Untersuchung des Einflusses von NOSTRIN auf die eNOS-Lokalisation wurden stabil transfizierte CHO-Zellen, die eNOS überexprimierten („CHO-eNOS“) eingesetzt. In der Immunfluoreszenz war eNOS vornehmlich in Assoziation mit der Plasmamembran und dem Golgi-Apparat zu sehen. Mit Hilfe des Semliki-Forest-Virussystems (SFV) wurde nun NOSTRIN transient überexprimiert; dabei zeigte sich für NOSTRIN eine vesikelartige Verteilung im Cytoplasma. Die NOSTRIN-Überexpression führte zu einer drastischen Umverteilung von eNOS, die nun in charakteristischen vesikelartigen Strukturen mit NOSTRIN colokalisierte. Die Verwendung von NOSTRIN-Konstrukten, bei denen die SH3-Domäne deletiert war („NOSTRIN $\Delta$ SH3“), veränderte zwar die typische NOSTRIN-Lokalisation nicht, ließ aber auch die subzelluläre Verteilung von eNOS unverändert, so dass NOSTRIN $\Delta$ SH3 und eNOS in unterschiedlichen zellulären Kompartimenten lokalisiert waren.

Mit Hilfe der Immunofluoreszenz konnte ebenfalls eine Colokalisation von NOSTRIN und Caveolin-1, einem inhibitorisch wirkenden Interaktionspartner von eNOS, nachgewiesen werden. Die Analyse von Copräzipitationen mit NOSTRIN bzw. NOSTRIN $\Delta$ SH3 zeigte, dass Caveolin-1 in eNOS-unabhängiger Weise an NOSTRIN bindet, so dass ein ternärer Komplex aus NOSTRIN, eNOS und Caveolin-1 resultiert. Zur Klärung der Frage, ob NOSTRIN neben der subzellulären Lokalisation auch die Aktivität von eNOS beeinflusst, wurde die NO-Freisetzung von CHO-eNOS-Zellen analysiert. Dabei ergab sich, dass die transiente Überexpression von NOSTRIN in CHO-eNOS-Zellen die eNOS-Aktivität um 62 % im Vergleich zu Kontrollzellen reduzierte. In humanen primären Endothelzellen konnte mittels Immunoblotting und Immunofluoreszenzmikroskopie das Vorkommen von endogenem NOSTRIN sowie dessen Colokalisation mit endogener eNOS an der Plasmamembran nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse der vorliegenden Dissertation führen zur Hypothese, dass NOSTRIN als „molekulare Klammer“ zwischen eNOS und Caveolin-1 dient, eine dynamische Umverteilung von eNOS innerhalb der Zelle vermittelt und damit das Enzym – direkt und/oder indirekt – inhibiert. Somit dürfte NOSTRIN als Modulator der Aktivität und Lokalisation von eNOS eine wichtige Rolle bei der Regulation der endothelialen NO-Produktion spielen.



## 2 Summary

The activity of the endothelial nitric oxide synthase (eNOS) is tightly regulated by changes in intracellular  $\text{Ca}^{2+}$ -concentration, posttranslational modification and by interaction with proteins like caveolin and Hsp90. Following stimulation, eNOS cycles between plasma membrane caveolae and intracellular compartments, a process involving reversible acylation and specific protein-protein interactions, e.g. with the recently identified eNOS interacting protein, NOSIP. Nevertheless stimulus induced translocation of eNOS is yet controversial and the underlying mechanism still poorly understood.

A novel eNOS binding protein previously identified in a yeast-two-hybrid (Y2H) screen using the eNOS oxygenase domain as bait, was cloned full length by application of 5'-RACE and subsequently termed NOSTRIN, meaning eNOS traffic inducer. NOSTRIN is a 58 kDa protein containing a N-terminal cdc15 and a C-terminal SH3 domain. Co-precipitation experiments confirmed the eNOS-NOSTRIN interaction both *in vivo* and *in vitro* and revealed that NOSTRIN's SH3 domain is essential for eNOS binding. Immunofluorescence studies showed that wild type NOSTRIN overexpressed in CHO-eNOS cells localized in punctuate cytoplasmic structures, whereas a deletion mutant lacking the cdc15 domain exhibited a more diffuse cytoplasmic distribution. Overexpression of NOSTRIN also caused eNOS localization to change dramatically from the plasma membrane-bound state to a vesicle-like distribution, matching the NOSTRIN pattern. Deletion of the NOSTRIN SH3 domain abolished colocalisation with eNOS, underscoring that this domain is the eNOS binding site. Furthermore the characteristic structures containing NOSTRIN and eNOS were also shown to colocalize with caveolin-1-rich intracellular vesicles. Co-precipitation of caveolin-1 with NOSTRIN and NOSTRIN $\Delta$ SH3 demonstrated a direct interaction between NOSTRIN and caveolin-1 which was independent of eNOS binding, thus suggesting the existence of a ternary complex containing NOSTRIN, eNOS and cavolin-1. Finally, measuring nitric oxide release showed that NOSTRIN caused a significant decrease in eNOS activity (62 %) when overexpressed in CHO-eNOS cells. Using immunoblotting and immunofluorescence microscopy endogenous expression of NOSTRIN has been shown in primary human endothelial cells where it co-localizes extensively with eNOS at the plasma membrane. Taken together these results suggest that NOSTRIN modulates the enzymatic activity and the subcellular localization of eNOS. Furthermore through interaction with caveolin-1 NOSTRIN might modulate the inhibitory interaction between caveolin-1 and eNOS.

## 3 Einleitung

### 3.1 Stickstoffmonoxid – ein wichtiger Botenstoff in biologischen Systemen

Bereits im Jahre 1879 wurde die biologische Wirksamkeit von Nitroglycerin in einer von William Murrell in der britischen Zeitschrift „The Lancet“ veröffentlichten Studie an Angina pectoris-Patienten beschrieben (1). Es vergingen jedoch 100 Jahre bis Stickstoffmonoxid (NO) als physiologischer Botenstoff identifiziert wurde und der Wirkmechanismus des Nitroglycerins auf seine Fähigkeit zur NO-Freisetzung zurückgeführt werden konnte: 1980 postulierte Robert Furchgott zunächst einen „vom Endothel gebildeten Relaxationfaktor“ (EDRF)(2), der durch die Arbeitsgruppen von Louis Ignarro (3) und Salvador Moncada (4) als Stickstoffmonoxid erkannt wurde.

Heute wissen wir, dass NO von einer Enzymfamilie, den NO-Synthasen (L-Arginin-NADPH-Sauerstoff-Oxidoreduktase [Stickstoffmonoxid bildend]; EC 1.14.13.39), durch Umwandlung von L-Arginin in L-Citrullin gebildet wird (5). In Säugetieren sind drei Isoformen der NO-Synthase (NOS) bekannt: die induzierbare NOS (iNOS), die neuronale NOS (nNOS) und die endotheliale NOS (eNOS). Die iNOS wird in Makrophagen, glatten Muskelzellen und vielen anderen Zellen zum Beispiel durch Cytokine oder Lipopolysaccharide induziert und produziert NO als wichtiges Effektormolekül der unspezifischen Immunabwehr (5, 6). Die NO-Synthese als Mittel zur Bekämpfung von Krankheitserregern ist phylogenetisch stark verankert, denn auch primitivere Tiere wie z.B. Insekten sowie einige Pilz- und Pflanzenarten nutzen die cytotoxischen Eigenschaften des radikalischen Stickstoffmonoxids (7, 8). Im Gegensatz zur iNOS werden nNOS und eNOS konstitutiv exprimiert. Die nNOS kommt hauptsächlich in neuronalen Zelltypen vor, in denen das gebildete NO als Neuromodulator oder retrograder Neurotransmitter wirkt; sie ist aber auch im Skelettmuskel und in einigen anderen Organen zu finden (5, 9). Die eNOS schließlich, die sich hauptsächlich in Endothelzellen sowie in kleineren Mengen in Kardiomyozyten und in Thrombozyten befindet, spielt eine Schlüsselrolle bei der Regulation der Homöostase im kardiovaskulären System (9).

Stickstoffmonoxid entfaltet seine biologische Wirkung sowohl am Syntheseort als auch in benachbarten Zellen. Mit einer für ein Radikal relativ langen Halbwertszeit in biologischen Systemen von bis zu 5 s besitzt es einen Diffusionsradius von etwa 20 bis 200  $\mu\text{m}$  und kann somit auch biologische Membranen passieren (10).

Der physiologische NO-Rezeptor ist die ubiquitär vorkommende lösliche Guanylatzyklase, die NO über das Eisenion ( $\text{Fe}^{2+}$ ) seiner Hämgruppe bindet (11). Für die Immunabwehr, aber auch bei pathologischen Prozessen wichtig, sind vor allem Reaktionen mit anderen Radikalen, beispielsweise mit Superoxid ( $\text{O}_2^-$ ) zum hochreaktiven Peroxynitrit ( $\text{ONOO}^-$ ) (12).

## 3.2 Die endotheliale NO-Synthase

### 3.2.1 Physiologische und pathophysiologische Bedeutung der eNOS

Im Herz-Kreislaufsystem spielt die NO-Synthese durch die endotheliale NOS eine zentrale Rolle. Neben der wichtigsten Funktion als Vasodilatator vermittelt NO die Inhibition der Thrombozytenaggregation und verhindert die Leukozytenadhäsion an die Gefäßwand sowie die Proliferation der glatten Muskelzellen. Zu den physiologisch wichtigen Stimuli der eNOS zählen hierbei v.a. Bradykinin, VEGF, Acetylcholin und die Scherkraft des Blutstromes (Übersicht in (13)). Darüber hinaus induziert die VEGF-vermittelte NO-Synthese die Umbildung von Blutgefäßen („remodeling“) sowie die Gefäßneubildung (Angiogenese) (14, 15). Hingegen ist bei zahlreichen pathologischen Prozessen, wie z.B. bei Bluthochdruck, Herzinsuffizienz und Artherosklerose, die Synthese des NO oder dessen Bioverfügbarkeit vermindert (13, 16, 17). Weitere Hinweise zu Bedeutung und Funktion der eNOS lieferte die von Huang et al. 1995 konstruierte eNOS-Knockout-Maus, welche u.a. einen um 20 bis 30 % erhöhten Blutdruck im Vergleich zu Kontrolltieren zeigte. Jedoch lässt der erstaunlich „milde Phänotyp“ vermuten, dass das Fehlen der eNOS teilweise durch die nNOS kompensiert werden kann (18, 19).

### 3.2.2 Die Struktur der eNOS

In ihrer aktiven Form liegt die eNOS stets als Homodimer vor, wobei jede der 130 kDa großen Untereinheiten aus einer N-terminalen Oxygenase- und einer C-terminalen Reduktasedomäne besteht (Abb. 3-1).

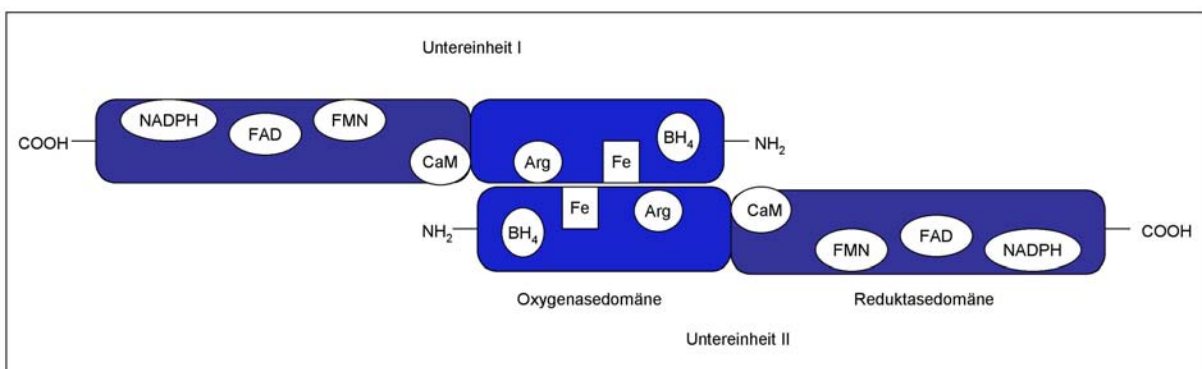


Abb. 3-1: Die Struktur der eNOS mit Cofaktor- und Substratbindestellen.

Die Reduktasedomäne, die große Ähnlichkeit mit der Cytochrom P-450 Reduktase zeigt, vermittelt den Elektronentransfer von NADPH über die gebundenen Cofaktoren FAD und FMN bis zur Hämgruppe in der Oxygenasedomäne. Dort erfolgt unter Verbrauch von

molekularem Sauerstoff die Biosynthese von NO in einer zweistufigen Oxidation ausgehend von L-Arginin über N<sup>G</sup>-Hydroxy-L-Arginin zu den Produkten L-Citrullin und Stickstoffmonoxid (Abb. 3-2).

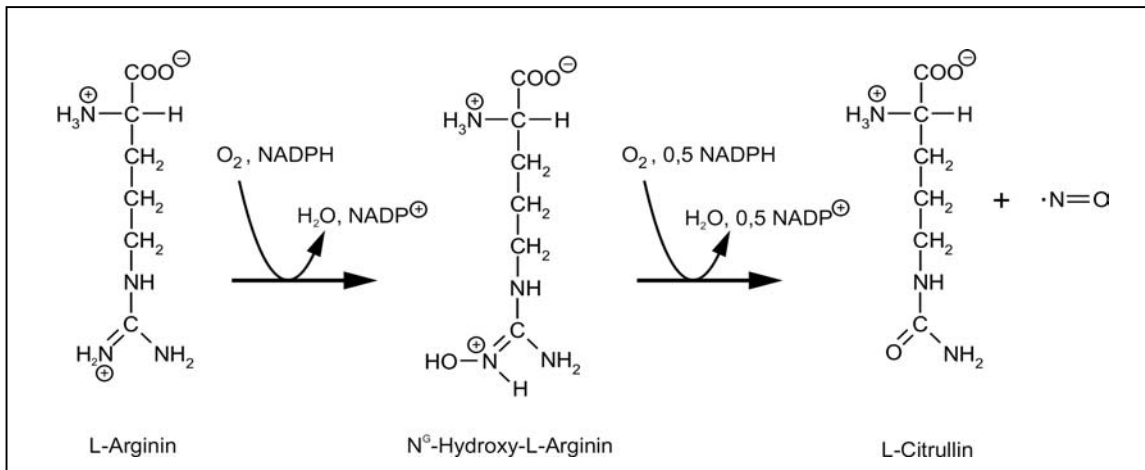


Abb. 3-2: Die NOS-katalysierte NO-Synthesereaktion.

Die Rolle des ebenfalls über die Oxygenasedomäne gebundenen Tetrahydrobiopterins ist Gegenstand aktueller Diskussion. Desweiteren befindet sich zwischen der Reduktase- und der Oxygenasedomäne eine Bindestelle für Ca<sup>2+</sup>-aktiviertes Calmodulin (Ca<sup>2+</sup>/CaM). Dessen Bindung führt zu einer Konformationsänderung der eNOS, wodurch der Elektronentransport von der Reduktase- zur Oxygenasedomäne ermöglicht wird. (20)

### 3.2.3 Die Regulation der eNOS-Aktivität

Physiologische Stimuli der eNOS, wie z.B. das Hormon Bradykinin, bewirken in erster Linie über eine Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration und Bindung des Ca<sup>2+</sup>/CaM-Komplexes eine Aktivierung der eNOS. Darüber hinaus existieren zahlreiche weitere Regulationsmechanismen einschließlich Phosphorylierung, Acylierung sowie Protein-Protein-Interaktionen (21, 22). Die Stimulation mit VEGF oder durch Scherkraft führt zu einer Phosphorylierung der eNOS an Ser1177, die eine eNOS-Aktivierung sogar bei niedrigen Kalziumkonzentrationen bewirkt (23, 24). Als verantwortliche Kinase wurde zunächst die Proteinkinase B ermittelt (23, 24); jedoch können auch die AMP-abhängige Kinase (25), die Proteinkinase A (26) sowie die Proteinkinase G (27) das Ser1177 der eNOS phosphorylieren. Dagegen führt die Phosphorylierung der eNOS an Thr495 durch die AMP-abhängige Kinase (25) oder durch die Proteinkinase C (26, 28) zu einer Inhibition der eNOS-Aktivität. Neben der Modifikation durch Phosphorylierung wird die eNOS sowohl posttranslational N-myristyliert als auch an zwei Cysteinresten reversibel palmytyliert. Wie Studien an acylierungsdefizienten Mutanten zeigen, dient dies der korrekten Lokalisation der eNOS am Golgi-Apparat sowie an spezialisierten Plasmamembrankompartimenten, den Caveolae (29,

30). Charakteristisch für Caveolae ist das Vorkommen von Caveolinen, von denen drei Isoformen bekannt sind, sowie die Anreicherung von Cholesterol, Glykosphingolipiden und Sphingomyelin (31). Neben ihrer Funktion bei der Endozytose und beim Cholesterintransport sind die Caveolae v.a. für Signaltransduktionsvorgänge von Bedeutung (32, 33). Hierbei werden mit Hilfe der Caveoline zahlreiche Rezeptoren, z.B. der Bradykininrezeptor B2, sowie Struktur- und Signalproteine an die Caveolae rekrutiert (Übersicht in (31)). Auch die eNOS bindet unter basalen Bedingungen an Caveolin-1 (bzw. an Caveolin-3 in Kardiomyozyten) und wird dadurch inhibiert (34-36). Durch den  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM-Komplex wird Caveolin-1 kompetitiv aus seiner Bindung an die eNOS verdrängt, woraus ein reziproker Regulationsmechanismus mit  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM als Aktivator und Caveolin-1 als Inhibitor der eNOS resultiert (37). Darüber hinaus bewirkt die Bindung des Chaperons Hsp90 eine allosterische Aktivierung der eNOS und verbessert die Assoziation zwischen eNOS und der Proteinkinase B (38, 39). Hingegen könnte die Interaktion mit der großen GTPase Dynamin-2 (40) sowie mit dem kürzlich entdeckten NOSIP (41) eine Rolle bei der Lokalisation bzw. einer dynamischen Translokation der eNOS zwischen verschiedenen Kompartimenten spielen.

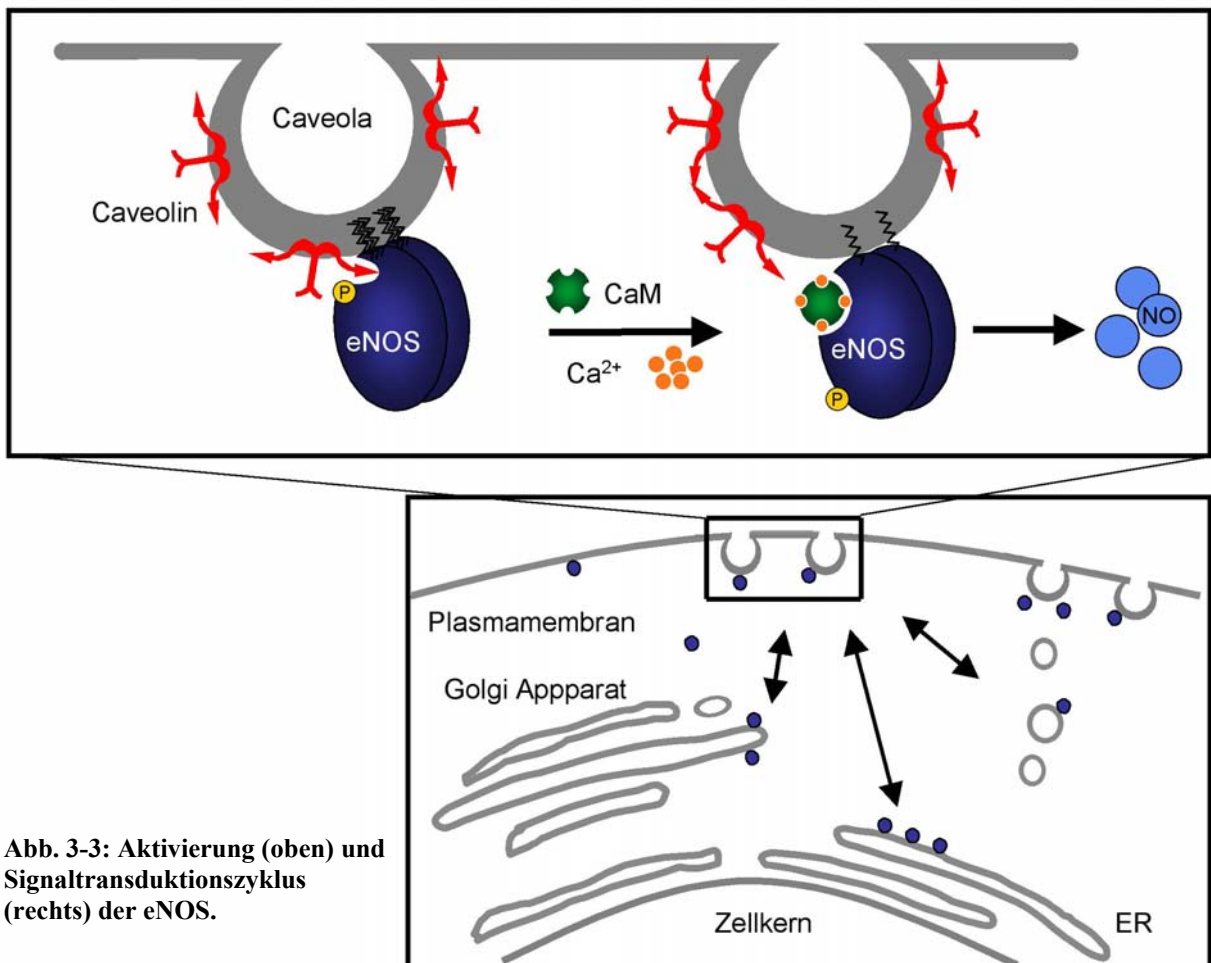
#### 3.2.4 Der Signaltransduktionszyklus der eNOS

Die vielfältigen Wechselwirkungen der endothelialen NO-Synthase wurden von Thomas Michel 1997 in einem Modell zusammengefasst, das einen Aktivierungs-Deaktivierungs-Zyklus der eNOS beschreibt (Abb. 3-3) (6, 37, 42).

Demnach befindet sich die inaktive eNOS, die 3-fach acyliert sowie an Thr495 phosphoryliert ist, durch die Bindung von Caveolin-1 an den Caveolae der Plasmamembran. Nach Stimulation und intrazellulärer Erhöhung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration kommt es zu einer kompetitiven Verdrängung von Caveolin-1 durch den  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM-Komplex und damit zur Aktivierung der eNOS. Hierbei erfolgt in Abhängigkeit vom Stimulus eine Depalmitoylierung der eNOS sowie eine Dephosphorylierung des Thr495 und/oder eine Phosphorylierung des Ser1177 (26, 28). Danach transloziert die eNOS in intrazelluläre Kompartimente, wie z.B. an den Golgi-Apparat oder das Endoplasmatische Retikulum. Schließlich, nach Repalmitoylierung und (De)Phosphorylierung, vollendet die eNOS den Zyklus und kehrt an die Plasmamembran zurück (Abb. 3-3).

Völlig unklar bleibt, ob es sich hierbei lediglich um einen „Recycling-Prozess“ handelt oder ob weitere Signalwege beschränkt werden. Neben der Lokalisation an der Plasmamembran und am Golgi-Apparat wurde die eNOS sowohl in Zellkultur als auch *in vivo* in unterschiedlichsten Kompartimenten nachgewiesen, u.a. in der perinukleären Region, an cytoskelettalen und an nicht näher definierten vesikelartigen Strukturen (13, 43, 44). Bisher ist jedoch weitgehend unbekannt, welche Faktoren den Aufenthaltsort der eNOS bestimmen.

In diesem Zusammenhang derzeit diskutiert, ob und wie ein Austausch zwischen den „eNOS-Pools“ in unterschiedlichen Kompartimenten stattfinden kann (45, 46).



**Abb. 3-3: Aktivierung (oben) und Signaltransduktionszyklus (rechts) der eNOS.**

Hingegen konnte die Bedeutung der Caveolin-eNOS-Interaktion als Inhibitionsmechanismus unter nicht stimulierten Bedingungen durch aktuelle Studien bestätigt werden (47). Bei Caveolin-1-Knockout-Mäusen wurde z.B. eine deutlich erhöhte basale NO-Freisetzung festgestellt (48, 49). Zusätzlich gibt es Hinweise, dass die Bindung von Caveolin-1 an die eNOS durch weitere Faktoren reguliert wird (49). Obwohl also die Regulationsmöglichkeiten für die eNOS recht gut erforscht sind, gibt es hinsichtlich ihrer Lokalisation sowie der Translokationsmechanismen in die entsprechenden Kompartimente noch viele offene Fragen.

### 3.3 Zielsetzung

Die endotheliale NO-Synthase wird hinsichtlich ihrer Aktivität und ihrer subzellulären Verteilung streng reguliert, wobei vor allem über die Mechanismen der eNOS-Translokation wenig bekannt ist. Unter Verwendung des „yeast two-hybrid“-Systems wurde daher nach neuen eNOS-bindenden Proteinen gesucht, die an der Regulation der Aktivität und/oder der Lokalisation der eNOS beteiligt sind (41). Hierbei wurde das Fragment eines unbekanntes mit der eNOS interagierenden Proteins gefunden.

Die Ziele der vorliegenden Arbeit waren 1) die Identifizierung dieses neuen humanen Proteins (NOSTRIN) in voller Länge, 2) die Verifizierung der Fähigkeit zur Interaktion mit der eNOS und 3) die Erforschung des Einflusses dieses Proteins auf die Aktivität bzw. auf die subzelluläre Verteilung der eNOS.

Hierzu wurden die folgenden methodischen Ansätze gewählt:

- 5'-RACE zur Vervollständigung des 5'-Terminus der NOSTRIN-cDNA
- Auswertung von Datenbanken zur Analyse der DNA- und Aminosäuresequenz von NOSTRIN hinsichtlich bekannter Proteinmotive sowie homologer Proteine des Menschen und anderer Spezies
- Herstellung von NOSTRIN-Deletionsmutanten zur Untersuchung der Funktion der entsprechenden Domänen
- Copräzipitation von NOSTRIN und eNOS *in vivo* und *in vitro*
- Immunfluoreszenzmikroskopie zur Untersuchung der Kompartimentierung von NOSTRIN bzw. der Deletionsmutanten in Relation zur eNOS-Lokalisation
- Messung der NO-Freisetzung eNOS-exprimierender Zellen in Abhängigkeit von der NOSTRIN-Expression mit Hilfe eines NO-Analysators

Als Zellmodell zur Untersuchung der Eigenschaften von NOSTRIN und seiner Beziehung zur eNOS diente eine eNOS stabil exprimierende CHO-Zelllinie (CHO-eNOS), in der NOSTRIN mit Hilfe des Semliki-Forest-Virussystems (SFV) transient überexprimiert wurde. Zur Charakterisierung des nativen NOSTRINs wurden primäre Endothelzellen des Menschen (HUVEC und HMVEC) verwendet.

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Spezielle Geräte

#### 4.1.1 Fluoreszenz-Imagingsysteme

Confocal scanning system „Radiance“ BioRad, München

inkl. CCD-Kamera (BioRad) und Software „LaserSharp“

Fluoreszenzmikroskop „Axioskop“ (Zeiss, Jena)

Excitation: Ar Kr/Ar-Laser (488 nm), G He/Ne-Laser (543 nm)

Emission: 500 DCLP, 560 DCLP

Objektiv „Plan-Neofluar“ 63x/1,25 oil (Zeiss, Jena)

Imaging System

Improvision, London, UK

inkl. „Openlab“-Software

CCD-Kamera C4742-95 (Hamamatsu, Japan)

Fluoreszenzmikroskop Axiovert 2000 (Zeiss, Jena)

Excitation: Monochromator Polychrome N

Emission: HQ 525/50, HQ 610/75 (Zeiss, Jena)

Objektiv Plan-Neofluar 63x/1,25 oil (Zeiss, Jena)

#### 4.1.2 Andere Geräte

Elektroporationsapparatur Gene pulser

BioRad, München

Elektrotransferapparatur, Typ Trans Blot SD

BioRad, München

Gelanalysegerät Gel Doc 2000 inkl.

BioRad, München

Software „Quantity one“

NO Analyzer, inkl. Software „Noawin“

Siever, Bolder, USA

Optima™ MAX Ultrazentrifuge

Beckman Coulter,

Fullerton, USA

Thermocycler, TRIO-Thermoblock

Biometra, Göttingen

## 4.2 Materialien

### 4.2.1 Verbrauchsmaterialien

4-Kammer-Objektträger

Falcon, Franklin Lakes,

USA

Elektroporationsküvetten

BioRad, München



Röntgenfilm, Typ New RX	Fuji, Tokyo, Japan
Nitrocellulose-Transfermembran	Sartorius, Göttingen
Zellkulturschalen, 57 cm <sup>2</sup>	Greiner, Frickenhausen
Zellkulturschale mit 6 Kavitäten a 9,6 cm <sup>2</sup>	Greiner, Frickenhausen

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

#### 4.2.2 Chemikalien und spezielle Reagenzien

A23187	Alexis, Gruenberg
CAP (m7G(5')ppp(5')G)	Pharmacia, Freiburg
Chaps	Sigma, Taufkirchen
Digitonin	Sigma, Taufkirchen
Glutathionsepharose 4B	Pharmacia, Freiburg
N <sup>G</sup> -Nitro-L-Arginin (L-NNA)	Alexis, Gruenberg
Octyl-β-D-glycopyranosid (OG)	Fluka, Buchs, Schweiz
Pansorbin	Calbiochem, Nottingham, U.K.
Pefabloc SC	Roth, Karlsruhe
Roti-Fect <sup>®</sup> (Transfektionsreagenz)	Roth, Karlsruhe
RNasin	Boehringer Mannheim, Mannheim
[ <sup>35</sup> S]-L-Methionine (> 1000 Ci/mmol)	ICN Biomedicals, Eschwege

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

#### 4.2.3 Antikörper

α-Caveolin-1 (polyklonal), Kaninchen IgG (Verdünnung für IB 1:1000; IF: 1:100)	BD Transduction, Heidelberg
α-eNOS (monoklonal), Maus IgG (Verdünnung für IB 1:1000; IF: 1:100)	BD Transduction, Heidelberg
α-eNOS (polyklonal), Kaninchenserum gegen eNOS-Peptid (AS 599 – 614) gerichtet	A. Maidhof, B. Welsch, Mainz

$\alpha$ -GST (Verdünnung für IB 1:2500)	Pharmacia, Freiburg
Anti-Kaninchen- bzw. Anti-Maus-IgG, cy2- bzw. cy3-konjugiert (Verdünnung für IF 1:500) cy2: $\lambda_{\text{ex,max}} = 490 \text{ nm}$ , $\lambda_{\text{em,max}} = 508 \text{ nm}$ cy3: $\lambda_{\text{ex,max}} = 553 \text{ nm}$ , $\lambda_{\text{em,max}} = 575 \text{ nm}$	Jackson ImmunoRes., West Grove, USA
$\alpha$ -Kaninchen- bzw. Anti-Maus-IgG, POD-konjugiert (Verdünnung für IB 1:1000)	BioRad, München
$\alpha$ -NOSTRIN(a) (polyklonal), Mausserum gegen GST-NOSTRIN(AS242-506)-Fusionsprotein gerichtet (Verdünnung für IB 1:5000; IF: 1:250)	A. Maidhof, B. Welsch, Mainz
$\alpha$ -NOSTRIN(b) (polyklonal), Kaninchenserum gegen NOSTRIN-Peptid (AS 178 – 195) gerichtet (Verdünnung für IB 1:1000; IF 1:100)	A. Maidhof, B. Welsch, Mainz
$\alpha$ -NOSTRIN(c) (polyklonal), Kaninchenserum gegen GST-NOSTRIN(AS242-506)-Fusionsprotein gerichtet (Verdünnung für IB 1:2500; IF: 1:100)	A. Maidhof, B. Welsch, Mainz
$\alpha$ - $\alpha$ -Tubulin (Verdünnung für IB: 1:1000)	Sigma, Taufkirchen
$\alpha$ -Ziege IgG (Verdünnung für IB: 1:2500)	Sigma, Taufkirchen
<b>4.2.4 Enzyme und Kits</b>	
DNA-Polymerasen Taq, Pfu	Stratagene, Heidelberg
Nucleo Spin <sup>®</sup> nucleic acid purification kit	Clontech, Palo Alto, USA
Nucleo Trap <sup>®</sup> mRNA purification kit	Clontech, Palo Alto, USA
PowerScript <sup>™</sup>	Clontech, Palo Alto, USA
Retikulozytenlysate (Kaninchen)	Promega, Madison, USA
Restriktionsendonukleasen	MBI Fermentas, Vilnius,

RNA-Polymerasen T7, SP6

SMART™ RACE cDNA amplification kit

SuperScript II

Litauen oder

Biolabs, Beverly, USA

Pharmacia, Freiburg

Clontech, Palo Alto, USA

Gibco BRL, Karlsruhe

#### 4.2.5 Vektoren

pcDNA3.1/A myc/his

Invitrogen,

Groningen, Niederlande

pGEX2T

Pharmacia, Freiburg

pME18SFL3

T. Isogai, Yana, Japan

pSFV2 und pSFVhelper

K. Lundstrom, Basel,

Schweiz

#### 4.2.6 Oligonukleotide

Alle aufgeführten Primer wurden von der Firma MWG-Biotech, München synthetisiert.

13.2i- 5'-AGCTGCTCGAGTCAAGGGGCTGGAGTTGAAGAACCTGG-3'

13.2n- 5'-CCTTCCTCGAGTTACTCGTGTATAATCACAATGTCACCC-3'

bp+ 5'-ATTTTCGACATGAGGGACCCACTGACAGATTGTCCG-3'

NOSBPr- 5'-GTTGAATTCTTTCCTTCTCCAGCTCCAGAATGC-3'

Für die 5'-RACE wurden die folgenden von der Firma Clontech, Palo Alto, USA hergestellten Primer verwendet:

UPM: 5'-CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3'

SMART II A: 5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCGGG-3'

5'-RACE CDS: 5'-(T)<sub>25</sub>N<sub>-1</sub>N-3' (N = A, C, G, or T; N -1 = A, G, or C)

#### 4.2.7 Bakterienstämme

*E. coli* XL1-blue

Stratagene, Heidelberg

*E. coli* BL-21

Pharmacia, Freiburg

#### 4.2.8 Zelllinien

CHO-eNOS

J. Dedio, Aventis,

Frankfurt

BHK

ATCC, Rockville, USA

### 4.3 Datenbankanalysen

Sequenzvergleiche auf DNA- und Proteinebene wurde mit Hilfe der Software ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) durchgeführt und ausgewertet. Zur Suche nach bekannten Proteinmotiven bzw. funktionalen Domänen wurden mit dem Programm SMART (50) die Datenbanken Prosite and Pfam (<http://kr.expasy.org/tools/>) durchsucht. Für Vergleiche mit bekannten DNA-Sequenzen aus dem humanen Genomprojekt (HUGO), mit ESTs (expressed sequence tags) und mit bekannten Proteinen wurden unter Verwendung des Programmes BLAST (51) (<http://dove.embl-heidelberg.de/Blast2/>, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) die verschiedenen Datenbanken des EMBL (European Molecular Biology Laboratory, Heidelberg) und des NIH (National Institute of Health, USA) durchsucht.

### 4.4 Molekularbiologische Methoden

#### 4.4.1 Elektrophoresetechnik zur Analyse von Nukleinsäuren

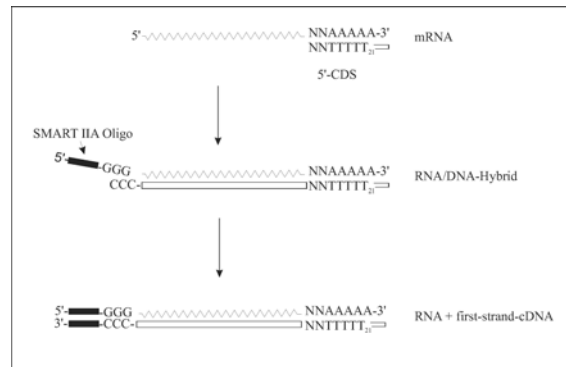
DNA- und RNA-Fragmente wurden elektrophoretisch in 1 %-igen (w/v) Agarosegelen inkl. Ethidiumbromid (10 µg/ml) mit TAE-Laufpuffer (40 mM Tris/Acetat, 0,1 mM EDTA, pH 7,6) aufgetrennt und mit Hilfe des Analysegerätes Gel Doc 2000 und der Software „Quantity one“ ausgewertet.

#### 4.4.2 Herstellung von cDNA und 5'-RACE

Die Aufreinigung von Gesamt-RNA aus kultivierten Zellen oder Organgewebe erfolgte mit Hilfe eines RNA-Isolierungs-Kits nach Angaben des Herstellers durch Aufschluss der Zellen mittels alkalischer Lyse und anschließender Isolierung der RNA über eine positiv geladene Matrix. Anschließend wurde unter Verwendung eines PolyA<sup>+</sup>RNA-Isolierungs-Kits nach Angaben des Herstellers die mRNA über die Bindung an eine Oligo(dT)-gekoppelte Matrix isoliert.

Mit Hilfe der 5'-RACE-Technik (5'-rapid amplification of cDNA ends) wurde aus mRNA die entsprechende cDNA in voller Länge hergestellt. Hierbei wird ausgenutzt, dass eine Variante der MMLV-reversen Transkriptase (SuperScript<sup>TM</sup> RT) an das 5'-Ende des ersten synthetisierten cDNA-Stranges zusätzlich mehrere C-Reste anhängt (Abb. 4-1). Diese hybridisieren mit den SMART IIA<sup>TM</sup>-Oligonukleotiden, welche für die fortlaufende Amplifikation als erweiterte Matrize dienen. Somit wird spezifisch an 5'-Enden eine „SMART<sup>TM</sup>“-Sequenz angefügt, die im Verlauf der anschließenden PCRs mit dem 5'-Primermix UPM hybridisiert.

**Abb. 4-1: Schema der Synthese des ersten cDNA-Stranges mit Hilfe der 5'-RACE-Technik und unter Verwendung einer MMLV-reversen Transkriptase (MMLV-RT)**



Die Synthese des ersten cDNA-Stranges („first-strand cDNA synthesis“) ausgehend von Plazenta-RNA wurde wie folgt durchgeführt. Ein Ansatz mit:

- 1 µl Placenta-RNA (1 µg/µl)
- 1 µl 5'-CDS-Primer (10 µM)
- 1 µl SMART IIA<sup>TM</sup>-Oligonukleotide (10 µM)
- 2 µl H<sub>2</sub>O

wurde gemischt und 2 min bei 70 °C inkubiert. Nach dem Abkühlen wurden die folgenden Komponenten zugefügt:

- 2 µl 5x First-strand-Puffer
- 1 µl DTT (20 mM)
- 1 µl dNTP-Mix (je 10 mM)
- 1 µl MMLV-reverse Transcriptase (200 U)

Anschließend wurde der Ansatz 1,5 h bei 42 °C inkubiert und dann durch Zugabe von 100 µl Tricine-EDTA-Puffer (10 mM Tricine-KOH, pH 8,5, 1 mM EDTA) verdünnt. Nach 7-minütigem Erhitzen auf 72 °C wurde die cDNA bis zur weiteren Verwendung bei –20 °C gelagert.

#### 4.4.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe der PCR können in einem zyklischen Prozess, katalysiert von einer hitzestabilen DNA-Polymerase (Pfu oder Taq), DNA-Fragmente selektiv amplifiziert werden. Um die Empfindlichkeit und die Spezifität der PCR weiter zu erhöhen, wurde zur Klonierung des 5'-Endes von NOSTRIN eine verschachtelte („nested“ PCR) unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

## 1. Ansatz („touch down“-PCR):

2,5 µl	„first-strand“-cDNA (Plazenta)	
5 µl	UPM	PCR-Bedingungen: „hot start“
1 µl	25 µM 13.2n-	6 x (94 °C 45’’; 72 °C 3’)
5 µl	5x Pfu-Puffer	6 x (94 °C, 45’’; 70 °C, 45’’; 72 °C, 3’)
5 µl	100 mM dNTP	26 x (94 °C, 45’’; 68 °C, 45’’; 72 °C, 3’)
1 µl	Pfu (2,5 U)	
30,5	µl H <sub>2</sub> O	

## 2. Ansatz:

2,5 µl	Produkt der 1. PCR	
5 µl	UPM	PCR-Bedingungen: „hot start“
1 µl	25 µM bp+	39 x (94 °C, 45’’; 65 °C, 45’’; 72 °C, 3’)
5 µl	5x Pfu-Puffer	
5 µl	100 mM dNTP	
1 µl	Pfu (2,5 U)	
30,5µl	H <sub>2</sub> O	

Alle weiteren PCRs wurden wie folgt durchgeführt:

1 µl	100 ng/µl Matrize	
1 µl	25 µM vorwärts-Primer	
1 µl	25 µM rückwärts-Primer	PCR-Bedingungen: „hot start“
10 µl	Taq-Puffer	39 x (94 °C, 45’’; 65 °C, 45’’; 72 °C, 3’)
5 µl	100 mM dNTP	
10 µl	DMSO	
1 µl	Taq (5 U)	
71 µl	H <sub>2</sub> O	

Die erhaltenen PCR-Produkte wurden mittels Gelelektrophorese analysiert und zur Kontrolle sequenziert (Fa. MWG-Biotech, München).

#### 4.4.4 Klonierung von cDNA-Fragmenten

Zur Klonierung wurden die durch Restriktionsverdau bzw. PCR erhaltenen cDNA-Fragmente mit Hilfe einer T4-Ligase über Nacht bei 14 – 16 °C in den entsprechend geschnittenen Vektor ligiert. Anschließend wurden die Plasmide in kompetente *E.coli* XL1 transformiert

und amplifiziert. Positive Klone wurden nach der Plasmidisolierung mittels Restriktionsanalyse identifiziert. Die Plasmidisolierung erfolgte mit Hilfe von DNA-Isolationskits (Fa. Qiagen, Hilden) nach den Angaben des Herstellers.

## 4.5 Zellbiologische Methoden

### 4.5.1 Zellkultur

Alle Zellen wurden bei 37 °C in Wasserdampf-gesättigter 5 %-iger (v/v) CO<sub>2</sub>-Atmosphäre kultiviert. Als Medium diente für die BHK-Zellen RPMI mit 10 % (v/v) FCS und für die CHO-eNOS-Zellen DMEM mit 10 % (v/v) FCS und 200 µM Methothrexat. Die Herstellung und Charakterisierung der CHO-eNOS-Zellen war durch Jürgen Dedio erfolgt (41). Humane mikrovaskuläre Endothelzellen der Lunge (HMVEC(Lunge)) wurden von CellSystems, St. Katharinen bezogen und in EGM®-MV-Medium entsprechend den Angaben des Herstellers kultiviert und subkultiviert. Die HMVEC-Zellen wurden von der 5./6. bis 10. Passage verwendet. Humane Endothelzellen der Nabelschnurvene (HUVEC) waren ein Geschenk der Arbeitsgruppe von R. Busse, Uniklinik Frankfurt. Die HUVECs wurden in EGM®-Medium (CellSystems, St. Katharinen) kultiviert und bis zur 4. Passage verwendet. Zur Subkultivierung wurden konfluent gewachsene Zellen 2 x mit PBS gewaschen, durch 2-minütige Behandlung mit 0,025 % (w/v) Trypsin, 0,05 % (w/v) EDTA abgelöst und nach Verdünnung mit Kulturmedium im Verhältnis 1:2 bis 1:4 (bis 1:10 im Fall der CHO-eNOS-Zellen) neu ausgesät. Für die Kultur der Endothelzellen wurden die Zellkulturgefäße durch 10-minütige Inkubation mit einer Lösung von 5 µg/ml Fibronectin vorbeschichtet.

### 4.5.2 Transfektion von eukaryotischen Zellen

Die transiente Expression von cDNA in CHO-eNOS-Zellen erfolgte durch Transfektion unter Verwendung von Roti-Fect®. Bei diesem Transfektionsreagenz handelt es sich um eine Liposomenformulierung eines polykationischen Lipids in Kombination mit einem neutralen Colipid (Fa. Roth, Karlsruhe). Es bewirkt die Bildung kompakter Lipid/DNA-Komplexe und ermöglicht somit eine effiziente Aufnahme in Säugerzellen. Die CHO-eNOS-Zellen wurden in Zellkulturschalen mit 6 Kavitäten à 9,6 cm<sup>2</sup> bis zu einer Konfluenz von 40 – 60 % kultiviert. Zur Komplexbildung wurden Lösungen von 2 µg zu transfizierender DNA in 60 µl DMEM (serum- und antibiotikafrei) sowie 10 µl Roti-Fect® in 50 µl des gleichen Mediums gemischt und über 40 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und 800 µl serumhaltiges DMEM (antibiotikafrei) zugefügt. Nach Zugabe der DNA/Lipid-Komplexe und 6-stündiger Inkubation wurden 1,2 ml vollständiges Medium

zugesetzt. Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt, und nach weiteren 24 h erfolgte die entsprechende Verwertung der Zellen.

#### 4.5.3 Infektion eukaryotischer Zellen mit Semliki Forest Virus (SFV)

Als weitere Methode zur transienten Expression wurde die Infektion mit Semliki Forest Viren (SFV) durchgeführt (52). Hierbei handelt es sich um einen nicht-humanpathogenen und reproduktionsdefizienten Retrovirus. Die genetische Information des Virus ist auf zwei Plasmide aufgeteilt, wobei pSFV2 die Information für das Verpackungssignal, Nichtstrukturgene und den subgenomischen Promotor des SFV trägt. Das Helferplasmid pSFVHE2 kodiert für die viralen Strukturproteine, u.a. für p62. Dabei verhindern drei Punktmutationen im p62-Gen die natürliche intrazelluläre Spaltung des p62-Strukturproteins in ein reifes E2-Protein, das die Aufnahme von SFV-Partikeln in eukaryotische Zellen vermittelt. Die produzierten Viren sind somit zunächst nicht infektiös, können aber durch Behandlung mit Chymotrysin aktiviert werden.

Im ersten Schritt wurde die zu exprimierende DNA in die MCS (multiple cloning site) des Plasmids pSFV2 kloniert. Anschließend erfolgte *in vitro* die Transkription der Virus-mRNA. Hierzu wurde das folgende Reaktionsgemisch 1 h bei 37 °C inkubiert:

5 µl	linearisiertes Plasmid (0,5 µg / µl),
10 µl	10x SP6-Puffer,
5 µl	10 mM CAP,
5 µl	50 mM DTT,
5 µl	rNTP-Mix (10 mM ATP, 10 mM CTP, 10 mM UTP, 5 mM GTP)
15 µl	H <sub>2</sub> O
1,5 µl	RNasin (50 U)
3,5 µl	SP6 RNA-Polymerase (100 U)

Zur Transkription des pSFVHE2-Plasmid wurde nach dem gleichen Schema ein halber Ansatz verwendet. Nach der Überprüfung der mRNA-Qualität bzw. -Menge mittels Gelelektrophorese erfolgte eine Elektroporation der vereinigten mRNA-Ansätze in BHK-Zellen (ca.  $2 \cdot 10^7$  Zellen in 0,4 ml PBS) unter Verwendung von 0,2 cm Gene-Pulser Küvetten und unter folgenden Bedingungen:

Kapazität:	25 µF
Widerstand:	∞
Stromspannung:	1500 V
Zeitkonstante:	0,7 (2 Pulse)



Zur Produktion und Verpackung der SFV wurden BHK-Zellen 24 h kultiviert, wobei die Viruspartikel in das Zellkulturmedium abgegeben wurden. Dieses wurde anschließend abgenommen und die Viren durch 20-minütige Inkubation mit 250 µl Chymotrypsin (20 mg/ml) pro 10 ml Virussuspension bei RT aktiviert. Nach Zugabe von 250 µl Aprotinin (10 mg/ml) pro 10 ml Virussuspension, welches das Chymotrypsin inhibiert, wurden die Viren aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

## 4.6 Proteinchemische Methoden

### 4.6.1 Probenaufbereitung

Zur Expressionsanalyse wurden die tiefgefrorenen Organe von männlichen C57bl6-Mäusen mechanisch zerkleinert und homogenisiert. Die Gewebe wurden in einer Konzentration von 0,2 mg/µl in Probenpuffer (63 mM TrisHCl, pH 6,8, 2,5 % (w/v) SDS, 5 % (v/v) Glycerin, 5 % (v/v)  $\beta$ -Mercaptoethanol, 0,005 % (w/v) Bromphenolblau) aufgenommen. Nach 30-minütiger Erwärmung der Proben auf  $100\text{ }^{\circ}\text{C}$  wurden nicht gelöste Bestandteile 10 min bei 13.000 g abzentrifugiert.

Zum Studium der Löslichkeit von NOSTRIN wurden NOSTRIN-überexprimierende CHO-eNOS-Zellen in Ripa-Puffer (1 % (v/v) NP-40, 0,5 % (w/v) Natrium-desoxycholat, 0,1 % (w/v) SDS, 50 mM TrisHCl, pH 7,4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 100 µM Pefabloc SC), Chaps-Puffer (20 mM Chaps, 50 mM TrisHCl, pH 7,4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 100 µM Pefabloc SC), Digitonin-Puffer (1 % (w/v) Digitonin 50 mM TrisHCl, pH 7,4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 100 µM Pefabloc SC) oder TritonX100-Puffer (1 % (w/v) TritonX100, 50 mM TrisHCl, pH 7,4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 100 µM Pefabloc SC) 1 h bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  lysiert. Die Trennung von löslicher und unlöslicher Fraktion erfolgte durch Ultrazentrifugation innerhalb 1 h bei 100.000 g und  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### 4.6.2 Proteinaufreinigung und –konzentrationsbestimmung

Die Herstellung aufgereinigter GST-Fusionsproteine erfolgte mit Hilfe des „GST Gene Fusion“-Systems (Pharmacia). Die cDNA von NOSTRIN bzw. dessen SH3-Deletionsmutante (= NOSTRIN<sub>AS1-440</sub>) wurde in den Vektor pGEX2T kloniert und sequenziert. Nach Transformation in *E.coli* BL21 wurden die Bakterien bis zu einer OD<sub>600nm</sub> von 0,3 bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  in 1 l LB-Medium (inkl. 100 µg/ml Ampicillin) inkubiert. Die Expression der GST-Fusionsproteine wurde durch Zugabe von 0,5 mM IPTG über eine Dauer von 2 h induziert. Die Bakterien wurden anschließend sedimentiert (3.000 g bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) und mit eiskaltem PBS gewaschen. Zur Lyse wurde das Bakteriensediment mit eiskaltem Lysepuffer (PBS, 1 mM EDTA, 100 µM Pefabloc SC) resuspendiert und 3 x 10 s mit Ultraschall behandelt. Dann

erfolgte nach Zugabe von TritonX100 in einer Endkonzentration von 1 % (v/v) ein Inkubationsschritt von 30 min bei 4 °C unter Rotation. Nach 10-minütiger Zentrifugation mit 18.000 g wurde der Überstand weiterverwertet. Zur Aufreinigung des Fusionsproteins wurde eine Säule mit 2 ml GSH-Sepharose gefüllt, zweimal mit 20 ml eiskaltem PBS gewaschen und mit dem Überstand 2 h bei 4 °C inkubiert. Abschließend folgten drei Waschschriffe mit jeweils 20 ml PBS.

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurden die Fusionsproteine durch Inkubation mit 500 µl Elutionspuffer (50 mM TrisHCl, pH 8, 20 mM Glutathion) pro 200 µl GSH-Sepharose eluiert und die Absorption des Eluates bei 280 nm bestimmt. Die Proteinkonzentration  $c$  berechnet sich dann nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz:

$$A_{280\text{nm}} = d \cdot c \cdot \epsilon,$$

mit  $d$  = Länge des optischen Strahlenganges [cm],  $c$  = Proteinkonzentration [M],  $\epsilon$  = Extinktionskoeffizient [ $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ]. Der Extinktionskoeffizient der Proteine wurde mit Hilfe eines Kalkulationsprogrammes (<http://www.expasy.ch/cgi-bin/protparam>) berechnet.

#### 4.6.3 Translation von [ $^{35}\text{S}$ ]-markierter eNOS *in vitro*

Zur Herstellung von isolierter eNOS wurde im ersten Schritt die eNOS-mRNA *in vitro* transkribiert und anschließend unter Verwendung von Retikulozytenlysat aus Kaninchen das Protein translatiert, wobei es gleichzeitig mit [ $^{35}\text{S}$ ]-L-Methionin markiert wurde. Für die *in vitro*-Translation wurde der folgende Ansatz 1 h bei 4 °C inkubiert:

5 µl pcDNA3.1-eNOS (EcoRV-linearisiert, 0,2 µg/µl)  
10 µl 5x T7-Polymerasepuffer  
10 µl rNTP-Mix (je 10 mM ATP, CTP, UTP, GTP)  
1,5 µl RNasin (50 U)  
2 µl T7-Polymerase (50 U)  
21,5 µl H<sub>2</sub>O

Als Kontrolle diente der Einsatz der gleichen Menge des linearisierten Vektors pcDNA3.1 anstelle von pcDNA3.1-eNOS. Anschließend wurde die mRNA unter Verwendung eines mRNA-Isolierungskits nach Angaben des Herstellers aufgereinigt und elektrophoretisch analysiert. Nach Bestimmung der Konzentration durch die Messung der Absorption bei 260 nm (1 U = 40 µg/ml) wurde die mRNA bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

Die anschließende *in-vitro*-Translation erfolgte durch 1,5-stündige Inkubation des nachfolgend aufgelisteten Ansatzes bei 30 °C:

- 35 µl Retikulozytenlysat aus Kaninchen
- 1 µl Aminosäuremix ohne L-Methionin (1 mM)
- 2 µl [<sup>35</sup>S]-L-Methionin (> 1000 mCi/mmol bei 10 mCi/ml)
- 1,5 µl RNasin (50 U)
- 0,5 µl eNOS-mRNA (2,5 µg/µl)
- 10 µl H<sub>2</sub>O

Als Negativkontrolle wurde anstelle der eNOS-mRNA die gleiche Menge der durch Transkription des Vektors pcDNA3.1 erhaltenen mRNA oder H<sub>2</sub>O eingesetzt. Die Verwendung der gleichen Menge an Luciferase-mRNA diente als Positivkontrolle. Aliquots der Proben wurden anschließend in einem 7,5 (w/v) %-igen Polyacrylamidgel aufgetrennt und nach dem Trocknen des Gels mittels Autoradiographie analysiert.

#### 4.6.4 Immunoblotting

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. Anschließend erfolgte ein Elektrottransfer der Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran nach dem „semi-dry“-Verfahren (53) bei 1,5 mA pro cm<sup>2</sup> Gelfläche über 60 min. Als Transferpuffer diente ein 12,5 mM Tris-Puffer mit 0,96 M Glycin und 10 % (v/v) Methanol. Zur Überprüfung des Proteintransfers bzw. zur Fixierung wurde die Nitrocellulosemembran nach dem Blotting mit 0,2 % (w/v) Ponceau S in 3 % (w/v) Trichloressigsäure gefärbt. Nach der Blockierung freier Bindungsstellen durch 60-minütige Behandlung mit PBS, 0,1 % (v/v) Tween20, 5 % (w/v) Magermilchpulver bei 37 °C erfolgte eine 60-minütige Inkubation der Membran mit dem Erstantikörper in entsprechender Verdünnung im gleichen Puffer bei 37 °C. Anschließend wurde 3 x 10 min mit PBS, 0,1 % (v/v) Tween20 bei 37 °C gewaschen. Die Zweitantikörper wurden 60 min mit einer Verdünnung von 1:1000 für Anti-Maus IgG bzw. mit 1:2500 für Anti-Kaninchen IgG in PBS, 0,1 % (v/v) Tween20, 5 % (w/v) Magermilchpulver bei 37 °C inkubiert. Nach dreimal 10 min Waschen mit PBS, 0,1 % (v/v) Tween20 bei 37 °C erfolgte die Detektion der Meerrettich-Peroxidase gekoppelten Zweitantikörper durch Chemilumineszenzreaktion. Hierzu wurde die Membran 1 min in Substratlösung (100 mM TrisHCl, pH 8,5, 2,5 mM 3-Aminophthalhydrazid (Luminol), 0,4 mM p-Cumarsäure, 5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) inkubiert.

Abschließend wurde ein Röntgenfilm aufgelegt und nach 0,5 bis 20 min Exposition entwickelt.

#### 4.6.5 Copräzipitationsexperimente

##### 4.6.5.1 Coimmunpräzipitation nach Coexpression von NOSTRIN und eNOS

CHO-eNOS-Zellen wurden unter Verwendung von Roti-Fect<sup>®</sup> mit Expressionsvektor pME18SFL3-NOSTRIN transfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen 2 x mit eiskaltem PBS gewaschen, 1 h bei 4 °C in Ripa-Puffer (1 % (v/v) NP-40, 0,5 % (w/v) Natriumdesoxycholat, 0,1 % (w/v) SDS, 50 mM TrisHCl, pH 7,4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 100 µM Pefabloc SC) lysiert und die unlöslichen Bestandteile durch 20-minütige Zentrifugation bei 13.000 g und 4 °C abgetrennt. Anschließend wurden die Proben 1:3 mit Waschpuffer (50 mM TrisHCl, pH 7,4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA) verdünnt und 1 h bei 4 °C unter Rotation mit je 10 µl NOSTRIN(b)-, eNOSp-Antikörper bzw. mit 10 µl der entsprechenden Präimmunsereen inkubiert. Nach Zugabe von je 50 µl Pansorbin wurde erneut 30 min bei 4 °C unter Rotation inkubiert. Die Antikörperkomplexe wurden anschließend 3 x gewaschen, indem das Sediment in Waschpuffer resuspendiert und jeweils 2 min bei 8.000 g zentrifugiert wurde. Die copräzipitierten Proteine wurden durch Immunoblotting mit α-NOSTRIN(a) 1:5000 bzw. α-eNOSm 1:1000 detektiert.

##### 4.6.5.2 GST-Pulldown mit [<sup>35</sup>S]-markierter eNOS

Die *in-vitro*-Interaktion zwischen eNOS und NOSTRIN wurde mit einem GST-Pulldown von [<sup>35</sup>S]-markierter eNOS mit GST-NOSTRIN, GST-NOSTRINΔSH3 bzw. GST als Negativkontrolle untersucht. Hierzu wurde die 450 pmol GST-Fusionsprotein (GST-NOSTRIN, GST-NOSTRINΔSH3 und GST) bindende Menge an GSH-Sepharose mit nicht beladener GSH-Sepharose auf jeweils 200 µl aufgefüllt. Diese wurde anschließend in Tris-Puffer (50 mM TrisHCl, pH 7,4, 1 mM EDTA, 100 µM Pefabloc SC) mit je einem 50 µl-Ansatz [<sup>35</sup>S]-markierter eNOS (siehe 4.6.3) über Nacht bei 4 °C unter Rotation inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit dem gleichen Tris-Puffer erfolgte die Elution der Copräzipitate durch Zugabe von 50 µl Probenpuffer und 5-minütiges Erhitzen auf 100 °C. Anschließend wurden die Proben mittels SDS-PAGE getrennt; das Gel wurde getrocknet und autoradiographisch analysiert.

##### 4.6.6 GST-Pulldown mit CHO-eNOS-Zelllysat

CHO-eNOS-Zellen wurden in 10er Zellkulturschalen (57 cm<sup>2</sup>) bis zur Konfluenz kultiviert und ggf. 10 min durch Zugabe von 1 µM A23187 stimuliert. 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  $\mu$ M EGTA, 100  $\mu$ M Pefabloc SC) pro Zellkulturschale lysiert. Anschließend wurden die Proben 1 h bei 4 °C unter Rotation inkubiert und die unlöslichen Bestandteile durch 20-minütige Zentrifugation bei 13.000 g abgetrennt. Das Zelllysat wurde mit 450 pmol (450 nM) an GSH-Sepharose gebundenem Fusionsprotein über Nacht bei 4 °C und unter Rotation inkubiert. Um jeweils gleiche Volumina zu verwenden, wurde stets die 450 pmol Fusionsprotein bindende Menge an GSH-Sepharose mit nicht beladener Sepharose auf 200  $\mu$ l aufgefüllt. Nach dreimaligem Waschen mit OG-Puffer erfolgte die Elution der präzipitierten und copräzipitierten Proteine mit 50  $\mu$ l Probenpuffer (siehe 6.2.1) und anschließend der Proteinnachweis mittels Immunoblot.

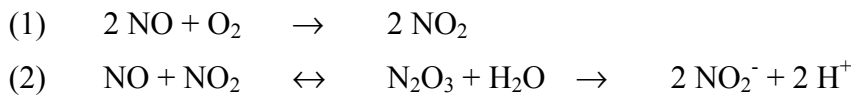
#### 4.7 Immunfluoreszenzmikroskopie

Die Zellen wurden mindestens 16 h auf 4-Kammer-Objektträgern kultiviert und im Fall der CHO-eNOS-Zellen 8 h mit 150  $\mu$ l des entsprechenden SFV pro Kavität infiziert. Eine Inkubation mit 1  $\mu$ M Cytochalasin D erfolgte ggf. während der letzten 2 h. Anschließend wurden die Zellen durch Zugabe von eiskaltem Methanol und 10-minütige Inkubation bei 4 °C fixiert. Nach dreimaligem Waschen mit eiskaltem PBS wurde zur Blockierung freier Bindestellen 15 min mit PBS / 0,1 (v/v) % Tween / 5 (w/v) % BSA inkubiert. Für Doppelfärbungen folgte eine 30-minütige Inkubation bei 37 °C 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 (soweit nicht anders angegeben). Nach dreimal 5 min Waschen mit PBS / 0,1 (v/v) % Tween wurden die Zellen 30 min bei 37 °C mit den gegen die entsprechenden Spezies gerichteten cy2- und cy3-markierten Zweitantikörpern (1:500 in PBS / 0,1 (v/v) % Tween / 5 (w/v) % BSA) inkubiert. Ab diesem Schritt wurden die Präparate möglichst dunkel gehalten. Dann wurden die Zellen wiederum dreimal 5 min mit PBS, 0,1 (v/v) % Tween gewaschen und in einer 50 (v/v) %-igen Glycerinlösung eingebettet.

Anschließend wurden die Präparate mit einem Fluoreszenzmikroskop bzw. einem konfokalen Lasermikroskop (Confocal scanning system Radiance, Fa. BioRad) analysiert; die Dokumentation und Auswertung der Fluoreszenzaufnahmen erfolgte mit Hilfe einer CCD-Kamera und der zugehörigen Software. Im Gegensatz zur konfokalen Laserscanning-Methode, bei der nur das Licht aus einer Ebene gesammelt wird, ist bei „normalen“ Fluoreszenzaufnahmen die Bildqualität durch die Fluoreszenz außerhalb der fokussierten Ebene vermindert. Um in diesen Fällen die Hintergrundstrahlung zu entfernen, wurde zunächst mit Hilfe eines Mikrofokusbilders in 1  $\mu$ m Schritten durch die Z-Ebene (senkrecht zum Mikroskoptisch) eine Bildserie aufgenommen. Anschließend wurde mit einem mathematischen Verfahren, der sogenannten Dekonvolution, die Hintergrundfluoreszenz berechnet und von der betrachteten fokussierten Ebene subtrahiert.

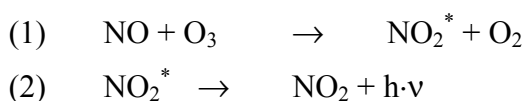
#### 4.8 Bestimmung der eNOS-Aktivität

Die Quantifizierung der eNOS-Aktivität erfolgte mit Hilfe eines NO-Analysators (NOA), wobei im überstehenden Medium der eNOS-exprimierenden Zellen die NO- und Nitritkonzentration bestimmt wurde (Abb. 4-2A). Diese Methode nutzt den Umstand, dass das gebildete NO aus den Zellen in den Überstand diffundiert und dort in einer zweistufigen Reaktion mit Sauerstoff in Nitrit umgewandelt wird:

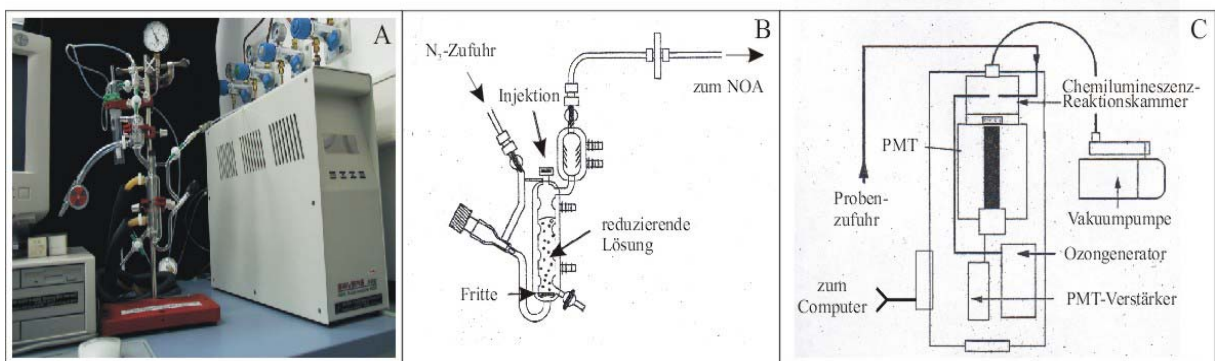


Hierbei gilt für die geschwindigkeitsbestimmende Reaktion (1) eine Reaktionskonstante von  $k = 2 \cdot 10^6 \text{ M}^{-2} \text{ s}^{-1}$  (54).

Zur Bestimmung der NO- und Nitritkonzentration wird die zu analysierende Probe in eine dem NOA vorgeschaltete Reduktionsapparatur injiziert (Abb. 4-2B). Hier erfolgt in essigsaurer Natriumiodid-Lösung die Reduktion von Nitrit zu NO. Das Stickstoffmonoxid wird anschließend mit einem hochreinen Stickstoffstrom in eine Reaktionskammer transportiert, wo es durch Reaktion mit Ozon zur Chemilumineszenz angeregt wird.



Das in Reaktion (2) freiwerdende Licht ist ein Maß für die NO-Konzentration und wird mit Hilfe eines Photomultipliers detektiert und anschließend computergestützt quantifiziert (Abb. 4-2C). Die Kalibrierung der elektronischen Signale erfolgt unter Verwendung von Natriumnitrit-Eichlösungen in einem Konzentrationsbereich von 200 nM bis 20 mM.



**Abb. 4-2: Aufbau des NO-Analysators (NOA).**

A. Gesamtansicht der Apparatur mit Reduktionsanlage (Mitte), NO-Analysator (rechts) und Computer (linker Rand) B. Die Probe wird in die Reaktionsapparatur injiziert, in der die Reduktion von Nitrit zu NO erfolgt. Anschließend wird das NO mit Hilfe eines Stickstoffstroms in den NOA getragen. C. In der Reaktionskammer des NOA erfolgt eine Chemilumineszenzreaktion von NO mit Ozon. Das Lichtsignal wird mit Hilfe eines Photomultipliers (PMT) detektiert und nachfolgend computergestützt quantifiziert.

Die Vorteile der Methode liegen in der hohen Sensitivität der Messung von 1 picomol bzw. 1 ppm. Nachteilig wirkt sich jedoch aus, dass u.a. durch Oxidation von Nitrit zu Nitrat oder durch Diffusion von NO in die Gasphase nur ein Bruchteil des durch die eNOS synthetisierten Stickstoffmonoxids für die Messung zugänglich ist.

Um den Einfluss von NOSTRIN auf die eNOS-Aktivität zu untersuchen, wurden CHO-eNOS-Zellen auf Zellkulturplatten mit 6 Kavitäten mindestens 16 h bis zu einer Konfluenz von ca. 80 % kultiviert. Für die Infektion wurde pro Kavität 200 µl SFV-NOSTRIN in einem Gesamtvolumen von 1 ml Medium zugegeben und 6 h inkubiert. Als Kontrolle dienten CHO-eNOS-Zellen, welche nicht oder mit der gleichen Menge SFV-GFP infiziert wurden. Dann wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und 1 ml Assay-Puffer (10 mM Hepes, pH 7,4, 145 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM Glukose, 100 µM L-Arginin) pro Kavität zugegeben. Nach 30-minütiger Vorinkubation in An- oder Abwesenheit von 100 µM L-NNA wurden die Zellen ggf. 90 min durch Applikation von 1 µM A23187 stimuliert. Danach wurde der Zellüberstand abgenommen und mit Hilfe des NO-Analysators die Konzentration von Nitrit und gelöstem NO bestimmt. Hierzu wurden für jede Probe 3 x 100 µl analysiert und der Mittelwert gebildet. Die Bestimmung des Nullwertes, der von den Messwerten subtrahiert wurde, erfolgte durch Messung der NO/Nitrit-Konzentration im unbehandelten Assay-Puffer. Zum Vergleich der eNOS- und NOSTRIN-Menge wurden die Zellen in 50 µl Probenpuffer pro Kavität aufgenommen und ein Immunoblot mit  $\alpha$ -NOSTRIN(a) und  $\alpha$ -eNOSm durchgeführt.

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Identifizierung von NOSTRIN

#### 5.1.1 Vorarbeiten zur Identifizierung von NOSTRIN

Auf der Suche nach neuen eNOS-interagierenden Proteinen, die bei der Regulation der subzellulären Lokalisation bzw. der Aktivität der eNOS eine Rolle spielen, wurde in Vorarbeiten von Jürgen Dedio das Y2H-System (55) zur Durchmusterung einer cDNA-Bibliothek aus humaner Plazenta eingesetzt. Hierbei diente die Oxygenasedomäne der humanen eNOS (Aminosäuren 1 - 498) als Köder (41). Hierbei wurde ein 904 bp großer cDNA-Klon identifiziert, dessen 3'-Ende durch mehrere Stopp-Kodons definiert war, dessen 5'-Ende jedoch unvollständig war (Abb. 5-1). Daher wurden mittels PCR cDNA-Bibliotheken aus verschiedenen humanen Geweben untersucht, wobei ein 5'-terminal um 397 bp verlängerter cDNA-Klon in einem cDNA-Gemisch aus humanem Dünndarm-Gewebe gefunden wurde (Jürgen Dedio, 1999) (Abb. 5-1).

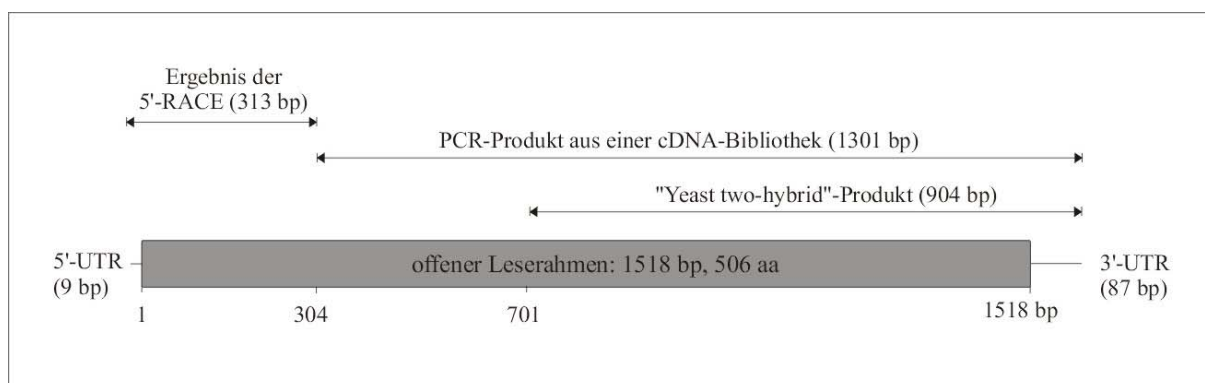


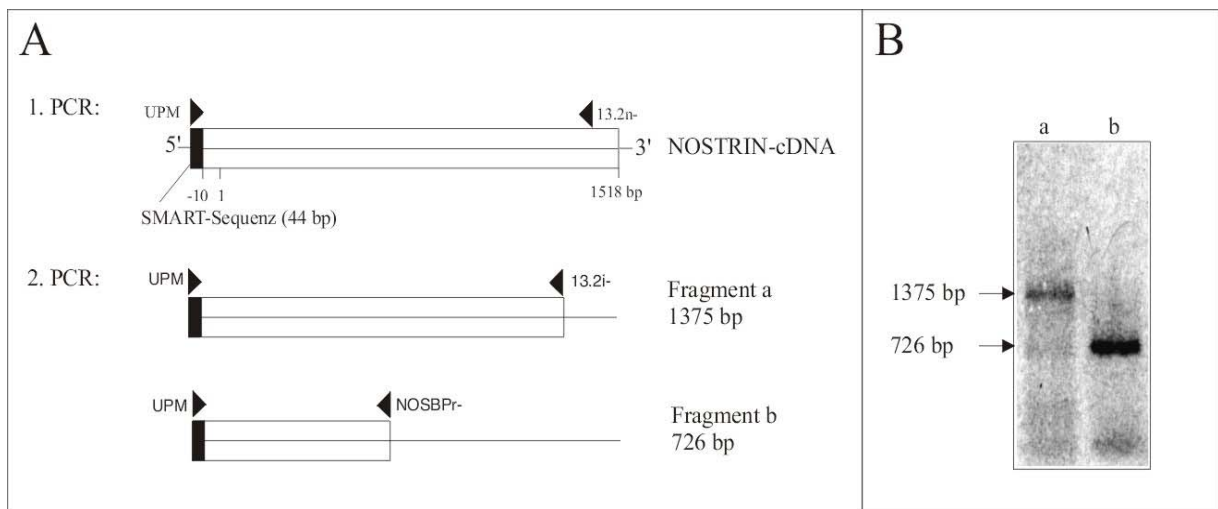
Abb. 5-1: Schema der Klonierung der NOSTRIN-cDNA in voller Länge

#### 5.1.2 Klonierung der NOSTRIN-cDNA in voller Länge

Der in Kapitel 5.1.1 beschriebene 1301 bp große cDNA-Klon diente als Ausgangspunkt für die vorliegende Arbeit. Zur Vervollständigung des 5'-Terminus dieses potentiellen eNOS-Interaktionspartners, wurde eine 5'-RACE durchgeführt (Abb. 5-1). Hierzu wurde Gesamt-RNA aus menschlicher Plazenta mit Hilfe einer reversen Transkriptase (siehe Material und Methoden) in cDNA umgeschrieben, wobei an die 5'-Enden zusätzlich eine „SMART<sup>TM</sup>“-Sequenz angefügt wurde (Abb. 5-2A). Zur Amplifizierung des 5'-Endes des cDNA-Klons wurde mit dieser modifizierten Plazenta-cDNA eine sogenannte „nested PCR“ (= „verschachtelte PCR“) durchgeführt (Abb. 5-2A). Im ersten Schritt erfolgte eine PCR unter Verwendung eines Primermixes (UPM), der mit der „SMART-Sequenz“ hybridisiert, sowie von einem spezifischen Primer (13.2n-), der komplementär zur bekannten cDNA-Sequenz des



eNOS-interagierenden Proteins ist. Das erhaltene PCR-Produkt wurde als Matrize in einer zweiten PCR eingesetzt, wobei 5'-terminal von 13.2n- gelegene spezifische Primer (13.2i- bzw. NOSBPr-) sowie UPM verwendet wurden (Abb. 5-2B). Während nach der ersten PCR keine distinkten cDNA-Banden sichtbar waren, resultierte aus der zweiten für jede Primerkombination eine prominente cDNA-Bande nach Auftrag der Probe auf ein Ethidiumbromid-enthaltendes Agarosegel (Abb. 5-2B).



**Abb. 5-2: 5'-RACE zur Identifizierung von NOSTRIN in voller Länge**

A. 5'-RACE zur Amplifizierung des 5'-Endes des cDNA-Klons mittels „nested“ PCR. B. Die Produkte der 2. PCR mit den Primerkombinationen UPM/13.2i- für cDNA-Fragment a und UPM/NOSBPr- für Fragment b aufgetragen auf ein Ethidiumbromid-haltiges Agarosegel.

Die Sequenzierung dieser cDNA-Fragmente ergab für die cDNA-Sequenz des eNOS-interagierenden Proteins eine 5'-terminale Verlängerung um 313 bp und damit für den vollständigen cDNA-Klon eine Größe von 1614 bp (Abb. 5-3).

Da die Region um das erste Methionin (TCAACATGA) zumindest teilweise mit der Kozak-Sequenz (CCRCCATGG, mit R = A oder G) (56) übereinstimmt, konnte davon ausgegangen werden, dass das ATG an Nukleinsäureposition 10-12 als Translationsstart verwendet wird (Abb. 5-3). Es ergab sich daher für das eNOS-interagierende Protein ein offener Leserahmen von 1518 bp; das entspricht einem Protein mit 506 Aminosäuren und einer theoretisch berechneten Größe von 58 kDa.

Diesem neuen humanen Protein wurde der Name NOSTRIN gegeben, welcher „eNOS-traffic-inducer“ bedeutet und in Anlehnung an die nachfolgend beschriebenen Beobachtungen gewählt wurde.

```

1/1          31/11          61/21          91/31
cat ttc aac atg agg gac cca ctg aca gat          tgt ccg tat aat aaa gta tac aag aac cta          aag gag ttt tct caa aat gga gag aat ttc          tgc aaa cag gtc aca tct gtt ctt cag caa
M R D P L T D C P Y N K V Y K N L K E F S Q N G E N F C K Q V T S V L Q Q

121/41          151/51          181/61          211/71
agg gca aac ctg gaa att agc tat gcc aaa          gga ctt cag aaa ctg gca agc aag ctg agc          aaa gca tta cag aac acg aga aaa agt tgt          gtt agc agt gcc tgg gcc tgg gcc tca gag
R A N L E I S Y A K G L Q K L A S K L S K A L Q N T R K S C V S S A W A W A S E

241/81          271/91          301/101          331/111
gga atg aaa tcc aca gcg gac ctg cat caa          aaa ctt gcc aaa gca att gaa ttg gaa gca          aag aaa ccg act tat caa gtc cta aat gta          gaa gag aag aag aga aaa tca ctt gac aat
G M K S T A D L H Q K L G K A I E L E A I K P T Y Q V L N V Q E K K R K S L D N

361/121          391/131          421/141          451/151
gaa gtt gaa aag aca gca aat ctt gtc att          agc aac tgg aat cag caa att aag gcc aag          aag aaa tta atg gtt agt acc aag aaa cat          gaa gca aag aag ctt ttc cag ctt gta gaa agc tcc
E V E K T A N L V I S N W N Q Q I K A K K K L M V S T K K H E A L F Q L V E S S

481/161          511/171          541/181          571/191
aag caa tct atg act gag aag gag aag cgg          aag ctc ctc aat aaa ctg aca aaa tca act          gaa aag ttg gaa aag gaa gat gaa aat tac          tac caa aaa aac atg gcg ggt tat tct acc
K Q S M T E K E K R K L L N K L T K S T E K L E K E D E N Y Y Q K N M A G Y S T

601/201          631/211          661/221          691/231
aga ctg aaa tgg gaa aac aca cta gag aac          tgc tac cag agc att ctg gag ctg gag aag          gaa aga att caa ctt tta tgc aat aac tta          aag act tac agc caa cat att tct ctt ttt
R L K W E N T L E N C Y Q S I L E L E K E R I Q L L C N N L N Q Y S Q H I S L F

721/241          751/251          781/261          811/271
ggc caa acc ctg acc aca tgc cac acg cag          att cac tgt gcc atc agc aag att gac att          gaa aaa gat atc cag gct gta atg gaa          gaa act gca att tta tct aca gaa aac aaa tct
G Q T L T T C H T Q I H C A I S K I D I E K D I Q A V M E E T A I L S T E N K S

841/281          871/291          901/301          931/311
gag ttc ctg tta acg gat tac ttt gaa gaa          gat cct aac agt gca atg gat aaa gag aga          cga aag tot tta cta aaa cca aaa tta tta          aga act cag aga gac att gaa aaa gcc tca
E F L L T D Y F E E D P N S A M D K E R R K S L L K P K L L R L Q R D I E K A S

961/321          991/331          1021/341          1051/351
aaa gac aag gaa gcc ctg gaa cga atg ctt          aaa acg tac tcc agc acc tcc tcc tcc tcc          gat gaa aag agc cag aaa gac aca gca          gcg tta atg gat gag aac aat ttg aaa cta gac
K D K E G L E R M L K T Y S S T S S F S D A K S Q K D T A A L M D E N N L K L D

1081/361          1111/371          1141/381          1171/391
ctt ttg gaa gcg aac tcc tac aaa ctg tca          tca atg tta gca gaa ctt gag caa aga cct          caa ccc agc cat cct tgt agt aat tcc atc          ttc agg tgg agg gaa aag gag cat act cat
L L E A N S Y K L S S M L A E L E Q R P Q P S H P C S N S I F R W R E K E H T H

1201/401          1231/411          1261/421          1291/431
agc tat gtg aaa ata tct cgg cct ttt tta          atg aag aga tta gag aat att gtg agc aag          gca tot tct ggt ggg cag agc aat cca          ggt tct tca act cca gcc cct ggt gca gcc cag
S Y V K I S R P F L M K R L E N I V S K A S S G G Q S N P G S S T P A P G A A Q

1321/441          1351/451          1381/461          1411/471
ctc agc agc aga ctt tgc aag gcc ttg tat          tct ttt caa gcc agc caa gat gat gag          ttg aat ttg gaa aag ggt gac att gtg          att ata cac gag aaa aaa gaa gaa gga          tgg tgg ttt
L S S R L C K A L Y S F Q A R Q D D E L N L E K G D I V I I H E K K E E G W W F

1441/481          1471/491          1501/501          1531/511
gga tct ttg aat ggg aaa aaa gcc cat ttt          cct gcc gct tat gtg gag gag tta cct          tca aat gct gcc aac aca gct aca aag          gca taa aac aag act ctg aac ata cta          cct tca cac
G S L N G K K G H F P A A Y V E E L P S N A G N T A T K A *

1561          1591
tcg gta atc aac aat aca gtg tgg ttc          aaa taa gaa taa agt gct ctt acc ttt

```

**Abb. 5-3: Nukleotid- und Aminosäuresequenz von NOSTRIN.**

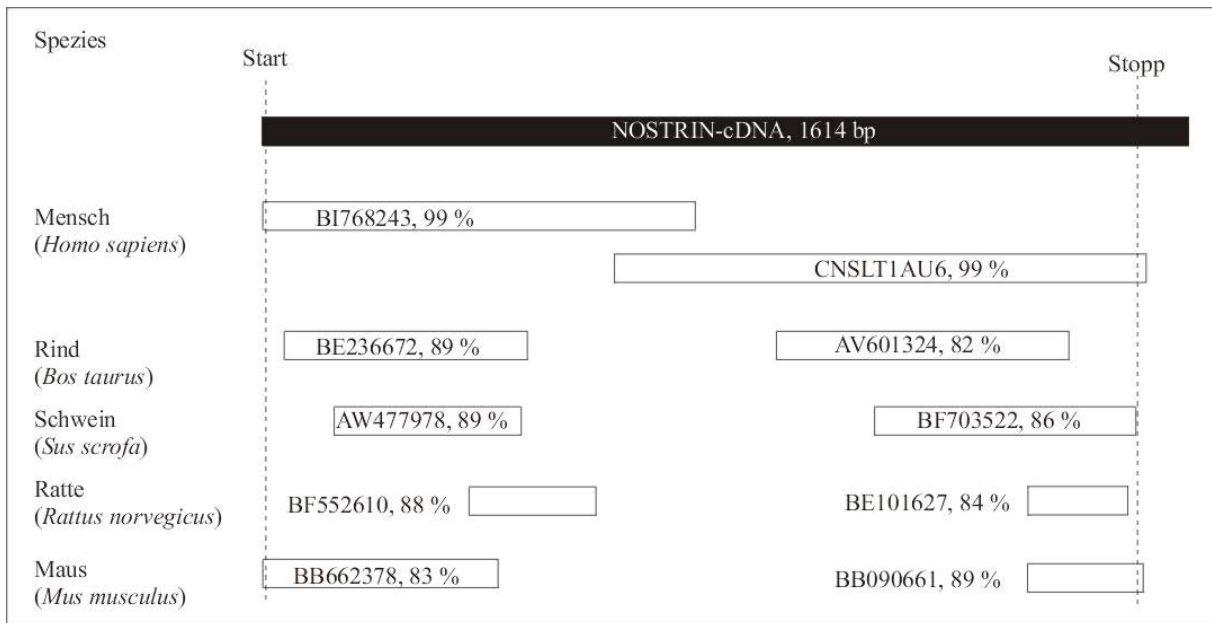
Der vollständige cDNA-Klon hat eine Größe von 1614 bp. Es ergab sich ein offener Leserahmen von 1518 bp (entsprechend 506 Aminosäuren). Das Start-ATG ist unterstrichen dargestellt. Das erste Stopp-Kodon ist durch ein \* markiert.

### 5.1.3 Analyse der DNA-Sequenz

Mit Hilfe des Programmes BLAST (51) wurde die cDNA-Sequenz von NOSTRIN mit bekannten ESTs (expressed sequence tags) der Nukleotidsequenz-Datenbanken des NIH (National institute of health, Bethesda, USA) und des EMBL (European Molecular Biology Laboratory, Heidelberg, Deutschland) verglichen. Hierbei wurde eine cDNA-Sequenz gefunden, die mit der NOSTRIN-cDNA identisch, aber im 5'-untranslatierten Bereich um 17 bp verlängert ist. Es handelt sich um den cDNA-Klon AK002203 (gi: 7023932), der einem japanischen Sequenzierprojekt entstammt, jedoch nicht weiter charakterisiert wurde. Weitere 5'- bzw. 3'-terminale ESTs aus humanem Gewebe bestätigen die Vollständigkeit der vorliegenden NOSTRIN-cDNA (Abb. 5-4).

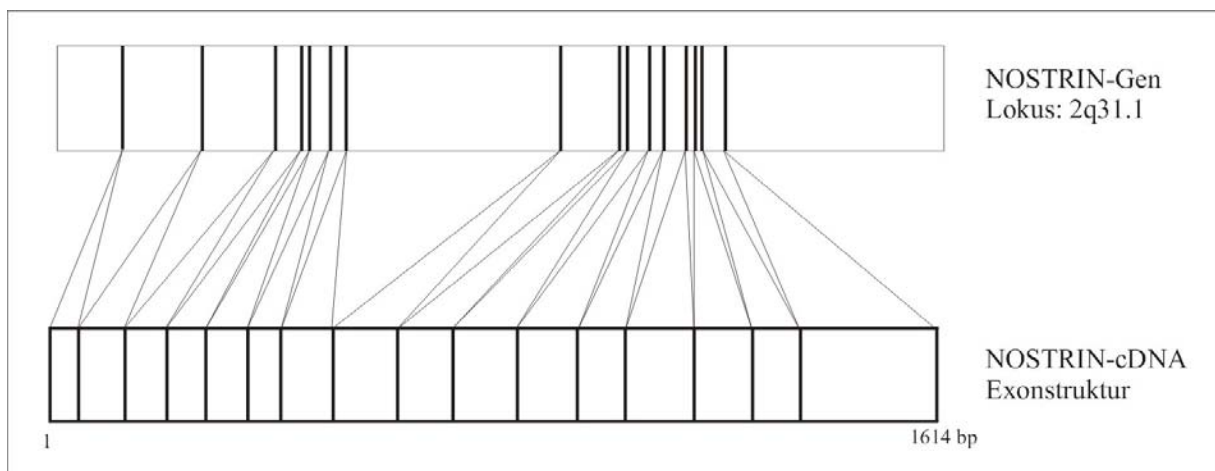
Darüber hinaus konnte in den untersuchten Datenbanken bisher keine vollständige dem humanen NOSTRIN homologe cDNA- oder Gensequenz, die aus einer anderen Spezies stammt, gefunden werden. Jedoch zeigen zahlreiche unterschiedlich große ESTs aus Rinder-, Schwein-, Ratte-, und Mausgewebe eine Sequenzidentität zwischen 82 - 89 % im Vergleich

zur NOSTRIN-cDNA (Abb. 5-4). Daher kann die Existenz von gut konservierten NOSTRIN-homologen Proteinen in anderen Säugern als wahrscheinlich angesehen werden.



**Abb. 5-4: NOSTRIN-homologe ESTs aus verschiedenen Spezies.** Die Darstellung zeigt exemplarisch einige mit ihren Genbank-Nummern bezeichnete ESTs aus den angegebenen Spezies. Diese besitzen im Vergleich zur NOSTRIN-cDNA in dem in Relation gestellten Bereich die angegebene Identität (%). Die menschlichen ESTs stammen aus Sequenzierprojekten angereicherter „full length“-cDNA-Klone und entsprechen somit den 5'- bzw. 3'-Ende einer cDNA. Translationsstart und -stopp sind durch senkrechte gestrichelte Linien gekennzeichnet.

Durch die Anwendung von BLAST auf Datenbanken des humanen Genomprojekts wurde das Gen von NOSTRIN auf dem Chromosom 2, Locus 2q31.1 gefunden (Abb. 5-5). Das Gen hat eine Größe von ca. 80 kb; es besteht aus 16 Exons, welche zwischen 54 bp (Exon 1) und 221 bp (Exon 16) groß sind und durch Introns von bis zu 28,6 kb unterbrochen werden.



**Abb. 5-5: Schema des NOSTRIN-Gens**

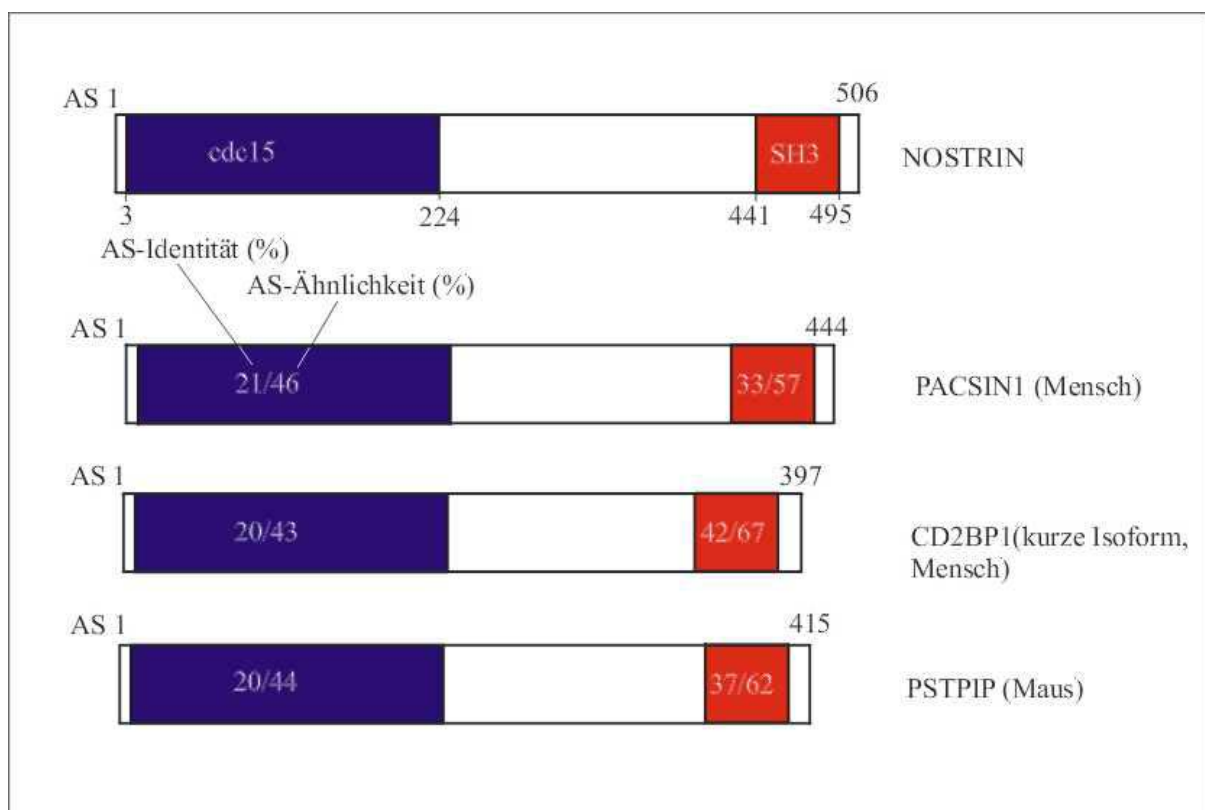
Das gesamte NOSTRIN-Gen besitzt eine Größe von ca. 80 kb und ist in 16 Exons aufgeteilt. Es befindet sich auf Chromosom 2, Locus 2q31.1.

Im ersten zugeordneten Exon ist der bekannten 5'-untranslatierten Region ein Stopp-Kodon vorgeschaltet, wodurch die Vollständigkeit der NOSTRIN-Sequenz zusätzlich bestätigt wird.

#### 5.1.4 Analyse der Proteinsequenz

Um bekannte Proteindomänen bzw. homologe Proteine zu identifizieren, wurde die Aminosäuresequenz von NOSTRIN unter Verwendung des Programmes SMART (Simple Modular Architecture Research Tool) (50) analysiert. Eine Untersuchung der Datenbanken Prosite und Pfam ergab die übereinstimmende Vorhersage einer Cdc15-Domäne im Bereich der Aminosäuren 3 - 224 und einer SH3-Domäne im Bereich der Aminosäuren 441 - 495 (Abb. 5-6).

Während die SH3-Domäne bei einer Vielzahl von Proteinen als Bindungsmotiv prolinreicher Regionen dient, ist die Funktion der seltener vorkommenden Cdc15-Domäne nicht genau bekannt. Die Cdc15-Domäne enthält neben einer N-terminalen Fes/CIP4-homologen (FCH) Domäne (Aminosäuren 3 - 93) zusätzlich eine Coiled-coil-Domäne (Aminosäuren 160 - 190) (57).

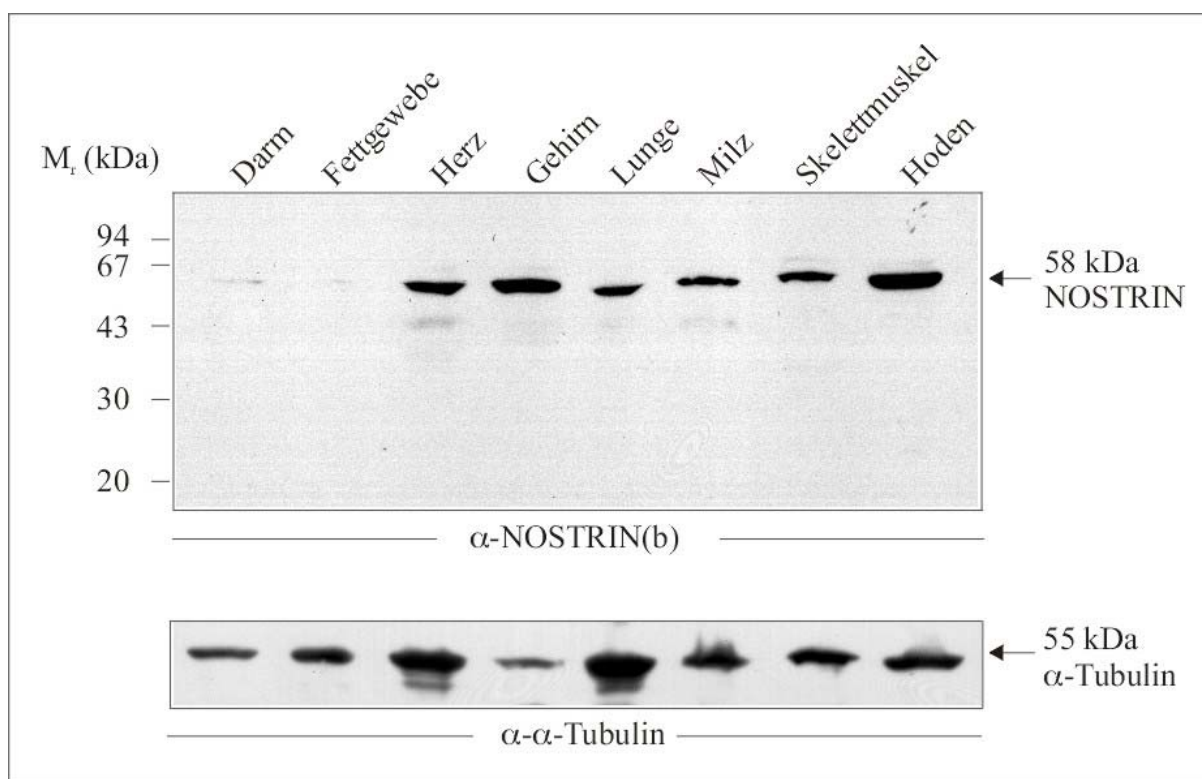


**Abb. 5-6 Domänenstruktur von NOSTRIN und Aminosäuresequenzvergleich mit verwandten Proteinen.** NOSTRIN ist charakterisiert durch eine N-terminale Cdc15-Domäne (blau) sowie eine C-terminale SH3-Domäne (rot). Seine nächsten Verwandten, die Proteine der PCH-Proteinfamilie, wie z.B. PSTPIP, CD2BP1 und PACSIN1, zeigen die gleiche Domänenstruktur und weisen Ähnlichkeiten bezüglich ihrer Aminosäuresequenzen innerhalb dieser Domänen auf (1. Wert: % identische AS / 2. Wert: % ähnliche AS).

Die charakteristische Domänenstruktur von NOSTRIN findet sich ebenfalls bei Proteinen der PCH-Familie (58), wie z.B. PSTPIP (59), CD2BP1 (60) und PACSIN1 (61) (Abb. 5-6). Den Proteinen dieser Familie ist gemein, dass sie an der Regulation des Cytoskeletts bzw. Aktin-vermittelter Prozesse beteiligt sind (58). Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen von NOSTRIN mit den genannten Proteinen unter Anwendung des Programmes ClustalW ergab eine Identität zwischen 20 und 21 % für die Cdc15-Domäne und eine Identität zwischen 33 und 42 % für die SH3-Domäne (Ab. 5-6).

### 5.1.5 Expression von NOSTRIN

Zur Überprüfung der Gewebeverteilung von NOSTRIN wurde dessen Expression in verschiedenen Mausgeweben untersucht. Die Organe von männlichen C57bl6-Mäusen wurden homogenisiert, in Laemmli-Puffer lysiert und mittels Immunoblot analysiert. Wie in Abb. 5-7 gezeigt, wurde mit einem NOSTRIN-spezifischen Antikörper in den meisten untersuchten Organen und vor allem in Herz, Gehirn sowie Hoden eine spezifische Bande eines 58 kDa großen Proteins detektiert. Hingegen konnte die Expression von NOSTRIN im Darm- und Fettgewebe kaum oder gar nicht nachgewiesen werden. Zum Vergleich der aufgetragenen Gewebemengen wurde der Blot anschließend mit einem Antikörper gegen  $\alpha$ -Tubulin behandelt (Abb. 5-7, unten).



**Abb. 5-7: Expression von NOSTRIN in Mausgeweben**

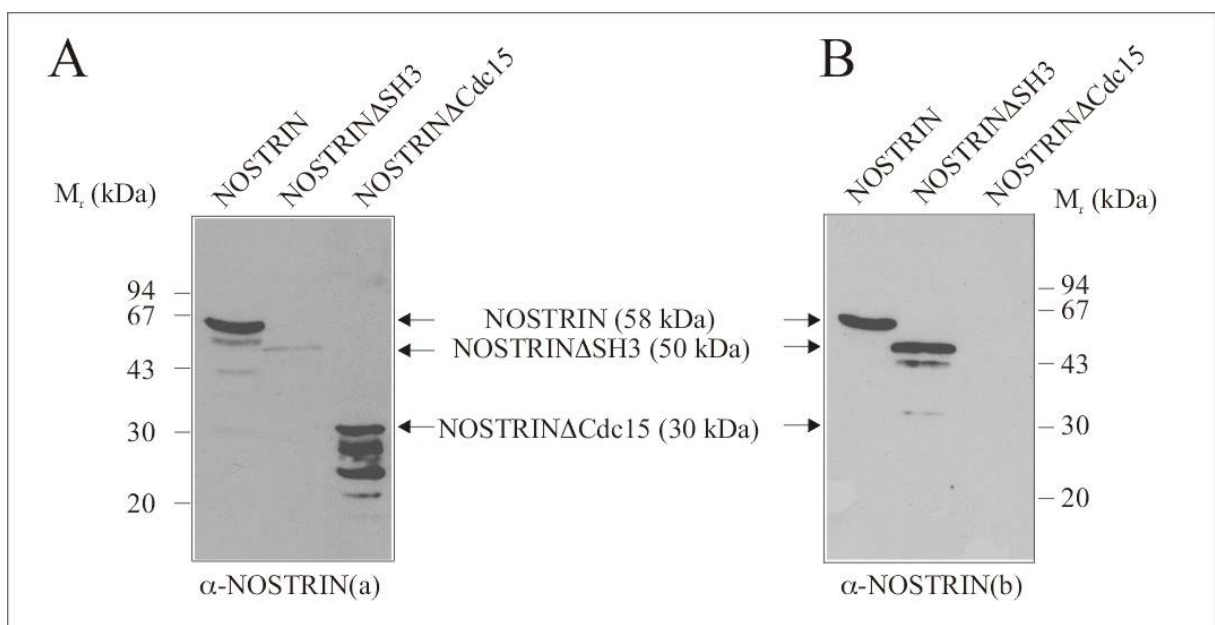
Die angegebenen Mausorgane wurden lysiert und mittels Immunoblot analysiert, wobei zunächst mit  $\alpha$ -NOSTRIN(b) die exprimierte NOSTRIN-Menge detektiert (oben) und anschließend zur Kontrolle auf der gleichen Membran die  $\alpha$ -Tubulin-Expression untersucht wurde (unten).

Die Tatsache, dass mit einem Antikörper gegen das humane NOSTRIN spezifisch ein ca. 58 kDa großes Protein detektiert werden konnte, bestätigt die Existenz eines sehr gut konservierten NOSTRIN-homologen Proteins in der Maus, die bereits auf Grund des Auftretens von 83 – 89 % identischen Maus-ESTs (Abb. 5-4) vermutet wurde. Zugleich implizieren die Ergebnisse – zumindest in der Maus - eine weitverbreitete Expression von NOSTRIN vor allem in stark vaskularisierten Geweben.

## 5.2 Herstellung und Expression verschiedener Konstrukte von NOSTRIN bzw. der eNOS

### 5.2.1 Herstellung und Analyse von SFV-NOSTRIN, SFV-NOSTRIN $\Delta$ SH3 und SFV-NOSTRIN $\Delta$ Cdc15

Zur Charakterisierung von NOSTRIN im Hinblick auf die Funktion der Domänen Cdc15 sowie SH3 wurden mittels Restriktion bzw. PCR die Deletionsmutanten NOSTRIN $\Delta$ SH3 (= NOSTRIN<sub>AS1-440</sub>) und NOSTRIN $\Delta$ Cdc15 (= NOSTRIN<sub>AS241-506</sub>) konstruiert. Nach der Klonierung von NOSTRIN und der NOSTRIN-Mutanten in das SFV-Plasmid pSFV2 wurden die entsprechenden Semliki-Forest-Viren (SFV) hergestellt. Anschließend wurden CHO-eNOS-Zellen mit SFV-NOSTRIN, SFV-NOSTRIN $\Delta$ SH3 bzw. SFV-NOSTRIN $\Delta$ Cdc15 infiziert und die Zelllysate durch Immunoblotting mit  $\alpha$ -NOSTRIN(a) bzw.  $\alpha$ -NOSTRIN(b) untersucht.



**Abb. 5-8: Analyse der NOSTRIN-Konstrukte**

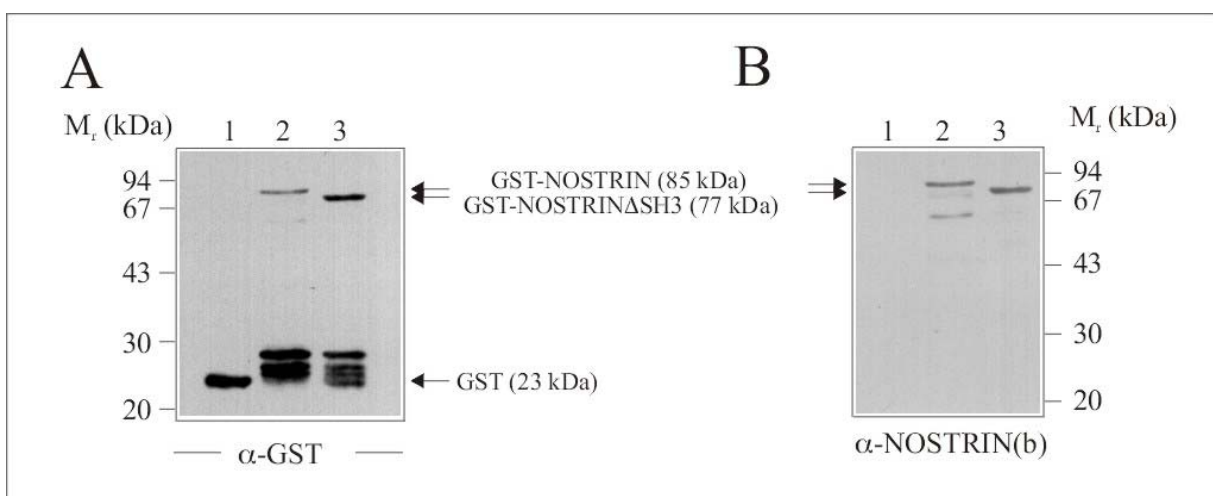
CHO-eNOS-Zellen wurden für 16 h mit SFV-NOSTRIN, SFV-NOSTRIN $\Delta$ SH3 bzw. SFV-NOSTRIN $\Delta$ Cdc15 infiziert und anschließend lysiert. Der Nachweis der entsprechenden NOSTRIN(-Mutanten) erfolgte via Immunoblot mit A.  $\alpha$ -NOSTRIN(a) oder B.  $\alpha$ -NOSTRIN(b).



Wie in Abb. 5-8A zu sehen, wurden mit dem polyklonalen Mausantikörper  $\alpha$ -NOSTRIN(a), der gegen das GST-Fusionsprotein GST-NOSTRIN $\Delta$ Cdc15 gerichtet ist, sowohl NOSTRIN als auch NOSTRIN $\Delta$ Cdc15 mit den erwarteten Größen von 58 bzw. 30 kDa detektiert. Weiterhin sind neben der Hauptbande von NOSTRIN $\Delta$ Cdc15 bei 30 kDa Proteinbanden geringerer Größe zu erkennen, welche wahrscheinlich auf die Verwendung unterschiedlicher Translationsstartpunkte zurückzuführen sind. Hingegen konnte die Deletionsmutante NOSTRIN $\Delta$ SH3 mit diesem Antikörper nur als schwache Bande auf der theoretisch berechneten Höhe von 50 kDa nachgewiesen werden. Der polyklonale Antikörper  $\alpha$ -NOSTRIN(b), der gegen das NOSTRIN-Peptid (AS 170-186) gerichtet ist, erkannte wie erwartet NOSTRIN und NOSTRIN $\Delta$ SH3 auf den entsprechenden Höhen, jedoch nicht NOSTRIN $\Delta$ Cdc15 (Abb. 5-8B). Daher wurden im Rahmen der folgenden Versuche  $\alpha$ -NOSTRIN(a) zur Detektion von NOSTRIN und NOSTRIN $\Delta$ Cdc15 bzw.  $\alpha$ -NOSTRIN(b) zum Nachweis von NOSTRIN sowie NOSTRIN $\Delta$ SH3 eingesetzt. Alle weiteren verfügbaren NOSTRIN-Antikörper sind im Anhang dieser Arbeit (Kapitel 8.2) aufgeführt und näher beschrieben.

### 5.2.2 Expression und Reinigung der GST-Fusionsproteine GST-NOSTRIN und GST-NOSTRIN $\Delta$ SH3

Für den Einsatz in GST-Pulldown-Experimenten wurden NOSTRIN und die Deletionsmutante NOSTRIN $\Delta$ SH3 (NOSTRIN<sub>AS1-440</sub>) in den Vektor pGEX2T kloniert und als Fusionsproteine mit N-terminalem GST-Tag in *E.coli*-Bakterien exprimiert. Hierbei diente die unter Verwendung des Vektors pGEX2T exprimierte Glutathion-S-Transferase (GST) als Negativkontrolle. Anschließend erfolgte die Reinigung von GST sowie der GST-Fusionsproteine über die Bindung an GSH-Sepharose.



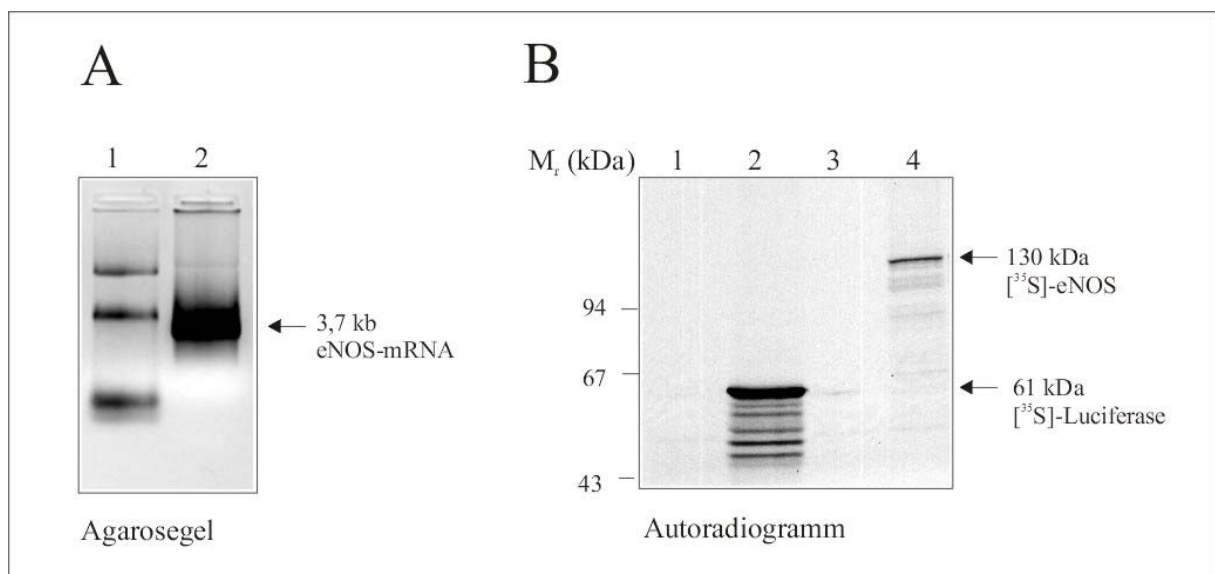
**Abb. 5-9: Immunoblot-Analyse der gereinigten GST-Fusionsproteine**

Die über GSH-Sepharose gereinigten GST (Spur 1), GST-NOSTRIN (Spur 2) und GST-NOSTRIN $\Delta$ SH3 (Spur 3) wurden durch Immunoblot-Analyse mit  $\alpha$ -GST (A) und  $\alpha$ -NOSTRIN(b) (B) analysiert.

Wie in Abb. 5-9A und B erkennbar, wurden GST-NOSTRIN bzw. GST-NOSTRIN $\Delta$ SH3 sowohl mit GST-Antikörpern als auch mit NOSTRIN-Antikörpern auf den erwarteten Höhen von 85 bzw. 77 kDa detektiert. Bei den nur in Abb. 5-9A erkennbaren „Abbruchbanden“ (< 30 kDa) der GST-Fusionsproteine handelte es sich um Fragmente, die durch den vorzeitigen Abbruch der Translation kurz nach dem GST-Fusionsanteil entstanden waren.

### 5.2.3 *In-vitro*-Herstellung [ $^{35}$ S]-markierter eNOS

Im ersten Schritt der Herstellung von [ $^{35}$ S]-markierter eNOS wurde ausgehend von eNOS-cDNA die Transkription der eNOS-mRNA durchgeführt (Abb. 5-10A, Spur 2). Als Negativkontrolle diente die Transkription des Vektors pcDNA3.1 (Abb. 5-10A, Spur 1). Im zweiten Schritt erfolgte unter Verwendung von Reticulozytenlysats und Supplementierung mit [ $^{35}$ S]-L-Methionin die *in-vitro*-Translation der eNOS-mRNA in [ $^{35}$ S]-markierte eNOS (Abb. 5-10B, Spur 4). Hierbei diente die Translation von Luciferase-mRNA als Positivkontrolle (Abb. 5-10B, Spur 2). Als Negativkontrollen wurden Wasser bzw. das Transkriptionsprodukt des Vektors pcDNA3.1 eingesetzt (Abb. 5-10B, Spuren 1 und 2).



#### Abb. 5-10: Herstellung von [ $^{35}$ S]-markierter eNOS

A. Die *in vitro* transkribierte eNOS-mRNA wurde auf ein Ethidiumbromid-haltiges Agarosegel aufgetragen (Spur 2). Spur 1 zeigt das Transkriptionsprodukt des Vektors pcDNA3.1; B. Die *in vitro* translatierten [ $^{35}$ S]-markierten Proben wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und autoradiographisch ausgewertet. Spur 4 enthält die [ $^{35}$ S]-markierte eNOS. Für die Positivkontrolle wurde die Luciferase-mRNA in das entsprechende Protein umgeschrieben (Spur 2). Als Negativkontrolle diente die Translationsreaktion mit H<sub>2</sub>O (Spur 1) sowie die unter Verwendung des Vektors pcDNA3.1 erhaltene mRNA (Spur 3).

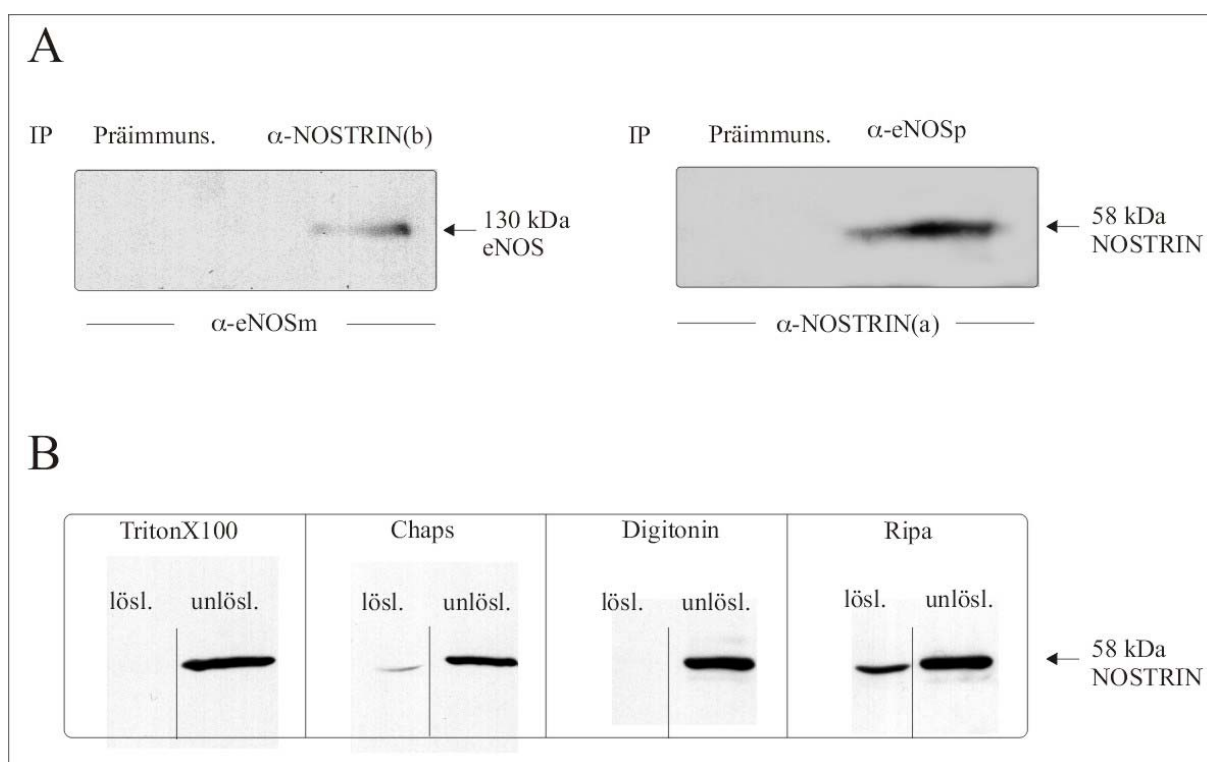
Wie in Abb. 5-10 zu sehen, konnte im Autoradiogramm spezifisch eine Hauptbande mit einer der eNOS entsprechenden Größe von 130 kDa nachgewiesen werden. Darüber hinaus traten sowohl bei der Positivkontrolle [ $^{35}$ S]-Luciferase als auch bei [ $^{35}$ S]-eNOS „Abbruchbanden“ auf, die im Vergleich zur Hauptbande eine deutlich geringere Konzentration zeigten.



## 5.3 Die Interaktion zwischen eNOS und NOSTRIN

### 5.3.1 Coimmunpräzipitation von eNOS und NOSTRIN in Zelllysaten

Zur Verifizierung der Interaktion zwischen der eNOS und NOSTRIN wurden beide Proteine wechselseitig copräzipitiert. Hierzu wurde NOSTRIN transient in CHO-eNOS-Zellen exprimiert. Nach 48 h wurden die Zellen in Ripa-Puffer lysiert und anschließend mit Waschpuffer 1:3 verdünnt. Aus dem Zelllysate wurden eNOS bzw. NOSTRIN mit immunspezifischen Antikörpern präzipitiert und die Copräzipitate durch Immunoblotting mit NOSTRIN- bzw. eNOS-Antikörper analysiert.



**Abb. 5-11: Copräzipitation von eNOS und NOSTRIN aus Zelllysaten**

CHO-eNOS-Zellen wurden unter Verwendung von Roti-Fect<sup>®</sup> transient mit NOSTRIN transfiziert. A. Nach 48 h wurden die Zellen in Ripa-Puffer lysiert und anschließend 1:3 mit Waschpuffer verdünnt. Die Immunpräzipitation (IP) erfolgte mit eNOS- bzw. NOSTRIN-spezifischen Antikörpern sowie den entsprechenden Präimmunsereinen (Präimmuns.). Die Copräzipitate wurden mittels Immunoblotting (IB) analysiert. B. Die NOSTRIN-exprimierenden CHO-eNOS-Zellen wurden in TritonX100-, Chaps-, Digitonin- sowie Ripa-Puffer (siehe Material und Methoden) lysiert und durch Ultrazentrifugation in lösliche (lösl.) bzw. unlösliche (unlösl.) Fraktionen aufgetrennt. Mit Hilfe eines Immunoblots wurde die Verteilung von NOSTRIN detektiert.

Im Vergleich zur Kontrollpräzipitation mit den entsprechenden Präimmunsereinen war die Copräzipitation von NOSTRIN mit dem eNOS-spezifischen Antikörper bzw. die Copräzipitation der eNOS mit einem NOSTRIN-spezifischen Antikörper erfolgreich (Abb. 5-11A).

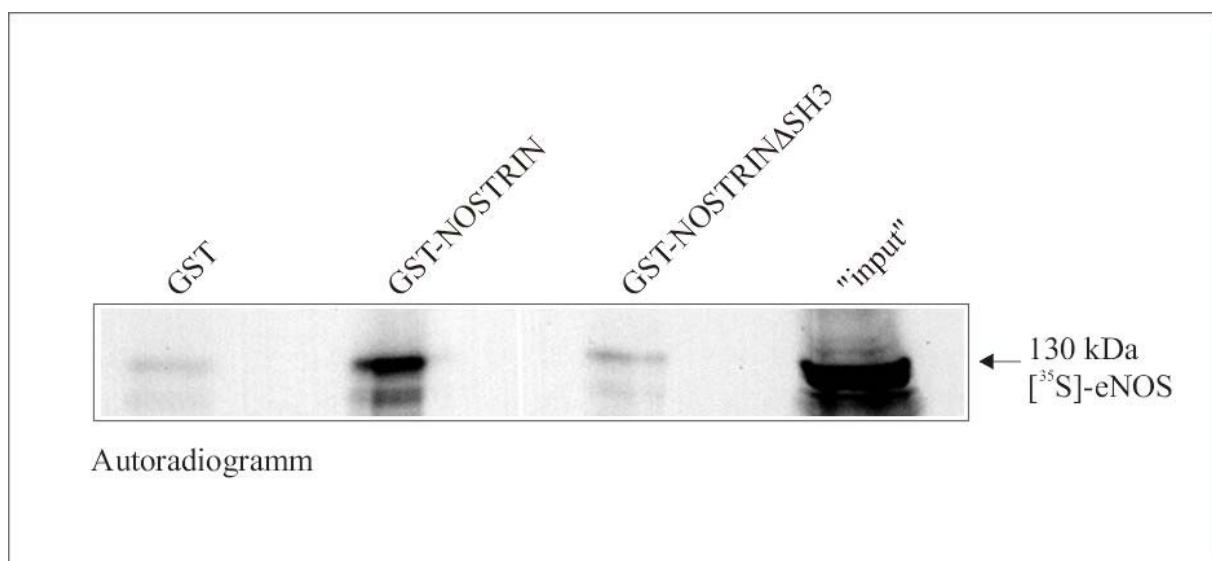
Da die Anwesenheit von geladenen Detergenzien nicht-kovalente Protein-Interaktionen stört (62), könnte der Einsatz des 1:3-verdünntem Ripa-Puffers, der u.a. 0,1 % SDS enthält, ein

Grund für die relativ schlechte Copräzipitierbarkeit (schwachen Proteinbanden) von NOSTRIN und eNOS sein (Abb. 5-11A). Eine „scharfe“ Lyse war jedoch notwendig, da NOSTRIN mit den „milderen“ und ungeladenen Detergenzien TritonX100, Chaps oder Digitonin kaum löslich war; sogar in Ripa-Puffer war nur ein Bruchteil von NOSTRIN in der löslichen Fraktion nachweisbar (Abb. 5-11).

### 5.3.2 Copräzipitation von eNOS und NOSTRIN *in vitro*

Um auszuschließen, dass ein Adapterprotein die Interaktion zwischen eNOS und NOSTRIN vermittelt, wurde die direkte Bindung *in vitro* in einem „Pull-down“-Experiment mit den isolierten Proteinen untersucht. Weiterhin wurde überprüft, ob durch eine Deletion der SH3-Domäne von NOSTRIN die Interaktion verhindert wird, da sich im Rahmen von Kartierungsstudien in der Hefe die SH3-Domäne von NOSTRIN als ausreichend für die eNOS-NOSTRIN-Interaktion erwies (63).

Hierfür wurden die an GSH-Sepharose gebundenen GST-Fusionsproteine GST-NOSTRIN, GST-NOSTRIN $\Delta$ SH3 und GST über Nacht mit *in vitro* translatierter und [<sup>35</sup>S]-markierter eNOS inkubiert. Die Copräzipitate wurden gewaschen, lysiert und mittels SDS-PAGE aufgetrennt.



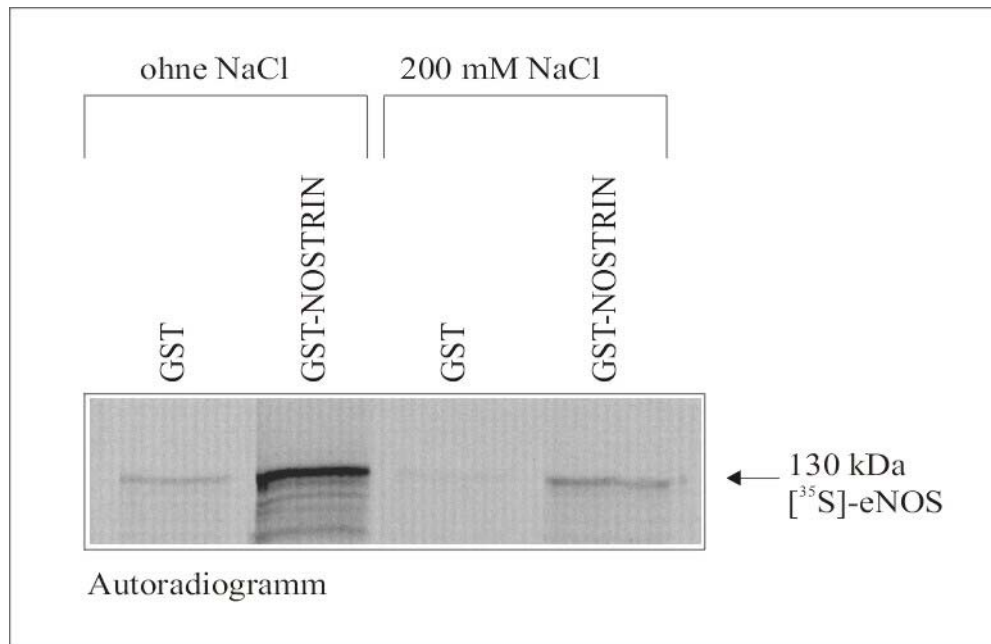
#### Abb. 5-12: Auswertung des GST-Pulldown-Experimentes

Der Autoradiogramm zeigt die Menge an [<sup>35</sup>S]-markierter eNOS, die mit an GSH-Sepharose gebundenem GST-NOSTRIN, der SH3-Deletionsmutante von NOSTRIN (GST-NOSTRIN $\Delta$ SH3) sowie GST als Negativkontrolle copräzipitierte. Zum Vergleich dazu wurde die gesamte je Copräzipitation eingesetzte Menge an [<sup>35</sup>S]-eNOS aufgetragen („input“).

Abb. 5-12 zeigt die autoradiographische Auswertung des Versuches: Im Vergleich zur Negativkontrolle, GST, war die Copräzipitation von [<sup>35</sup>S]-eNOS mit GST-NOSTRIN erfolgreich. Dagegen wurde durch Deletion der SH3-Domäne von NOSTRIN die

Copräzipitation der eNOS vollständig verhindert, was eine Beteiligung der SH3-Domäne von NOSTRIN an der eNOS-Bindung belegt.

Die Zugabe von 200 mM NaCl in den Inkubations- und Waschpuffer bewirkte eine deutliche Verringerung der mit GST-NOSTRIN copräzipitierten Menge an [<sup>35</sup>S]-eNOS (Abb. 5-13).



**Abb. 5-13: Einfluss der Salzkonzentration auf die Bindung zwischen NOSTRIN und eNOS.**

GST-NOSTRIN und GST als Negativkontrolle und [<sup>35</sup>S]-markierte eNOS wurden über Nacht in einem Puffer ohne und mit 200 mM NaCl inkubiert. Die an GSH-Sepharose gebundenen Copräzipitate wurden mit einem Waschpuffer ohne bzw. mit 200 mM NaCl gewaschen, mittels SDS-PAGE getrennt und autoradiographisch ausgewertet.

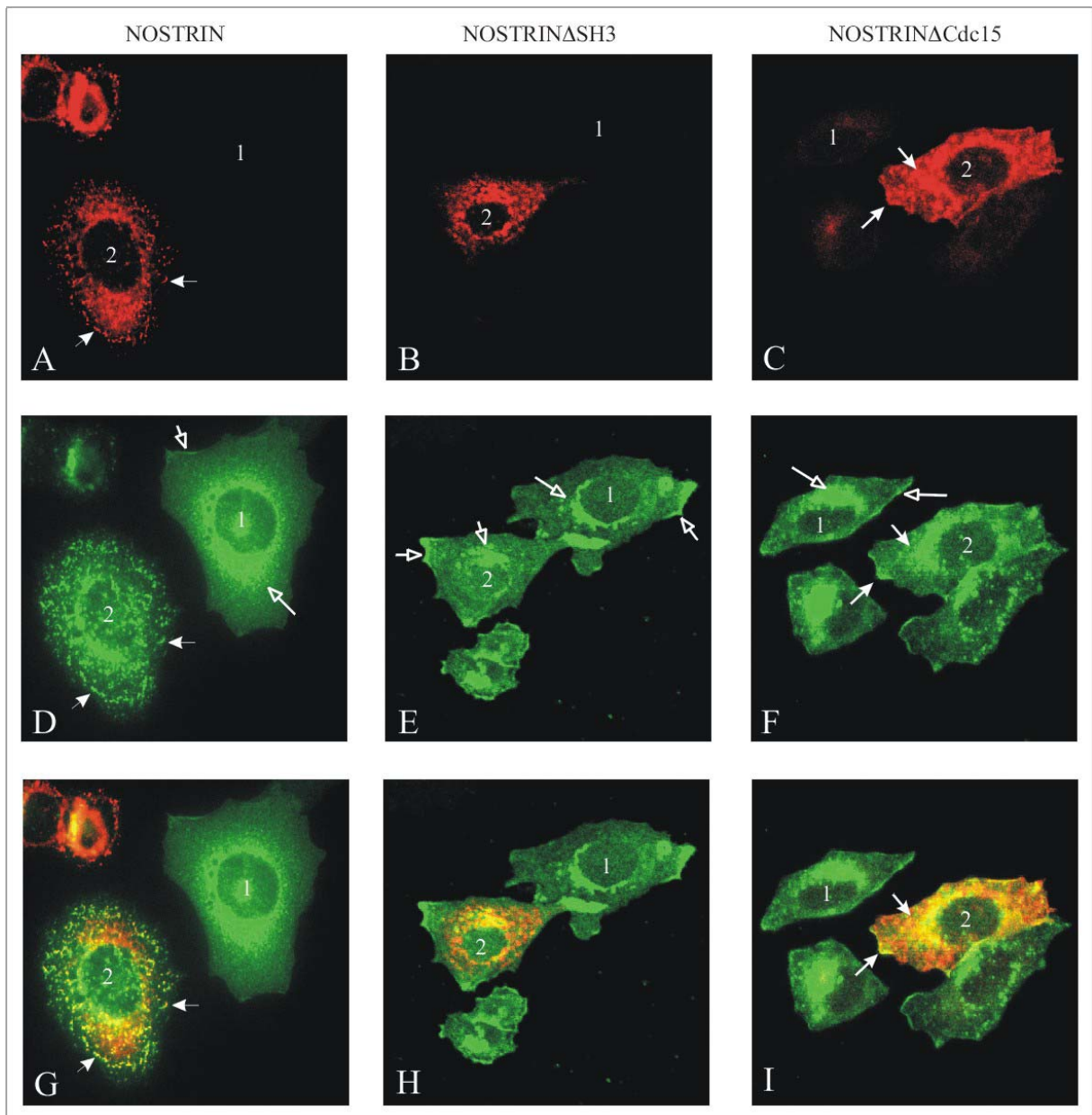
## 5.4 Subzelluläre Lokalisation von NOSTRIN

### 5.4.1 Colokalisation von NOSTRIN und eNOS

Nachdem die Interaktion zwischen NOSTRIN und eNOS „*in lyso*“ verifiziert werden konnte, wurde nun mittels Immunfluoreszenzmikroskopie die relative Lokalisation und Kompartimentierung der beiden Proteine in intakten Zellen untersucht. CHO-eNOS-Zellen wurden mit SFV-NOSTRIN, SFV-NOSTRIN $\Delta$ SH3- (NOSTRIN<sub>AS1-440</sub>) bzw. SFV-NOSTRIN $\Delta$ Cdc15 (NOSTRIN<sub>AS241-506</sub>) infiziert. Hierbei wurde durch die Verwendung eines niedrigen Virustiters nur ein Teil der Zellen infiziert. Nach 8-stündiger Infektion wurden die Zellen mit Methanol fixiert und doppelt markiert mit  $\alpha$ -eNOS<sub>m</sub> sowie  $\alpha$ -NOSTRIN(b) bzw.  $\alpha$ -NOSTRIN(c). Die Immunfärbungen NOSTRIN-infizierter CHO-eNOS-Zellen mit Präimmunserum war negativ (Daten nicht gezeigt). Da in nicht-infizierten CHO-eNOS-Zellen kein endogenes NOSTRIN nachgewiesen werden konnte (Abb. 5-12A-C, Zelle 1), war die nach Markierung mit NOSTRIN-Antikörper beobachtete Fluoreszenz ausschließlich auf das infizierte NOSTRIN-Konstrukt zurückzuführen.

Wie in Abb. 5-14A dargestellt, erwies sich ein Muster von intrazellulären punktförmigen Strukturen als charakteristisch für NOSTRIN. Diese vesikelartige Verteilung blieb bei der SH3-Deletionsmutante von NOSTRIN unverändert (Abb. 5-14B). Jedoch führte die Deletion der Cdc15-Domäne neben den punktförmigen Strukturen zu einer diffusen Cytoplasmafärbung sowie zu einer partiellen Färbung der Plasmamembran (Abb. 5-14C). Daher kann vermutet werden, dass die Cdc15-Domäne eine bedeutende Rolle für die Lokalisation von NOSTRIN spielt.

Als nächstes wurde in den gleichen Bildausschnitten die entsprechende Verteilung der eNOS betrachtet: In nicht-NOSTRIN-infizierten Zellen (Zelle 1) war die eNOS hauptsächlich an der Plasmamembran und am Golgi-Apparat lokalisiert, was der typischen eNOS-Distribution in nicht stimulierten primären Endothelzellen, wie z.B. BAECs, entspricht (45). Die NOSTRIN exprimierende Zelle 2 (vgl. Abb. 5-14A und D) zeigte hingegen eine punktförmige cytoplasmatische Lokalisation der eNOS, welche perfekt mit der NOSTRIN-Verteilung in dieser Zelle übereinstimmte (Abb. 5-14G). Daraus kann geschlossen werden, dass NOSTRIN und eNOS tatsächlich in der Zelle colokalisieren. Darüber hinaus führte die Überexpression von NOSTRIN zu einer drastischen Umverteilung der eNOS vom Plasmamembrangebundenen Zustand zu NOSTRIN-enthaltenden vesikelartigen intrazellulären Strukturen.



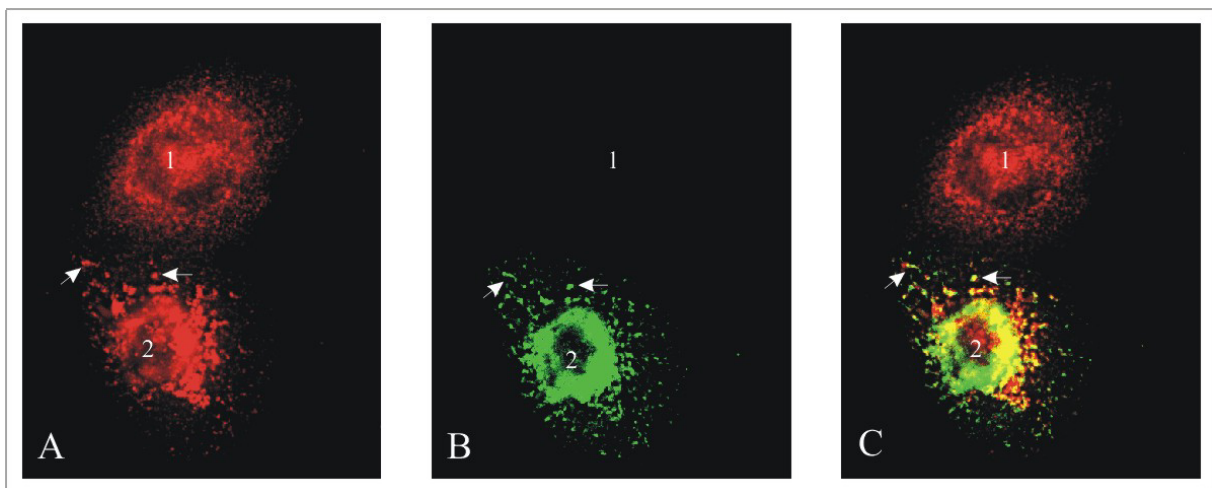
**Abb. 5-14: Colokalisation von NOSTRIN und eNOS**

Für die Immunfluoreszenzaufnahmen wurden infizierte CHO-eNOS-Zellen fixiert und mit  $\alpha$ -NOSTRIN(b) (A,B) bzw.  $\alpha$ -NOSTRIN(c) (C) in Kombination mit cy3-gekoppeltem Sekundärantikörper (rot) sowie  $\alpha$ -eNOSm (D-F) in Kombination mit cy2-gekoppeltem Sekundärantikörper (grün) doppelt markiert. Der gleiche Bildausschnitt wurde für SFV-NOSTRIN- (A,D), SFV-NOSTRIN $\Delta$ SH3- (B,E) und SFV-NOSTRIN $\Delta$ Cdc15-infizierte Zellen (C,F) mit den entsprechenden Filtern für cy3 und cy2 aufgenommen. Die Bilder zeigen jeweils mindestens eine nicht-infizierte (Zelle 1) und eine infizierte Zelle (Zelle 2). Pfeile mit gefülltem Kopf deuten auf Strukturen, in denen NOSTRIN(-Mutanten) und eNOS colokalisiert vorliegen. Hingegen kennzeichnen Pfeile mit ungefülltem Kopf die typische eNOS-Lokalisation vor allem an der Plasmamembran und am Golgi-Apparat. Nach Überlagerung der Immunfluoreszenzbilder mit NOSTRIN- (rot) und eNOS-Färbung (grün) erscheinen colokalisierte Bereiche gelb (G-I).

Die Deletion von NOSTRINs SH3-Domäne, der eNOS-Bindestelle, verhinderte sowohl die eNOS-Translokation als auch die Colokalisation von NOSTRIN und eNOS (Abb. 5-14B,E,H). Lediglich in der Golgi-Region wurde eine Colokalisation von eNOS und NOSTRIN $\Delta$ SH3 beobachtet, welche jedoch zum großen Teil auf die Überexpression zurückgeführt werden kann. Wurde dagegen die Cdc15-Domäne deletiert, kam es zu einer Colokalisation von NOSTRIN und eNOS sowohl intrazellulär als auch an der Plasmamembran; jedoch konnte keine Veränderung der eNOS-Lokalisation beobachtet werden (Abb. 5-14C,F,I).

#### 5.4.2 Colokalisation von NOSTRIN und Caveolin-1

In den vorherigen Experimenten konnte gezeigt werden, dass NOSTRIN die Translokation der eNOS an subzelluläre vesikelartige Strukturen bewirkt. Dies führte zu der Frage, inwiefern die bekannte Interaktion von eNOS und Caveolin-1 an der Plasmamembran durch NOSTRIN beeinflusst werden kann. Mit Hilfe der Immunfluoreszenzmikroskopie wurde in NOSTRIN-infizierten CHO-eNOS-Zellen die Lokalisation von Caveolin-1 mit der von NOSTRIN verglichen. Wie in Abb. 5-15A dargestellt, zeigte die Färbung von endogenem Caveolin-1 eine typische punktförmige Verteilung (64). Diese vesikelartigen Strukturen überlappten partiell mit dem NOSTRIN-Muster, wobei alle NOSTRIN-positiven Strukturen mit Caveolin-1 colokalisierten (Abb. 5-15B und C). Trotz der Überexpression von NOSTRIN war die Anzahl der Caveolin-1-haltigen Vesikel größer als die der NOSTRIN-positiven Strukturen.

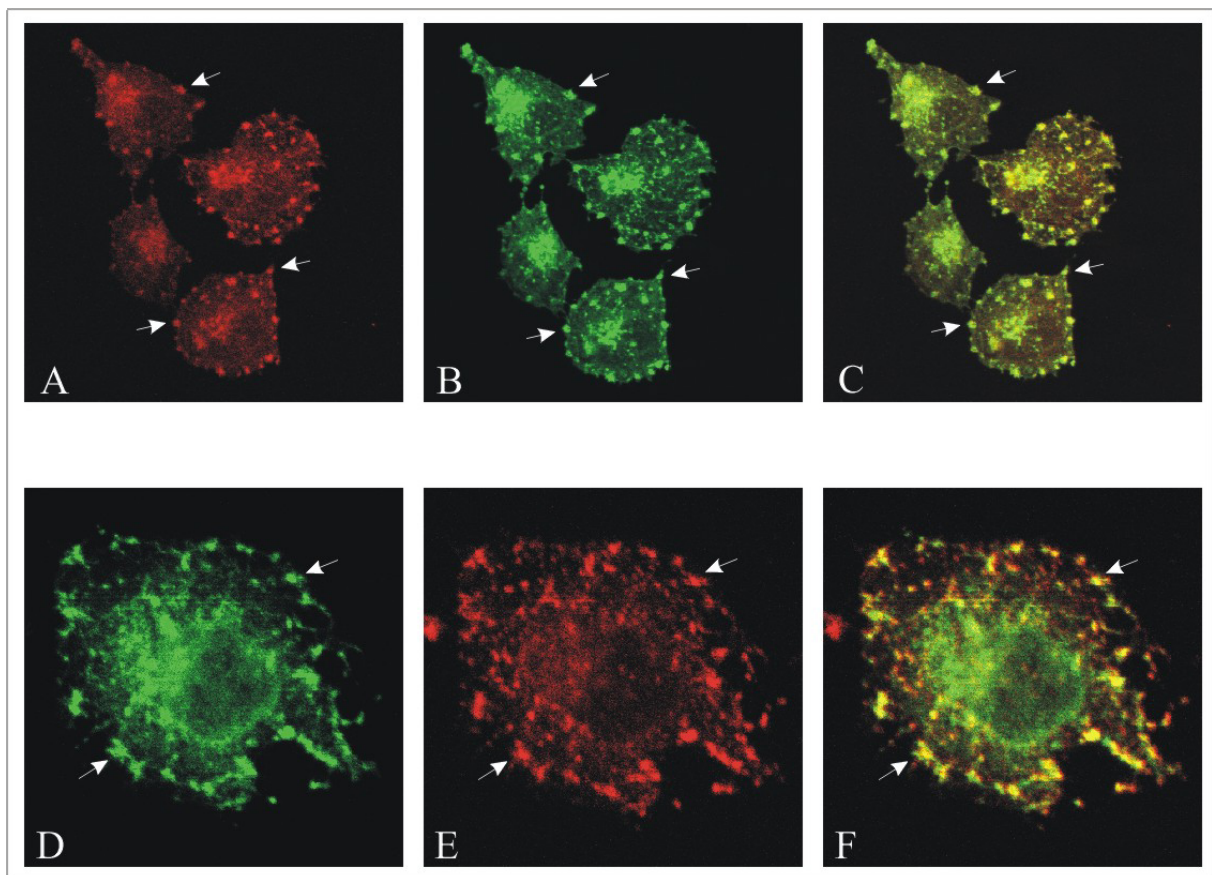


**Abb. 5-15: Colokalisation von Caveolin-1 und NOSTRIN**

CHO-eNOS-Zellen wurden mit SFV-NOSTRIN infiziert und nach Fixierung mit  $\alpha$ -NOSTRIN(a)/cy2-gekoppeltem Sekundärantikörper sowie  $\alpha$ -Caveolin-1/cy3-gekoppeltem Sekundärantikörper doppelt markiert. Die Aufnahmen zeigen die Verteilung von Caveolin-1 (rot, A) und NOSTRIN (grün, B) in einer nicht-infizierten (Zelle 1) und in einer NOSTRIN-infizierten Zelle (Zelle 2). Die Pfeile verweisen beispielhaft auf die Colokalisation von Caveolin-1 und NOSTRIN in vesikelartigen Strukturen. Bild C entspricht der Überlagerung von A und B.



Weiterhin war auffällig, dass die Caveolin-reichen Vesikel, welche NOSTRIN enthielten, größer erschienen und eher im perinukleären Raum angesiedelt waren (Abb. 5-15B und C). Aus der Literatur ist bekannt, dass im Gegensatz zur Endocytose der sogenannten „clathrin coated pits“ die Internalisierung der Caveolae an ein intaktes Cytoskelett gekoppelt ist (31, 65). Daher wurde der Einfluss von Cytochalasin D, das die Aktin-Polymerisation inhibiert bzw. die Depolymerisation von F-Aktin induziert (66), auf die Lokalisation von NOSTRIN, Caveolin-1 und eNOS in NOSTRIN-infizierten CHO-eNOS-Zellen überprüft. Die Immunfluoreszenzaufnahmen in Abb. 5-16 zeigen nach Inkubation mit Cytochalasin D für 2 h noch immer eine sehr gute Colokalisation von NOSTRIN und eNOS (Abb. 5-16A-C) bzw. NOSTRIN und Caveolin-1 (Abb. 5-16D-F). Jedoch waren die Vesikel tendenziell in der Zellperipherie an der Plasmamembran lokalisiert.

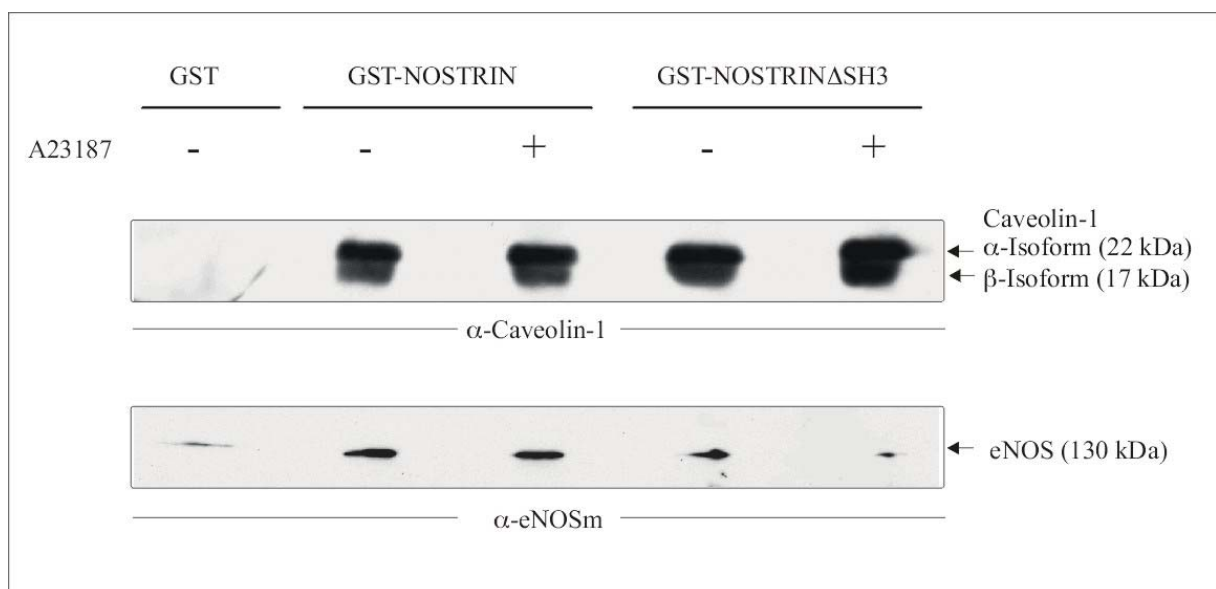


**Abb. 5-16 Colokalisation von NOSTRIN mit eNOS bzw. Caveolin-1 nach Behandlung mit Cytochalasin D.** CHO-eNOS-Zellen wurden für 8 h mit SFV-NOSTRIN infiziert, wobei in den letzten 2 h eine Inkubation mit 2  $\mu$ M Cytochalasin D erfolgte. Nach Fixierung wurde einerseits mit  $\alpha$ -NOSTRIN(b)/cy3-gekoppeltem Sekundärantikörper (A) und  $\alpha$ -eNOSm/cy2-gekoppeltem Sekundärantikörper (B), andererseits mit  $\alpha$ -NOSTRIN(a)/cy2-gekoppeltem Sekundärantikörper (D) und  $\alpha$ -Caveolin-1/cy3-gekoppeltem Sekundärantikörper (E) doppelt gefärbt. In C und F sind die entsprechenden Überlagerungen dargestellt. Pfeile indizieren Colokalisation.

Zusammenfassend implizieren die Immunfluoreszenzaufnahmen, dass NOSTRIN, eNOS und Caveolin-1 gemeinsam an caveoläre Vesikel assoziiert vorliegen.

### 5.4.3 Der ternäre Komplex aus NOSTRIN, eNOS und Caveolin-1

Aufgrund der beobachteten Colokalisation von NOSTRIN, eNOS und Caveolin-1 wurde vermutet, dass die drei Proteine einen ternären Komplex bilden. Um eine indirekte Assoziation von Caveolin-1 über eNOS von einer direkten NOSTRIN-Caveolin-1-Bindung zu unterscheiden, wurden „GST-Pulldown“-Experimente durchgeführt. Hierbei wurden GST-NOSTRIN sowie GST-NOSTRIN $\Delta$ SH3, das *in vitro* nicht mehr mit NOS interagieren kann, eingesetzt. Zunächst wurden CHO-eNOS-Zellen unbehandelt oder nach Inkubation mit dem Kalziumionophor A23187 in OG-Puffer lysiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation der Lysate mit an GSH-Sepharose gebundenem GST-NOSTRIN, GST-NOSTRIN $\Delta$ SH3 oder GST als Kontrolle. Die Copräzipitate wurden dann mittels SDS-PAGE getrennt. Mit den entsprechenden Antikörpern wurde das Vorhandensein von Caveolin-1 bzw. eNOS überprüft. Wie in Abb. 5-17 gezeigt, war der Kontroll-„Pulldown“ mit GST sowohl hinsichtlich einer Copräzipitation von Caveolin-1 als auch von eNOS negativ.



**Abb. 5-17: Pulldown von eNOS und Caveolin-1 mit GST-NOSTRIN.** GSH-Sepharose gebundenes GST, GST-NOSTRIN und GST-NOSTRIN $\Delta$ SH3 wurden mit Lysat von unstimulierten (-) und A23187-stimulierten (+) CHO-eNOS-Zellen inkubiert. Die Copräzipitate wurden mittels Immunoblot hinsichtlich der Menge an copräzipitiertem Caveolin-1 (oben) und copräzipitierter eNOS (unten) analysiert.

Bei Verwendung von GST-NOSTRIN konnte sehr deutlich eine Copräzipitation von Caveolin-1 nachgewiesen werden (Abb. 5-17, oben). Hierbei wurden sowohl die  $\alpha$ -Isoform (Aminosäuren 1 – 178), als auch die  $\beta$ -Isoform von Caveolin-1 (Aminosäuren 32 – 178) detektiert. Nach Stimulation der Zellen mit dem Kalziumionophor A23187 blieb die copräzipitierte Caveolin-1-Menge konstant. Weiterhin führte auch die Deletion der SH3-Domäne von NOSTRIN mit oder ohne Stimulation nicht zu einer Veränderung der



copräzipitierte Menge an Caveolin-1. Daraus folgt, dass Caveolin-1 unabhängig von der eNOS an NOSTRIN binden kann.

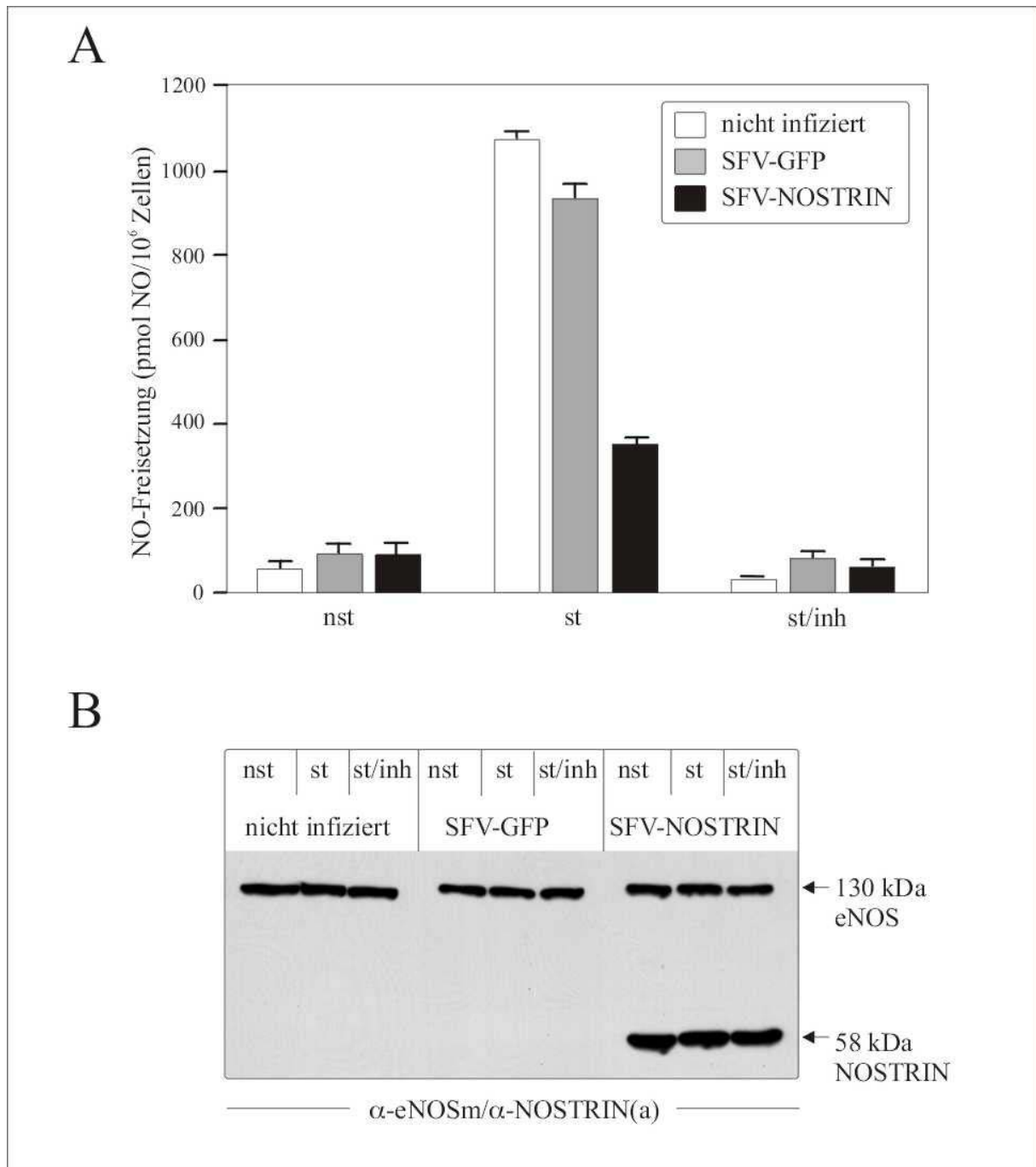
Die Copräzipitation der eNOS mit GST-NOSTRIN war ebenfalls nicht abhängig von einer Stimulation mit Kalziumionophor (Abb. 5-17, unten). Zudem wurde - im Gegensatz zum *in-vitro*-Experiment (Abb.5-12) - durch eine Deletion der eNOS-Bindestelle, der SH3-Domäne von NOSTRIN, die copräzipitierte eNOS-Menge nur geringfügig vermindert. Die eNOS-Bindung an NOSTRIN erfolgte hier offensichtlich indirekt über Caveolin-1. Erst nach Behandlung mit Kalziumionophor, wenn durch die Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM an eNOS die Interaktion zwischen eNOS und Caveolin-1 zerstört ist, wurde eine Copräzipitation der eNOS mit NOSTRIN $\Delta$ SH3 unterbunden.

Zusammenfassend bestätigen diese Ergebnisse die Existenz eines ternären Komplexes bestehend aus NOSTRIN, eNOS und Caveolin-1, wobei die Bindung von Caveolin-1 an NOSTRIN unabhängig von der Interaktion zwischen eNOS und NOSTRIN erfolgte.

## 5.5 Der Einfluss von NOSTRIN auf die eNOS-Aktivität

Schließlich wurde untersucht, ob NOSTRIN neben seinem Effekt auf die eNOS-Lokalisation auch die eNOS-Aktivität beeinflussen kann. CHO-eNOS-Zellen wurden 6 h mit SFV-NOSTRIN infiziert. Als Kontrolle dienten uninfizierte oder mit SFV-GFP infizierte CHO-eNOS-Zellen. Anschließend wurde das Zellkulturmedium gegen Assay-Puffer ausgetauscht und die Zellen ggf. für 90 min mit Kalziumionophor in An- oder Abwesenheit des eNOS-Inhibitors L-NNA stimuliert. Als Maß für die eNOS Aktivität wurde mit Hilfe eines NO-Analysators die Konzentration von Nitrit und gelöstem NO im Assay-Puffer ermittelt.

Wie in Abb. 5-18A gezeigt, gab es unter basalen Bedingungen zwischen infizierten und nicht-infizierten CHO-eNOS-Zellen keine signifikanten Unterschiede bezüglich der eNOS-Aktivität. Nach Applikation des Kalziumionophors A23187 über 90 min stieg in nicht-infizierten Kontrollzellen die NO-Freisetzung um das 17-fache. Die Infektion mit Kontrollvirus (SFV-GFP) führte zu einer Verringerung der stimulierten NO-Freisetzung um 14 % im Vergleich zu den nicht-infizierten Zellen. Dagegen wurde durch die Infektion mit SFV-NOSTRIN die eNOS-Aktivität im Vergleich zur Kontrollinfektion mit SFV-GFP um 62 % herabgesetzt. Eine Vorinkubation mit dem eNOS-Inhibitor L-NNA unterdrückte unabhängig von einer Infektion die durch A23187 induzierte Erhöhung der NO-Freisetzung vollständig. In vier unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen lag die Inhibition der eNOS-Aktivität im Vergleich zum Kontrollvirus zwischen 52 und 66 %.



**Abb. 5-18: Der Einfluss von NOSTRIN auf die eNOS-Aktivität.** Nicht-infizierte, SFV-GFP- und SFV-NOSTRIN-infizierte CHO-eNOS-Zellen wurden nicht stimuliert (nst), für 90 min mit A23187 stimuliert (st) oder für 90 min in Anwesenheit von L-NNA mit A23187 inkubiert (st/inh). A. Die NO-Freisetzung wurde durch Bestimmung der NO-Konzentration im Zellüberstand mit Hilfe eines NO-Analysators detektiert. Für jede Probe erfolgte eine 3-fache Messung, woraus anschließend der Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung berechnet wurde. Das Experiment wurde 4 x unabhängig durchgeführt. B. Anschließend wurden die Zellen lysiert und mittels Immunoblot hinsichtlich der Menge an eNOS bzw. NOSTRIN analysiert.

Ein Grund für diese Schwankungen könnte die unterschiedliche Infektionseffizienz in Abhängigkeit der Virusproduktion und/oder dem Zustand der Zellen sein. Zudem war aus unbekanntem Gründen die absolute NO-Freisetzung pro  $10^6$  nicht-infizierte Zellen an

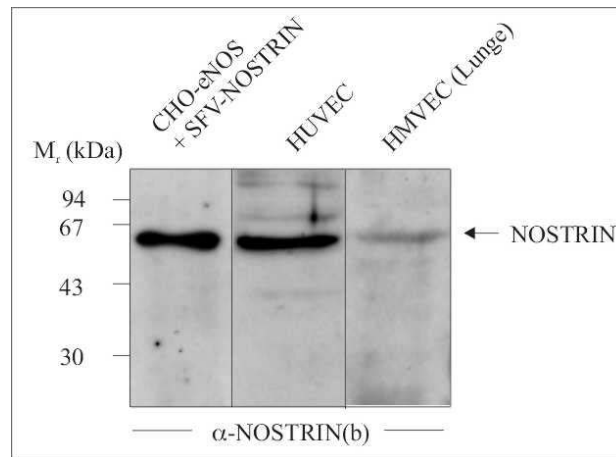
verschieden Tagen unterschiedlich, so dass der Vergleich der relativen NO-Freisetzung innerhalb eines Versuches aussagekräftiger war.

Zur Kontrolle der eNOS- bzw. NOSTRIN-Menge in Abhängigkeit von Infektion und Stimulation wurde die entsprechenden Zelllysate mittels Immunoblot analysiert. Wie in Abb. 5-18B gezeigt, war die eNOS-Menge nach Virusinfektion schwach reduziert, blieb aber beim Vergleich von SFV-NOSTRIN- mit Kontrollvirus-Infektion konstant. Daraus folgt, dass die etwas verringerte eNOS-Aktivität nach Infektion mit dem Kontrollvirus wahrscheinlich auf eine erhöhte Mortalität der Zellen nach Virusinfektion zurückzuführen ist. Hingegen ist die durch NOSTRIN-Expression bewirkte Reduktion der eNOS-Aktivität von 62 % im Vergleich zum Kontrollvirus nicht durch eine Veränderung der eNOS-Menge bedingt.

## **5.6 Das endogene NOSTRIN in Primärzellen des humanen Endothels**

### **5.6.1 Das Vorkommen von NOSTRIN in HUVEC und HMVEC**

Nachdem im Überexpressionssystem ein deutlicher Einfluss von NOSTRIN auf die Lokalisation und die Aktivität der endothelialen NO-Synthase festgestellt werden konnte, sollte nun das Verhalten von endogenem NOSTRIN in einem nativen Umfeld näher untersucht werden. Daher wurde in primären Endothelzellen, welche zur Untersuchung der endothelialen NO-Synthase sehr gut etabliert sind (67), zunächst die Expression von endogenem NOSTRIN analysiert. HUVEC (humane Endothelzellen der Nabelschnurvene) und HMVEC (humane mikrovaskuläre Endothelzellen der Lunge) wurden direkt in SDS-haltigem Probepuffer lysiert. Nach der Durchführung eines Immunoblots unter Verwendung eines NOSTRIN-spezifischen Antikörpers ( $\alpha$ -NOSTRIN(b)) konnte jeweils eine Hauptbande mit der Größe des in CHO-eNOS-Zellen überexprimierten NOSTRINs (ca. 58 kDa) detektiert werden (Abb. 5-19). Weiterhin ist bemerkenswert, dass Versuche, NOSTRIN mittels verschiedener Detergenzien (u.a. Chaps, Octylglycosid, TritonX100) zu lösen, nicht erfolgreich waren (Daten nicht gezeigt), so dass eine Coimmunpräzipitation von NOSTRIN und eNOS aus HUVEC- bzw. HMVEC-Lysaten bisher nicht gelang. Dennoch belegen die Ergebnisse das natürliche Vorkommen von NOSTRIN in humanen Endothelzellen und unterstreichen dessen charakteristische Schwerlöslichkeit, die bereits mit rekombinantem NOSTRIN beobachtet wurde.

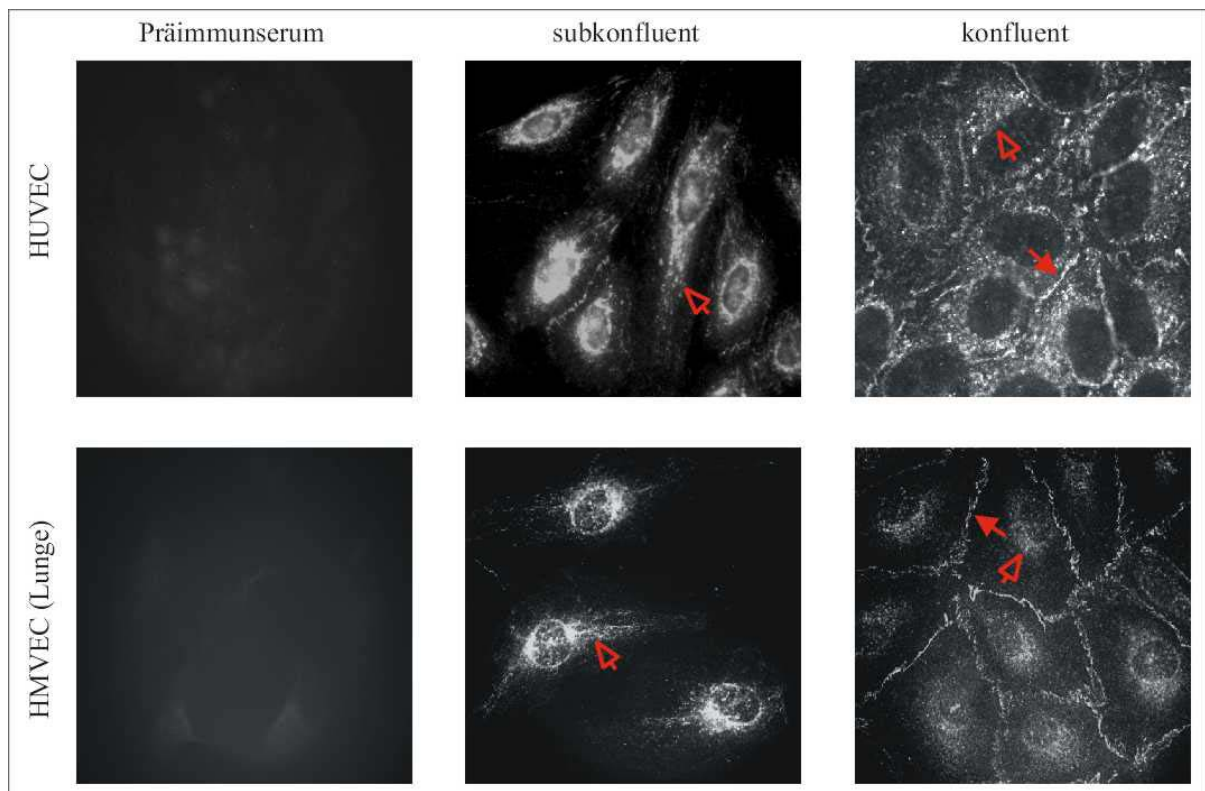


**Abb. 5-19: Expression von endogenem NOSTRIN in Primärzellen des humanen Endothels.**

HUVECs (Spur 2) und HMVECs (Lunge) (Spur 3) wurden in SDS-Probenpuffer lysiert und mittels Immunoblot unter Verwendung von  $\alpha$ -NOSTRIN(b) analysiert. Zum Vergleich ist das Lysat von SFV-NOSTRIN-infizierten CHO-eNOS-Zellen aufgetragen (Spur 1).

### 5.6.2 Die Lokalisation des endogenen NOSTRIN

Zur Untersuchung der natürlichen subzellulären Verteilung von NOSTRIN wurden HUVECs und HMVECs auf Objektträgern fixiert und mit einem NOSTRIN-spezifischen Antikörper ( $\alpha$ -NOSTRIN(c)) und nachfolgend mit einem cy3-gekoppelten Sekundärantikörper gefärbt.



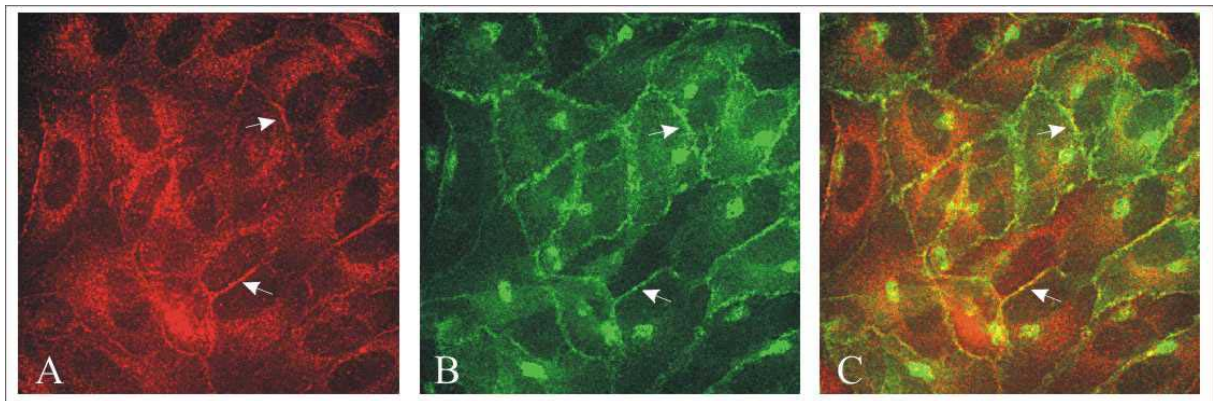
**Abb. 5-20: Die Lokalisation von endogenem NOSTRIN in HUVEC und HMVEC.**

HUVEC (oben) und HMVEC (Lunge) (unten) wurden fixiert und mit  $\alpha$ -NOSTRIN(c) (mitte und rechts) bzw. als Negativkontrolle mit dem korrespondierenden Präimmunserum (links) gefärbt. In subkonfluenten Zellen (mitte) und konfluenten Zellen (rechts) ist eine charakteristische vesikelartige NOSTRIN-Färbung im Cytoplasma zu beobachten (offene Pfeile). Im konfluenten Zustand ist darüberhinaus eine deutliche Färbung der Zell-Zell-Kontakte sichtbar (gefüllte Pfeile).

Die Spezifität der NOSTRIN-Färbung konnte durch die Verwendung des Präimmunsersums belegt werden (Abb. 5-20, links). NOSTRIN zeigt sowohl in makrovaskulären Endothelzellen (HUVEC, Abb. 5-20, oben) als auch in mikrovaskulären Endothelzellen (HMVEC, Abb. 5-20, unten) ein ähnliches Verteilungsmuster: Befinden sich die Endothelzellen im subkonfluenten Zustand (Abb. 5-20, mitte) wird eine NOSTRIN-spezifische Anfärbung vesikelartiger cytoplasmatischer Strukturen beobachtet. Dieses Bild entspricht weitgehend dem Muster der NOSTRIN-Lokalisation nach Überexpression in CHO-eNOS-Zellen (siehe Kap. 5.4). Zudem ist eine Anreicherung von NOSTRIN an Vesikel im perinukleären Raum zu beobachten sowie eine Lokalisation an fibrösen Strukturen, welche scheinbar zur Zellperipherie weisen und mit dem Cytoskelett assoziiert sein könnten. Erreichen die Endothelzellen den physiologisch wichtigen konfluenten Zustand, ist NOSTRIN neben der charakteristischen vesikelartigen Verteilung an der Plasmamembran bzw. an Zell-Zell-Kontakten zu finden (Abb. 5-20, rechts).

### 5.6.3 Die Colokalisation von NOSTRIN und eNOS in HUVEC

Aufgrund der bisherigen Ergebnisse war nun von besonderem Interesse, ob bzw. unter welchen Bedingungen eine Interaktion zwischen endogenem NOSTRIN und eNOS in humanen Primärendothelzellen stattfinden kann. Daher wurden HUVECs mit NOSTRIN- und eNOS-spezifischen Antikörpern sowie den entsprechenden Fluorophor-gekoppelten Sekundärantikörpern doppelt gefärbt (Abb. 5-21A,B).



**Abb. 5-21: Colokalisation von NOSTRIN und eNOS in HUVEC**

HUVECs der 0. Passage wurden mit eiskaltem Methanol fixiert und anschließend mit  $\alpha$ -NOSTRIN(c)/cy3-gekoppeltem Sekundärantikörper und  $\alpha$ -eNOS/cy2-gekoppeltem Sekundärantikörper doppelt gefärbt. Der gleiche Bildausschnitt wurde mit den entsprechenden Filtern für cy3 (A) bzw. cy2 (B) aufgenommen. Pfeile markieren die Colokalisation von NOSTRIN und eNOS an den Zell-Zell-Kontakten bzw. der Plasmamembran, welche in der Überlagerung (C) der Aufnahmen A und B gelb erscheint.

Eine Überlagerung der Immunfluoreszenzaufnahmen mit NOSTRIN- und eNOS-Färbung (Abb. 5-21C) zeigt im Cytoplasma keine und in der perinukleären Region nur eine partielle Colokalisation. Sehr deutlich erkennbar ist hingegen eine Colokalisation von NOSTRIN und eNOS an der Plasmamembran bzw. Zell-Zell-Kontakten der konfluenten Endothelzellschicht.

Diese Ergebnisse legen nahe, dass eine Interaktion zwischen NOSTRIN und eNOS auch unter physiologischen Bedingungen vorkommt.

## 6 Diskussion und Ausblick

### 6.1 NOSTRIN - ein neues humanes Protein

Mit dem (offiziellen) Abschluß des weltweit organisierten humanen Genomprojektes gelang die Identifizierung und Kartierung aller menschlichen Gene, deren Gesamtzahl heute auf etwa 30.000 bis 40.000 geschätzt wird (68, 69). Während aber die Dekodierung von Nukleinsäuresequenzen ein hoch automatisierter Prozess ist, stellt die Identifizierung jedes neuen Proteins und vor allem dessen Charakterisierung noch immer ein vergleichsweise individuelles Problem dar. Hierbei können mit „large scale“-Ansätzen wichtige Informationen beispielsweise über die vielfältigen Interaktionen innerhalb von Multienzymkomplexen erhalten werden (70, 71). Dies kann jedoch im Einzelfall eine differenzierte Detektivarbeit zur Erforschung der speziellen Eigenschaften und der Funktion unbekannter Proteine nicht ersetzen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde NOSTRIN, ein neues humanes Protein, identifiziert und charakterisiert. Hierbei konnte gezeigt werden, dass NOSTRIN die subzelluläre Verteilung sowie die Aktivität der endothelialen NO-Synthase moduliert.

#### 6.1.1 Die Identifizierung von NOSTRIN

Als Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit diente ein unbenannter cDNA-Klon, der mit Hilfe des Y2H-Systems unter Verwendung einer cDNA-Bibliothek aus humaner Plazenta als Bindungspartner der endothelialen NO-Synthase identifiziert worden war. Da jedoch bei der Herstellung von cDNA-Bibliotheken häufig cDNA-Fragmente resultieren, ergab sich zunächst die grundlegende Aufgabe, den potentiellen eNOS-Interaktionspartner in voller Länge zu klonieren. Während das 3'-Ende des cDNA-Klons bereits durch eine PolyA-Sequenz definiert war, wurde das 5'-Ende mit Hilfe einer 5'-RACE unter Verwendung von menschlicher Plazenta-cDNA als Matrize vervollständigt. Somit gelang die Identifizierung eines neuen 58 kDa großen Proteins mit einem offenen Leserahmen von 506 Aminosäuren bzw. 1518 bp, das als NOSTRIN, eNOS traffic inducer, bezeichnet wurde.

Desweiteren wurden im Rahmen von Datenbankrecherchen ein cDNA-Klon mit der kompletten NOSTRIN-Sequenz sowie weitere 5'-terminale ESTs mit übereinstimmender Startsequenz gefunden. Ein weiterer Beleg für die Vollständigkeit der NOSTRIN-cDNA ist die Tatsache, dass dem 5'-untranslatierten Bereich der NOSTRIN-Sequenz im humanen Genom ein Stopp-Kodon vorgeschaltet ist.

Da aus der 5'-RACE eine einzige cDNA-Population erhalten wurde, muss davon ausgegangen werden, dass zumindest in der Plazenta keine N-terminalen Spleißvarianten von NOSTRIN vorkommen. Die Existenz einer kürzlich mit einem bioinformatischen Verfahren

vorhergesagten Variante von NOSTRIN (hypothetisches Protein MGC20702), dessen N-Terminus um 78 Aminosäuren verkürzt ist, konnte bisher nicht experimentell bestätigt werden. Weiterhin wurde mit Hilfe eines Northern Blots nur eine Bande der NOSTRIN-mRNA auf der erwarteten Höhe von zirka 1,7 kb detektiert (63). Daher ist das Vorkommen weiterer Spleißvarianten von NOSTRIN unwahrscheinlich.

### 6.1.2 Die Expression von NOSTRIN

Als wichtiger Hinweis auf die Bedeutung bzw. Funktion eines Proteins gilt die Konservierung der DNA-Sequenz innerhalb verschiedener Spezies bzw. das Expressionsmuster in unterschiedlichen Geweben. Einige Beobachtungen deuten darauf hin, dass neben dem Menschen weitere Säugetiere ein hoch konserviertes NOSTRIN-homologes Protein exprimieren. Zum Beispiel wurde durch PCR mit NOSTRIN-spezifischen Primern aus cDNA von BAECs (Aortenendothelzellen des Rindes) ein 700 bp großes Fragment amplifiziert, das im Vergleich zum humanen NOSTRIN eine Identität von 89 % aufweist (Daten nicht gezeigt). Darüber hinaus wurden mittels Datenbankrecherchen zahlreiche ESTs aus Maus-, Ratte-, Rind- und Schweingeweben gefunden, welche mit der NOSTRIN-Sequenz ebenfalls zwischen 82 – 89 % identisch sind. Vor allem die Tatsache, dass mit einem Antikörper gegen das humane NOSTRIN spezifisch ein Protein mit der gleichen Größe in verschiedenen Mausgeweben detektiert werden konnte, zeigt die Existenz eines gut konservierten NOSTRIN-homologen Proteins in der Maus. Hingegen wurden in Spezies wie *Drosophila*, *A.thaliana* oder *C.elegans* bisher keine Hinweise auf NOSTRIN-homologe Proteine gefunden. Durch die fortschreitende Sequenzierung der Genome dieser Spezies ist zu erwarten, dass in naher Zukunft die benötigten Informationen zugänglich sein werden.

Die Studien zur Untersuchung der Gewebeverteilung zeigten ein differenziertes Expressionsmuster von NOSTRIN. Die Analyse der mRNA-Verteilung mittels Northern Blotting impliziert eine Expression von NOSTRIN in stark vaskularisierten Geweben: Während in Herz, Lunge, Niere und Plazenta die größten Vorkommen an NOSTRIN-mRNA detektiert wurden, war diese z.B. in Leukozyten nicht nachweisbar (63, 72). In den analysierten Mausgeweben wurde ein weitverbreitetes Vorkommen von NOSTRIN beobachtet, wobei ebenfalls in stark vaskularisierten Organen, wie z.B. im Herz, eine starke Proteinexpression detektiert wurde. Das Vorkommen von NOSTRIN in den Endothelzellen von Blutgefäßen konnte tatsächlich durch Immunofluoreszenzfärbungen von Schnitten des menschlichen Herzens belegt werden (72). Diese zeigten im Vergleich zu angrenzenden Fibroblasten und Thrombozyten eine spezifische Anfärbung der Endothelzellen von Gefäßwänden. Unter Verwendung von menschlichen Primärzellen konnte schließlich mittels Immunoblotting und Immunofluoreszenzmikroskopie gezeigt werden, dass NOSTRIN sowohl



in mikrovaskulären (HMVEC) als auch in makrovaskulären (HUVEC) Endothelzellen exprimiert wird.

Insgesamt ist zu beachten, dass eine mögliche Regulation der Expression innerhalb der durchgeführten Studien nicht berücksichtigt wurde. Wie bereits beschrieben, befindet sich die eNOS hauptsächlich in Endothelzellen und darüber hinaus in geringerem Ausmaß in Kardiomyozyten sowie in Blutplättchen (9). Mit einer Coexpression von NOSTRIN in vaskulären Endothelzellen ist daher die Grundvoraussetzung für eine physiologisch relevante Interaktion zwischen eNOS und NOSTRIN erfüllt.

### 6.1.3 Die Struktur von NOSTRIN

Zur Charakterisierung eines neuen Proteins kann die theoretische Vorhersage von strukturellen Domänen, deren Funktion in anderen Proteinen beschrieben ist, wertvolle Hinweise auf mögliche Bindungspartner oder enzymatische Aktivitäten geben (73).

Für NOSTRIN ergab ein Sequenzvergleich mit bekannten Proteinmotiven die Vorhersage einer N-terminalen Cdc15-Domäne sowie einer C-terminalen SH3-Domäne. Während SH3-Domänen als Bindungsmotiv für Prolin-reiche Aminosäureregionen bei einer Vielzahl von Signalproteinen eine Adapterfunktion übernehmen (74), ist das Vorkommen von Proteinen mit einer Cdc15-Domäne eher selten. Zudem ist die Funktion der Cdc15-Domäne, die zuerst als N-Terminus des *S.pombe*-Proteins Cdc15 beschrieben wurde (75), derzeit nicht bekannt. Es wird jedoch vermutet, dass sie eine Assoziation an Aktin-reiche bzw. cytoskelettale Strukturen vermittelt (58).

Besonders interessant ist die Tatsache, dass NOSTRIN mit diesem modularen Aufbau der Familie der sogenannten PCH-Proteine (Pombe-Cdc15-Homologie) zugeordnet werden kann (58). Zu den Mitgliedern dieser Familie zählen u.a. die Proteine PSTPIP (59) und PACSIN1 (61), welche sich hinsichtlich der Aminosäuresequenzen als die nächsten Verwandten von NOSTRIN erwiesen. Ihnen ist gemein, dass sie an dynamischen Prozessen der Endozytose und des Cytoskeletts beteiligt sind und dafür via SH3-Domäne verschiedene Proteine, wie z.B. WASP oder Dynamin, rekrutieren.

Nach den bisherigen Ergebnissen liegt die Vermutung nahe, dass auch die Cdc15-Domäne von NOSTRIN eine Assoziation an Strukturen des Cytoskeletts vermittelt. In NOSTRIN-infizierten CHO-eNOS-Zellen führte die Inkubation mit Cytochalasin D, das die Polymerisation von  $\alpha$ -Aktin inhibiert, zu einer Umverteilung der NOSTRIN-haltigen Vesikel vom Cytoplasma an die Zellperipherie. Hingegen konnte eine Behandlung mit Colchicin, das das Netzwerk der Mikrotubuli zerstört, die Lokalisation von NOSTRIN nicht signifikant beeinflussen (Daten nicht gezeigt). Eine cytoskelettale Verankerung über die Cdc15-Domäne böte gleichzeitig eine Erklärung für die relativ schlechte Löslichkeit von überexprimiertem und endogenem NOSTRIN, sogar in SDS-haltigen Pufferlösungen. Im Vergleich zum

vollständigen Protein war nach Deletion der Cdc15-Domäne die Löslichkeit deutlich verbessert (Daten nicht gezeigt). Zumindest spielt die Cdc15-Domäne von NOSTRIN eine wichtige Rolle für die Lokalisation, da bei Expression von NOSTRIN $\Delta$ Cdc15 die für NOSTRIN typische vesikelartige Verteilung nicht mehr beobachtet wurde. In diesem Zusammenhang erscheint auch die Vorhersage einer schwach konservierten RhoA-bindenden Domäne im Bereich der Aminosäuren 301 – 366 von NOSTRIN interessant. Jedoch konnte eine Interaktion zwischen NOSTRIN und der kleinen GTPase RhoA, die maßgeblich an der Regulation des Cytoskeletts beteiligt ist (76), bisher nicht experimentell belegt werden.

## 6.2 NOSTRIN - ein neuer Interaktionspartner der eNOS

Die endotheliale NO-Synthase wird als Schlüsselenzym im kardiovaskulären System in vielerlei Hinsicht streng reguliert. Neben posttranslationalen Modifikationen spielen vor allem Protein-Protein-Interaktionen eine große Rolle (6, 21, 22). Mit Hilfe des Y2H-Systems wurde das N-terminal verkürzte NOSTRIN (NOSTRIN<sub>AS241-506</sub>) als potentieller eNOS-Interaktionspartner identifiziert. In der vorliegenden Arbeit konnte verifiziert werden, dass die in der Hefe gefundene Bindung zwischen eNOS und NOSTRIN tatsächlich in Säugerzellen stattfindet. Zunächst wurde die Interaktion zwischen eNOS und dem vollständigen NOSTRIN durch wechselseitige Coimmunpräzipitation aus Lysaten NOSTRIN-transfizierter CHO-eNOS-Zellen bestätigt. Um die Möglichkeit auszuschliessen, dass ein Adapterprotein die Interaktion zwischen eNOS und NOSTRIN vermittelt, wurde ein „GST-Pulldown“-Experiment mit dem aufgereinigten GST-NOSTRIN durchgeführt. Hierbei konnte durch die Copräzipitation der *in vitro* translatierten eNOS gezeigt werden, dass zwischen eNOS und NOSTRIN eine direkte Interaktion stattfindet. Diese Interaktion wurde offensichtlich über die SH3-Domäne von NOSTRIN vermittelt, da dessen Deletion die Copräzipitation der eNOS verhinderte. Zudem zeigten Kartierungs-Studien mit Hilfe des Y2H-Systems, dass die SH3-Domäne (NOSTRIN<sub>AS433-506</sub>) ausreichend für eine NOSTRIN-eNOS-Interaktion war (72).

Die NOSTRIN-Bindestelle der eNOS konnte durch Analyse der entsprechenden Konstrukte im Y2H-System auf den Bereich der Aminosäuren 98-366 eingengt werden (77). Diese Region schließt die Caveolin-1-Bindestelle der eNOS ein und enthält eine Prolin-reiche Sequenz als potentielles SH3-Bindungsmotiv. Der experimentelle Beweis, dass die SH3-Domäne von NOSTRIN tatsächlich diese Sequenz bindet, muss jedoch noch erbracht werden. Da in den Copräzipitationsexperimenten die korrekte Kompartimentierung außer Acht gelassen wurde, erfolgte mit Hilfe der Immunfluoreszenzmikroskopie die Untersuchung der subzellulären Verteilung von NOSTRIN und eNOS in NOSTRIN-infizierten CHO-eNOS-Zellen. Mit der Colokalisation der beiden Proteine in vesikelartigen Strukturen ist eine

weitere Voraussetzung für eine *in-vivo*-Interaktion zwischen eNOS und NOSTRIN erfüllt. Darüber hinaus konnte bestätigt werden, dass die SH3-Domäne von NOSTRIN die eNOS-Bindestelle darstellt, denn die Deletion der Aminosäuren 441-506 von NOSTRIN verhinderte eine Colokalisation mit der eNOS. Schließlich impliziert eine partielle Colokalisation von endogenem NOSTRIN bzw. eNOS in unstimulierten HUVECs, dass auch unter physiologischen Bedingungen eine Interaktion zwischen den beiden Proteinen stattfinden kann.

### 6.3 NOSTRIN- ein Modulator der subzellulären Verteilung der eNOS

Ein von Thomas Michel vorgeschlagenes Modell (6) postuliert einen Signaltransduktionszyklus der eNOS, wonach diese sich stimulus-induziert zwischen der Plasmamembran und intrazellulären Kompartimenten bewegt. Tatsächlich wurde die eNOS neben ihrer typischen Lokalisation an der Plasmamembran und am Golgi-Apparat bereits in zahlreichen weiteren Kompartimenten, wie z.B. im Zellkern, am Cytoskelett oder in vesikelartigen Strukturen, detektiert (13). Über die molekularen Mechanismen der (Trans-)Lokalisation ist jedoch bisher wenig bekannt. Einige Autoren konnten zeigen, dass die cotranslationale Myristylierung und posttranslationale Palmytylierung für die Membranverankerung der eNOS an den Caveolae der Plasmamembran bzw. am Golgi-Apparat notwendig sind (30, 78). Darüber hinaus wurde kürzlich ein eNOS-interagierendes Protein, NOSIP, beschrieben, welches nach Überexpression eine Translokation der eNOS von der Plasmamembran an Strukturen des Golgi-Apparates bewirkt (41).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass durch Überexpression von NOSTRIN die eNOS-Lokalisation deutlich verändert wird. Nach der Infektion von CHO-eNOS-Zellen mit SFV-NOSTRIN wurde mittels Immunofluoreszenzmikroskopie eine charakteristische vesikelartige Verteilung von NOSTRIN beobachtet. In diesen NOSTRIN-infizierten Zellen kam es zu einer Translokation der eNOS von Plasmamembran und Golgi-Apparat zu den cytoplasmatischen NOSTRIN-haltigen Strukturen. Die NOSTRIN/eNOS-Komplexe sind hierbei an das Cytoskelett assoziiert, denn eine Inhibition der Aktin-Polymerisation durch Behandlung mit Cytochalasin D führte zu einer Umverteilung der NOSTRIN/eNOS-Komplexe vom Cytoplasma an die Zellperipherie. Ausschlaggebend für die Lokalisation von NOSTRIN sowie die Induktion der eNOS-Translokation war das Vorhandensein der N-terminalen Cdc15-Domäne von NOSTRIN. Die Infektion von NOSTRIN $\Delta$ Cdc15 bewirkte keine Veränderung der eNOS-Verteilung, sondern vielmehr die Colokalisation von NOSTRIN $\Delta$ Cdc15 mit der eNOS an der Plasmamembran sowie am Golgi-Apparat.

Im Gegensatz zu den Beobachtungen in CHO-eNOS-Zellen, die NOSTRIN rekombinant exprimieren wurde in HUVECs unter nicht-stimulierten Bedingungen an den cytoplasmatischen NOSTRIN-haltigen Vesikeln keine eNOS-Immunfärbung detektiert und in

der perinukleären Region wurde nur eine partielle Colokalisation beobachtet. Eine deutliche Colokalisation von NOSTRIN und eNOS zeigte sich jedoch an der Plasmamembran bzw. an Zell-Zell-Kontakten konfluenter HUVECs. Die Tatsache, dass überexprimiertes NOSTRIN nie an der Plasmamembran von CHO-eNOS-Zellen beobachtet wurde, könnte auf die massive Expression von NOSTRIN zurückzuführen sein, welche dynamische Prozesse nicht mehr erlaubt; alternativ könnte sie durch das Fehlen endothelspezifischer Ankerproteine bzw. durch den unterschiedlichen Charakter von Zellkontakten in CHO-Zellen begründet sein.

Zusammenfassend lassen die bisherigen Ergebnisse vermuten, dass NOSTRIN als Carrier der eNOS zwischen Plasmamembran und der perinukleären Region fungieren kann. Jedoch ist ebenfalls denkbar, dass NOSTRIN der Verankerung in dem beschriebenen Kompartiment dient und aufgrund seiner Überexpression in den CHO-eNOS-Zellen eine Umverteilung der eNOS erzwungen wird. Desweiteren stellt sich die Frage, ob die Bildung bzw. die Translokation des eNOS/NOSTRIN-Komplexes durch 1) Stimuli der eNOS, 2) eNOS-unabhängige Stimuli und/oder 3) die Expression von NOSTRIN reguliert wird. Vorläufige Versuche, die Lokalisation des NOSTRIN/eNOS-Komplexes in NOSTRIN-infizierten CHO-eNOS-Zellen durch die Stimulation mit Kalziumionophor zu beeinflussen, waren nicht erfolgreich (Daten nicht gezeigt). Desweiteren verändert die Stimulation von HMVECs mit Bradykinin bzw. VEGF die Lokalisation von NOSTRIN nicht (Daten nicht gezeigt). Sowohl in HUVECs als auch in HMVECs wurde ein Einfluß der Zellkonfluenz auf die Verteilung von NOSTRIN beobachtet. In subkonfluenten Endothelzellen war NOSTRIN ausschließlich in cytoplasmatischen Vesikeln lokalisiert, wohingegen in konfluenten Zellen eine teilweise Translokation zur Plasmamembran bzw. Zell-Zell-Kontakten stattgefunden hatte. Interessanterweise beschreiben Govers et al. (79), dass eNOS in subkonfluenten mikrovaskulären Endothelzellen der Maus im perinukleären Raum lokalisiert und nach Erreichen der Zellkonfluenz in TritonX100-unlöslichen Zell-Zell-Kontakten angereichert ist. Zudem berichteten mehrere Forschergruppen (79-81), dass die Aktivität von eNOS durch die Zellkonfluenz beeinflusst wird. Es kann daher vermutet werden, dass NOSTRIN eine wichtige Rolle bei dieser Zellkontakt-abhängigen Translokation spielt, deren molekularer Mechanismus und physiologische Bedeutung bisher unbekannt sind.

#### **6.4 NOSTRIN - ein Modulator der eNOS-Aktivität**

Die Interaktion der eNOS mit anderen Proteinen, wie z.B. Caveolin-1 oder Hsp 90, ist häufig von einer Veränderung der eNOS-Aktivität begleitet (36, 38). Daher stellte sich die Frage, ob neben der NOSTRIN-induzierten subzellulären Umverteilung der eNOS auch die eNOS-Aktivität beeinflusst wird. Im Vergleich zu Kontrollvirus-infizierten CHO-eNOS-Zellen führte die Infektion mit SFV-NOSTRIN zu einer deutlichen Reduktion der Kalziumionophor-

induzierten NO-Freisetzung um 62 %. Hierbei konnte ausgeschlossen werden, dass die verringerte NO-Freisetzung auf eine Veränderung der eNOS-Menge zurückzuführen ist.

Prinzipiell sind daher drei Mechanismen der eNOS-Inhibition durch NOSTRIN denkbar: 1) eine direkte Inhibition der eNOS-Aktivität, 2) eine Veränderung der subzellulären Verteilung der eNOS und 3) die Modulation anderer Regulationsmechanismen, wie Phosphorylierung oder Protein-Protein-Interaktionen. Ein direkter Effekt auf die enzymatische Aktivität der eNOS wird, z.B. durch Interaktion mit dem  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM-Komplex, vermittelt. Hierbei führt die Bindung zu einer Konformationsänderung der eNOS, wodurch der Elektronenfluss zwischen der Reduktase- und der Oxygenasedomäne und somit die NO-Synthese ermöglicht wird. Die Möglichkeit einer allosterischen Inhibition der eNOS-Aktivität durch NOSTRIN kann bisher nicht ausgeschlossen werden. Hierfür ist es notwendig, mit den isolierten Bindungspartnern *in vitro* einen eNOS-Aktivitätsassay durchzuführen.

Ungeachtet dessen liegt die Vermutung nahe, dass die NOSTRIN-induzierte Veränderung der intrazellulären Lokalisation eine wichtige Rolle bei der Verringerung der eNOS-Aktivität spielt. Wie Studien an Myristylierungs-defizienten eNOS-Mutanten beweisen, ist die korrekte Lokalisation der eNOS an der Plasmamembran bzw. am Golgi-Apparat eine Voraussetzung für die eNOS-Aktivierung (82, 83). Die Autoren konnten zeigen, dass nach Expression der nicht-acylierten eNOS die NO-Synthese „*in lyso*“ nicht beeinträchtigt war, jedoch die Kalziumionophor-induzierte eNOS-Aktivität in intakten Zellen inhibiert wurde. Der Mechanismus, mit dem die eNOS-Lokalisation die NO-Synthase-Aktivität beeinflusst, ist derzeit unbekannt. Möglicherweise spielt hierbei die räumliche Nähe zu Cofaktoren und Substraten oder aber zu weiteren regulatorischen Proteinen eine zentrale Rolle (22). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass eine Myristylierungs-defiziente und somit „falsch“ lokalisierte bovine eNOS für die Phosphorylierung an S1179 (entsprechend dem S1177 der humanen eNOS) nicht mehr zugänglich ist (45). Daher ergibt sich die Frage, ob durch die NOSTRIN-abhängige Translokation der eNOS beispielsweise die Bindung von Hsp90 an eNOS und somit die PKB-abhängige und aktivierende Phosphorylierung an S1177 (39) beeinflusst werden kann.

Ein wichtiger Inhibitor der eNOS ist Caveolin-1, dessen Bindung durch die kompetitive Verdrängung des  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM-Komplexes zu einer Inaktivierung der eNOS führt (36, 84). Andere Autoren konnten zeigen, dass die eNOS-Caveolin-1-Interaktion Zelltyp-abhängig durch einen bisher unbekanntem Mechanismus reguliert wird (46). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde mittels Koloalokalisation sowie Copräzipitation belegt, dass NOSTRIN gemeinsam mit eNOS und Caveolin-1 einen ternären Komplex bildet. Dieser Komplex bleibt auch nach Stimulation mit Kalziumionophor erhalten. Der beobachtete inhibitorische Effekt von NOSTRIN auf die stimulierte eNOS-Aktivität könnte also auf eine Verstärkung der inhibitorischen Wechselwirkung zwischen eNOS und Caveolin-1 und damit

auf eine erschwerte Bindung von  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  zurückzuführen sein. Da eNOS und Caveolin-1 unabhängig voneinander an NOSTRIN binden, kann nicht ausgeschlossen werden, dass in dem ternären Komplex durch  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  die Bindung von Caveolin-1 an eNOS verdrängt wird. Jedoch könnte durch die räumliche Nähe im Komplex mit NOSTRIN die Interaktion zwischen eNOS und Caveolin-1 kinetisch begünstigt sein. Die Interaktion zwischen eNOS und Caveolin-1 beeinflusst *in vivo* hauptsächlich die basale NO-Freisetzung (47-49). Dieser Effekt konnte jedoch mit der hier verwendeten Methode nicht detektiert werden. Um verlässlich zu klären, ob NOSTRIN die eNOS-Aktivität tatsächlich durch die Modulation der Interaktion von eNOS und Caveolin-1 inhibiert, könnte beispielsweise ein eNOS-Aktivitätsassay mit Caveolin-1-Knockout-Zellen, welche eNOS und NOSTRIN exprimieren, durchgeführt werden.

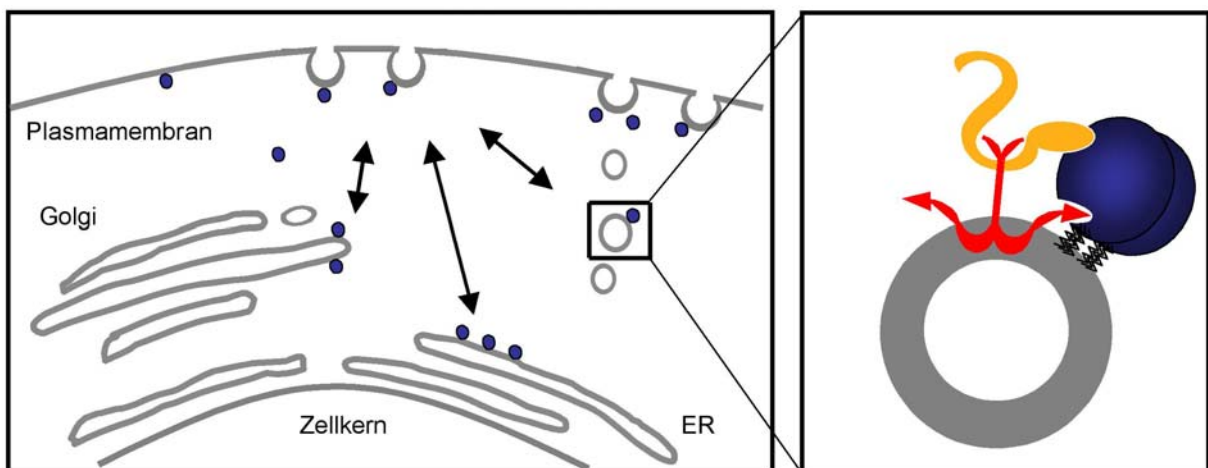
### 6.5 NOSTRIN, eNOS und Caveolin-1 – ein ternärer Komplex

Die physiologische Bedeutung der Interaktion zwischen eNOS und Caveolin-1 wurde durch Studien bestätigt, welche zeigen, dass in Caveolin-1-Knockout-Mäusen die basale NO-Freisetzung um ca. 30 % erhöht ist (48). Zudem führte die Inkubation eines zellpermeablen Peptids, das der Gerüstdomäne („scaffolding domain“) und somit der eNOS-Bindestelle von Caveolin-1 entspricht, zu einer Blockierung der Acetylcholin-induzierten Relaxation der Blutgefäße (47). Die Interaktion zwischen eNOS und Caveolin-1 wird durch die Bindung der Gerüstdomäne von Caveolin-1 (AS 82 – 101) an das der Konsensussequenz entsprechende Bindungsmotiv im Bereich der AS 350 – 358 von eNOS vermittelt (36, 84). Ob jedoch unter basalen Bedingungen eine stöchiometrische Bindung der eNOS an Caveolin-1 stattfindet, ist Gegenstand kontroverser Diskussionen (37, 43, 45, 46). Immunfluoreszenzaufnahmen doppelt markierter CHO-eNOS-Zellen und EA.hy926-Zellen (Daten nicht gezeigt), aber auch in BAECs und anderen Zellsystemen zeigen häufig nur eine partielle Colokalisation von eNOS und Caveolin-1 (45, 46).

In der vorliegenden Arbeit wurde belegt, dass durch die direkte und unabhängige Bindung von NOSTRIN sowohl an die eNOS als auch an Caveolin-1 ein ternärer Komplex gebildet werden kann. Hierbei bindet die eNOS – wie bereits besprochen – direkt an die SH3-Domäne von NOSTRIN. Die eNOS-unabhängige Interaktion zwischen NOSTRIN und Caveolin-1 konnte durch die Copräzipitation von Caveolin-1 mit der SH3-Deletionsmutante von NOSTRIN gezeigt werden. Zudem bestätigen Y2H-Studien eine direkte Bindung zwischen NOSTRIN und Caveolin-1 (77). Gleichzeitig konnte einerseits die Caveolin-1-Bindestelle von NOSTRIN auf den Bereich der Aminosäuren 323 - 433 eingengt werden. Andererseits wurde die Gerüstdomäne von Caveolin-1 als NOSTRIN-Bindestelle ausgeschlossen (77). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass in NOSTRIN-infizierten CHO-eNOS-Zellen dieser ternäre Komplex in cytoplasmatischen vesikelartigen Strukturen lokalisiert ist.

Experimente anderer Autoren beweisen, dass die Internalisierung von Caveolin-1 durch Behandlung mit Cytochalasin D unterbunden und ein Verbleiben an der Plasmamembran induziert wird (65, 85). Da dies auch für den ternären Komplex beobachtet wurde, ist der Komplex vermutlich an intrazellulären Caveolin-1-haltigen Vesikeln lokalisiert. Allerdings erscheinen die NOSTRIN/eNOS/Caveolin-1-haltigen Strukturen im Vergleich zu den lediglich Caveolin-1-haltigen Vesikeln größer und eher perinukleär lokalisiert. Unklar ist bisher, ob und wie die Bildung dieses ternären Komplexes reguliert wird. Die Stimulation der CHO-eNOS-Zellen mit Kalziumionophor führte nicht zu einer Veränderung der mit NOSTRIN copräzipitierten Menge an eNOS bzw. Caveolin-1.

Natürlich können die hier beschriebenen Ergebnisse nur vorläufig interpretiert werden, da die Mehrzahl der Beobachtungen nach Überexpression von NOSTRIN in CHO-eNOS-Zellen erhalten wurde. Zum einen könnte die Überexpression von NOSTRIN einen möglichen dynamischen Transport zwischen unterschiedlichen Kompartimenten „einfrieren“. Zum anderen zeigen die Studien an primären Endothelzellen, dass die Lokalisation von NOSTRIN durch Endothelium-relevante Vorgänge (Zellkonfluenz) beeinflusst werden kann, welche in CHO-Zellen nicht simuliert werden können. Besonders interessant und wichtig ist es daher, zu untersuchen, unter welchen Bedingungen die Bildung des ternären Komplexes eNOS/Caveolin-1/NOSTRIN in primären Endothelzellen stattfindet. Unter Einbezug der diskutierten Sachverhalte soll hier das folgende Modell vorgeschlagen werden, welches NOSTRIN als „molekulare Klammer“ und Carrier von eNOS und Caveolin-1 beschreibt (Abb. 6-1): Die Expression von NOSTRIN induziert die Bildung eines ternären Komplexes bestehend aus NOSTRIN, eNOS sowie Caveolin-1. Gleichzeitig erfolgt über einen unbekanntem Mechanismus die Translokation der eNOS an die intrazellulären Caveolin-1-haltigen Vesikel. Aufgrund der subzellulären Umverteilung und/oder einer verstärkten Bindung an Caveolin-1 wird die eNOS-Aktivität drastisch reduziert. Darüber hinaus könnte NOSTRIN zusätzlich als Adapter für weitere Signalproteine, wie z.B. RhoA, fungieren.



**Abb. 6-1: Modell, das NOSTRIN (gelb) als „molekulare Klammer“ von eNOS (blau) und Caveolin-1 (rot) darstellt.**

## 6.6 NOSTRIN - Physiologische Bedeutung und Ausblick

In Abhängigkeit der spezifischen mechanochemischen Umgebung bzw. der Funktion des jeweiligen endothelialen Kompartiments - Arterie, Vene oder Kapillare - wird die endotheliale NO-Synthase hinsichtlich ihrer Aktivität und subzellulären Verteilung differentiell reguliert (43, 44). Während die eNOS in arteriellen Endothelzellen vorwiegend an der Plasmamembran lokalisiert ist, zeigt eine immunohistologische Färbung von endokardialen oder Kapillar-Endothelzellen eine cytoplasmatische Lokalisation der eNOS am Golgi-Apparat bzw. an cytoskelettalen Strukturen (72). Die physiologische Bedeutung der Interaktion zwischen eNOS und Caveolin-1 wurde bereits mehrfach bestätigt (47, 48). Jedoch unterliegt der Anteil der beobachteten Kolo-kalisation von eNOS und Caveolin-1 in Abhängigkeit vom Endothelzelltyp starken Schwankungen (43). NOSTRIN könnte daher als Modulator der intrazellulären eNOS-Lokalisation sowie der Interaktion zwischen eNOS und Caveolin-1 unter physiologischen Bedingungen eine wichtige Rolle spielen. Immunofluoreszenzfärbungen von Schnitten des menschlichen Herzens zeigen, dass NOSTRIN in den Endothelzellen von Blutgefäßen exprimiert wird (72). In Studien an humanen Primärzellen konnte zwar bisher kein Unterschied der NOSTRIN-Lokalisation in mikrovaskulären gegenüber makrovaskulären Endothelzellen festgestellt werden, jedoch könnten schon relative Expressionsunterschiede die Komplexbildung von eNOS, Caveolin-1 und NOSTRIN beeinflussen.

Bereits heute zeichnet sich ab, dass das Vorkommen von NOSTRIN nicht streng auf eNOS-exprimierende Gewebe begrenzt ist. Zum Beispiel wurde NOSTRIN-mRNA in Geweben aus Dünndarm und Speicheldrüse nachgewiesen (77). Möglicherweise handelt es sich bei NOSTRIN um ein universelles Werkzeug, das via SH3-Domäne verschiedene Proteine bindet und deren Translokation induziert bzw. deren Interaktion mit Caveolin-1 moduliert. Der Einsatz des Y2H-Systems mit NOSTRIN als „Köderprotein“ könnte zur Identifizierung weiterer NOSTRIN-Interaktionspartner führen und den Anfang für neue spannende Projekte markieren.



## 7 Literaturverzeichnis

1. Murrell, W. (1879) *Lancet* **I**, 90-91.
2. Furchgott, R. F. & Zawadzki, J. V. (1980) *Nature* **288**, 373-6.
3. Ignarro, L. J., Byrns, R. E., Buga, G. M. & Wood, K. S. (1987) *Circ Res* **61**, 866-79.
4. Palmer, R. M., Ferrige, A. G. & Moncada, S. (1987) *Nature* **327**, 524-6.
5. Bredt, D. S. & Snyder, S. H. (1994) *Annu Rev Biochem* **63**, 175-95.
6. Michel, T. & Feron, O. (1997) *J Clin Invest* **100**, 2146-52.
7. Dangl, J. (1998) *Nature* **394**, 525, 527.
8. Frey, A., Reif, A., Zabel, U. & Schmidt, H. H. H. W. (1998) *Biospektrum* **2**, 27-32.
9. Förstermann, U., Boissel, J. P. & Kleinert, H. (1998) *Faseb J* **12**, 773-90.
10. Chen, B., Keshive, M. & Deen, W. M. (1998) *Biophys J* **75**, 745-54.
11. Denninger, J. W. & Marletta, M. A. (1999) *Biochim Biophys Acta* **1411**, 334-50.
12. Murphy, M. P. (1999) *Biochim Biophys Acta* **1411**, 401-14.
13. Loscalzo, J. & Vita, J. A. (2000) *Nitric Oxide and the Cardiovascular System* (Humana Press, Totowa, New Jersey).
14. Rudic, R. D., Shesely, E. G., Maeda, N., Smithies, O., Segal, S. S. & Sessa, W. C. (1998) *J Clin Invest* **101**, 731-6.
15. Ziche, M., Morbidelli, L., Choudhuri, R., Zhang, H. T., Donnini, S., Granger, H. J. & Bicknell, R. (1997) *J Clin Invest* **99**, 2625-34.
16. Kojda, G. & Harrison, D. (1999) *Cardiovasc Res* **43**, 562-71.
17. Jeremy, J. Y., Rowe, D., Emsley, A. M. & Newby, A. C. (1999) *Cardiovasc Res* **43**, 580-94.
18. Huang, P. L., Huang, Z., Mashimo, H., Bloch, K. D., Moskowitz, M. A., Bevan, J. A. & Fishman, M. C. (1995) *Nature* **377**, 239-42.
19. Huang, P. L. (1999) *Braz J Med Biol Res* **32**, 1353-9.
20. Andrew, P. J. & Mayer, B. (1999) *Cardiovasc Res* **43**, 521-31.
21. Marletta, M. A. (2001) *Trends Biochem Sci* **26**, 519-21.
22. Fulton, D., Gratton, J. P. & Sessa, W. C. (2001) *J Pharmacol Exp Ther* **299**, 818-24.
23. Dimmeler, S., Fleming, I., Fisslthaler, B., Hermann, C., Busse, R. & Zeiher, A. M. (1999) *Nature* **399**, 601-5.
24. Fulton, D., Gratton, J. P., McCabe, T. J., Fontana, J., Fujio, Y., Walsh, K., Franke, T. F., Papapetropoulos, A. & Sessa, W. C. (1999) *Nature* **399**, 597-601.
25. Chen, Z. P., Mitchelhill, K. I., Michell, B. J., Stapleton, D., Rodriguez-Crespo, I., Witters, L. A., Power, D. A., Ortiz de Montellano, P. R. & Kemp, B. E. (1999) *FEBS Lett* **443**, 285-9.
26. Michell, B. J., Chen, Z., Tiganis, T., Stapleton, D., Katsis, F., Power, D. A., Sim, A. T. & Kemp, B. E. (2001) *J Biol Chem* **276**, 17625-8.
27. Butt, E., Bernhardt, M., Smolenski, A., Kotsonis, P., Frohlich, L. G., Sickmann, A., Meyer, H. E., Lohmann, S. M. & Schmidt, H. H. (2000) *J Biol Chem* **275**, 5179-87.
28. Harris, M. B., Ju, H., Venema, V. J., Liang, H., Zou, R., Michell, B. J., Chen, Z. P., Kemp, B. E. & Venema, R. C. (2001) *J Biol Chem* **276**, 16587-91.
29. Garcia-Cardena, G., Oh, P., Liu, J., Schnitzer, J. E. & Sessa, W. C. (1996) *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 6448-53.
30. Shaul, P. W., Smart, E. J., Robinson, L. J., German, Z., Yuhanna, I. S., Ying, Y., Anderson, R. G. & Michel, T. (1996) *J Biol Chem* **271**, 6518-22.
31. Anderson, R. G. (1998) *Annu Rev Biochem* **67**, 199-225.
32. Brown, D. A. & London, E. (1998) *Annu Rev Cell Dev Biol* **14**, 111-36.
33. Kurzchalia, T. V. & Parton, R. G. (1999) *Curr Opin Cell Biol* **11**, 424-31.

34. Feron, O., Belhassen, L., Kobzik, L., Smith, T. W., Kelly, R. A. & Michel, T. (1996) *J Biol Chem* **271**, 22810-4.
35. Ghosh, S., Gachhui, R., Crooks, C., Wu, C., Lisanti, M. P. & Stuehr, D. J. (1998) *J Biol Chem* **273**, 22267-71.
36. Ju, H., Zou, R., Venema, V. J. & Venema, R. C. (1997) *J Biol Chem* **272**, 18522-5.
37. Michel, J. B., Feron, O., Sase, K., Prabhakar, P. & Michel, T. (1997) *J Biol Chem* **272**, 25907-12.
38. Garcia-Cardena, G., Fan, R., Shah, V., Sorrentino, R., Cirino, G., Papapetropoulos, A. & Sessa, W. C. (1998) *Nature* **392**, 821-4.
39. Brouet, A., Sonveaux, P., Dessy, C., Balligand, J. L. & Feron, O. (2001) *J Biol Chem* **276**, 32663-9.
40. Cao, S., Yao, J., McCabe, T. J., Yao, Q., Katusic, Z. S., Sessa, W. C. & Shah, V. (2001) *J Biol Chem* **276**, 14249-56.
41. Dedio J., König P., Wohlfart P., Schroeder C., Kummer W, Müller-Esterl W. (2001) *FASEB J* **15**, 79-89.
42. Feron, O., Saldana, F., Michel, J. B. & Michel, T. (1998) *J Biol Chem* **273**, 3125-8.
43. Andries, L. J., Brutsaert, D. L. & Sys, S. U. (1998) *Circ Res* **82**, 195-203.
44. Thuringer, D., Maulon, L. & Frelin, C. (2001) *J Biol Chem*.
45. Fulton, D., Fontana, J., Sowa, G., Gratton, J. P., Lin, M., Li, K. X., Michell, B., Kemp, B. E., Rodman, D. & Sessa, W. C. (2001) *J Biol Chem*.
46. Sowa, G., Pypaert, M. & Sessa, W. C. (2001) *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 14072-7.
47. Bucci, M., Gratton, J. P., Rudic, R. D., Acevedo, L., Roviezzo, F., Cirino, G. & Sessa, W. C. (2000) *Nat Med* **6**, 1362-7.
48. Drab, M., Verkade, P., Elger, M., Kasper, M., Lohn, M., Lauterbach, B., Menne, J., Lindschau, C., Mende, F., Luft, F. C., Schedl, A., Haller, H. & Kurzchalia, T. V. (2001) *Science* **293**, 2449-52.
49. Razani, B., Engelman, J. A., Wang, X. B., Schubert, W., Zhang, X. L., Marks, C. B., Macaluso, F., Russell, R. G., Li, M., Pestell, R. G., Di Vizio, D., Hou, H., Jr., Kneitz, B., Lagaud, G., Christ, G. J., Edelmann, W. & Lisanti, M. P. (2001) *J Biol Chem* **276**, 38121-38.
50. Schultz, J., Milpetz, F., Bork, P. & Ponting, C. P. (1998) *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 5857-64.
51. Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. & Lipman, D. J. (1990) *J Mol Biol* **215**, 403-10.
52. Lundstrom, K., Mills, A., Allet, E., Cezkowski, K., Agudo, G., Chollet, A. & Liljestrom, P. (1995) *J Recept Signal Transduct Res* **15**, 23-32.
53. Knierim, M., Buchholz, J. & Pflug, W. (1988) *Anal Biochem* **172**, 139-44.
54. Beckman, J. S. & Koppenol, W. H. (1996) *Am J Physiol* **271**, C1424-37.
55. Finley, R. L. & Brent, R. (1995) in *DNA Cloning, Expression Systems: A Practical Approach*, eds. Hames, B. D. & Glover, D. M. (Oxford University Press, Oxford), pp. 169-203.
56. Kozak, M. (1987) *Nucleic Acids Res* **15**, 8125-48.
57. Yeung, Y. G., Soldera, S. & Stanley, E. R. (1998) *J Biol Chem* **273**, 30638-42.
58. Lippincott, J. & Li, R. (2000) *Microsc Res Tech* **49**, 168-72.
59. Spencer, S., Dowbenko, D., Cheng, J., Li, W., Brush, J., Utzig, S., Simanis, V. & Lasky, L. A. (1997) *J Cell Biol* **138**, 845-60.
60. Li, J., Nishizawa, K., An, W., Hussey, R. E., Lialios, F. E., Salgia, R., Sunder-Plassmann, R. & Reinherz, E. L. (1998) *Embo J* **17**, 7320-36.
61. Plomann, M., Lange, R., Vopper, G., Cremer, H., Heinlein, U. A., Scheff, S., Baldwin, S. A., Leitges, M., Cramer, M., Paulsson, M. & Barthels, D. (1998) *Eur J Biochem* **256**, 201-11.

62. Harlow, E. & Lane, D. (1999) in *Using Antibodies - A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York), pp. 221-266.
63. Opitz, N. *Manuskript in Vorbereitung*.
64. Smart, E. J., Graf, G. A., McNiven, M. A., Sessa, W. C., Engelman, J. A., Scherer, P. E., Okamoto, T. & Lisanti, M. P. (1999) *Mol Cell Biol* **19**, 7289-304.
65. Parton, R. G., Joggerst, B. & Simons, K. (1994) *J Cell Biol* **127**, 1199-215.
66. Casella, J. F., Flanagan, M. D. & Lin, S. (1981) *Nature* **293**, 302-5.
67. Aberle, S., Young, T. A., Medberry, P., Parkinson, J., Rubanyi, G. M. & Kauser, K. (1997) *Biology and Chemistry* **1**, 226-233.
68. Lander, E. S. e. a. (2001) *Nature* **409**, 860-921.
69. Venter, J. C. e. a. (2001) *Science* **291**, 1304-51.
70. Gavin, A. C., Bosche, M., Krause, R., Grandi, P., Marzioch, M., Bauer, A., Schultz, J., Rick, J. M., Michon, A. M., Cruciat, C. M., Remor, M., Hofert, C., Schelder, M., Brajenovic, M., Ruffner, H., Merino, A., Klein, K., Hudak, M., Dickson, D., Rudi, T., Gnau, V., Bauch, A., Bastuck, S., Huhse, B., Leutwein, C., Heurtier, M. A., Copley, R. R., Edelman, A., Querfurth, E., Rybin, V., Drewes, G., Raida, M., Bouwmeester, T., Bork, P., Seraphin, B., Kuster, B., Neubauer, G. & Superti-Furga, G. (2002) *Nature* **415**, 141-7.
71. Ho, Y., Gruhler, A., Heilbut, A., Bader, G. D., Moore, L., Adams, S. L., Millar, A., Taylor, P., Bennett, K., Boutilier, K., Yang, L., Wolting, C., Donaldson, I., Schandorff, S., Shewnarane, J., Vo, M., Taggart, J., Goudreault, M., Muskat, B., Alfarano, C., Dewar, D., Lin, Z., Michalickova, K., Willems, A. R., Sassi, H., Nielsen, P. A., Rasmussen, K. J., Andersen, J. R., Johansen, L. E., Hansen, L. H., Jespersen, H., Podtelejnikov, A., Nielsen, E., Crawford, J., Poulsen, V., Sorensen, B. D., Matthiesen, J., Hendrickson, R. C., Gleeson, F., Pawson, T., Moran, M. F., Durocher, D., Mann, M., Hogue, C. W., Figeys, D. & Tyers, M. (2002) *Nature* **415**, 180-3.
72. Zimmermann, K., Opitz, N., Dedio, J., Renne, C., Müller-Esterl, W. & Oess, S. (2002) *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 17167-72.
73. Hurley, J. H. e. a. (2002) *Trends in Biochemical Sciences* **27**, 48-53.
74. Buday, L. (1999) *Biochim Biophys Acta* **1422**, 187-204.
75. Fankhauser, C., Reymond, A., Cerutti, L., Utzig, S., Hofmann, K. & Simanis, V. (1995) *Cell* **82**, 435-44.
76. Kaibuchi, K., Kuroda, S. & Amano, M. (1999) *Annu Rev Biochem* **68**, 459-86.
77. Opitz, N.
78. Liu, J., Garcia-Cardena, G. & Sessa, W. C. (1996) *Biochemistry* **35**, 13277-81.
79. Govers, R., Bevers, L., de Bree, P. & Rabelink, T. J. (2002) *Biochem J* **361**, 193-201.
80. Arnal, J. F., Yamin, J., Dockery, S. & Harrison, D. G. (1994) *Am J Physiol* **267**, C1381-8.
81. Zollner, S., Aberle, S., Harvey, S. E., Polokoff, M. A. & Rubanyi, G. M. (2000) *Endothelium* **7**, 169-84.
82. Sakoda, T., Hirata, K., Kuroda, R., Miki, N., Suematsu, M., Kawashima, S. & Yokoyama, M. (1995) *Mol Cell Biochem* **152**, 143-8.
83. Sessa, W. C., Garcia-Cardena, G., Liu, J., Keh, A., Pollock, J. S., Bradley, J., Thiru, S., Braverman, I. M. & Desai, K. M. (1995) *J Biol Chem* **270**, 17641-4.
84. Garcia-Cardena, G., Martasek, P., Masters, B. S., Skidd, P. M., Couet, J., Li, S., Lisanti, M. P. & Sessa, W. C. (1997) *J Biol Chem* **272**, 25437-40.
85. Pol, A., Lu, A., Pons, M., Peiro, S. & Enrich, C. (2000) *J Biol Chem* **275**, 30566-72.

## 8 Anhang

### 8.1 Abkürzungsverzeichnis

$\alpha$ -...	Antikörper gegen ...
Abb.	Abbildung
AS	<u>A</u> minosäure
BAEC	Aortenendothelzellen des Rindes ( <u>b</u> ovine <u>a</u> ortic <u>e</u> ndothelial <u>c</u> ells)
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 cells)
CHO-eNOS-Zellen	stabil eNOS exprimierende CHO-Zellen
cDNA	„ <u>c</u> opy“- <u>D</u> NA
DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <u>d</u> eoxyribo <u>n</u> ucleic <u>a</u> cid)
EA.hy926	Hybridzelllinie aus HUVEC und der Lungenkarzinomzelllinie A549
EST	<i>in vivo</i> exprimierte mRNA-Fragmente, die in cDNA umgeschrieben, sequenziert und in Datenbanken öffentlich zugänglich gemacht wurden ( <u>e</u> xpressed <u>s</u> equen <u>ce</u> <u>t</u> ag)
eNOS	<u>e</u> ndotheliale Stickstoffmonoxid( <u>N</u> O)- <u>S</u> ynthase
FCS	fötales 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> icro <u>v</u> ascular <u>e</u> ndothelial <u>c</u> ells)
IB	<u>I</u> mmunoblot
IF	<u>I</u> mmunofluoreszenz
kDa	<u>K</u> ilodalton
$\lambda_{\text{ex,max}}$	Maximum der Excitationswellenlänge
$\lambda_{\text{em,max}}$	Maximum der Emissionswellenlänge

---

L-NNA	N <sup>G</sup> -Nitro-L-Arginin
NOSTRIN $\Delta$ Cdc15	Cdc15-Deletionsmutante von NOSTRIN
NOSTRIN $\Delta$ SH3	SH3-Deletionsmutante von NOSTRIN
OD <sub>600nm</sub>	optische Dichte bei 600 nm
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
pulldown	Präzipitation von GST-Fusionsproteinen mit GSH-Sepharose (engl., sinngemäß: herunter ziehen),
5'-RACE	Methode zur spezifischen Amplifikation der 5'-Termini von cDNAs (5'-rapid amplification of cDNA ends)
RT	Raumtemperatur
SDS-PAGE	SDS (sodium dodecyl sulfate, Natriumdodecylsulfat) Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SFV	Semliki forest virus
U	Einheit (unit)
Y2H-System	System in der Hefe zur Selektionierung von cDNAs, welche für Interaktionspartner eines „Köderproteins“ kodieren (yeast two-hybrid)

## 8.2 NOSTRIN-spezifische Antikörper

Als wertvolles Werkzeug zur Erforschung von NOSTRIN erwiesen sich die NOSTRIN-spezifische Antikörper, welche von Dr. A. Maidhof und Fr. B. Welsch in Mainz bzw. von Dr. G. Voelcker und Fr. B. Pfeiffer in Frankfurt hergestellt wurden. Zur Übersicht und Hilfe bei zukünftigen Arbeiten werden alle zur Verfügung stehenden Antikörper aufgeführt und hinsichtlich ihrer Qualität bzgl. des Einsatzes im Immunoblot oder bei der Immunofluoreszenz eingestuft. Alle Antikörper sind polyklonal aus Maus (M) oder Kaninchen (K).

Kennzeichnung	gerichtet gegen	Her- kunft	Immunoblot		Immunofluoreszenz	
			Qual.	Verd.	Qual.	Verd.
GST12.3-2	GST-NOSTRIN (AS 241-506)	K	+++	1:2500	++	1:100
GST12.3-2 Maus1		M	+++	1:5000	n.g.	-
GST12.3-2 Maus2		M	++	1:5000	n.g.	-
GST12.3-2 Maus3		M	+++	1:5000	+++	1:250
ETT	NOSTRIN-Peptid AA 170-186	K	+++	1:1000	+++	1:100
ETR	NOSTRIN-Peptid AA 10-28	K	+	1:1000	n.g.	-
ELE	NOSTRIN-Peptid AA 104-121	K	-	-	n.g.	-
GST-NOSTRIN <sub>FS</sub> A	GST-NOSTRIN	K	-	-	n.g.	-
GST-NOSTRIN <sub>FS</sub> B	GST-NOSTRIN	K	++	1:1000	n.g.	-

Bemerkungen: Die Qualität (Qual.) der Antikörper bei Verwendung mit der angegebenen Verdünnung (Verd.) wurde wie folgt bewertet: +++ ausgezeichnet, ++ gut, + schlecht, aber einsetzbar, - nicht verwendbar, n.g. = nicht getestet

Bei immunohistochemischen Färbungen funktionierte der Antikörper GST-NOSTRIN<sub>FS</sub>B funktionierte am besten.

## 9 Lebenslauf

### Persönliche Angaben

Name: Kirstin Zimmermann  
Geburtsdatum: 02.01.1974  
Geburtsort: Altdöbern / Brandenburg  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
Familienstand: ledig  
Adresse: Wilhelm-Leuschner-Str. 26  
64293 Darmstadt

### Schulbildung

1980 - 1990 Polytechnische Oberschule "Friedrich Engels"  
Bickenriede / Thüringen  
  
1990 - 1992 Tilesius Gymnasium Mühlhausen / Thüringen  
Juli 1992 Abschluß: allgemeine Hochschulreife

### Auslandsaufenthalt

1992 - 1993 Au-pair in Boston, USA

### Studium

1993 - 1995 Chemiestudium an der Universität Marburg  
Oktober 1995 Vordiplom  
1995 - 1998 Chemiestudium an der TU Darmstadt  
Juni - Dezember 1998 Diplomarbeit bei Prof. Dr. N.A. Dencher,  
Physikalische Biochemie, TU Darmstadt  
Dezember 1998 Diplom  
Januar 1999 Preisträgerin der Dr.-Anton-Keller-Stiftung  
seit Januar 1999 Dissertation bei Prof. Dr. W. Müller-Esterl am  
Institut für Physiologische Chemie und Patho-  
biochemie, Universität Mainz und  
am Institut für Biochemie II, Universität Frankfurt / Main

---

**Veröffentlichung der Ergebnisse dieser Arbeit**

28. Oktober 2001                    Vortrag beim „6th Annual Meeting of the European Council for Blood Pressure and Cardiovascular Research (ECCR)“ in Noordwijkerhout, Niederlande  
  „Identification and characterisation of NOSTRIN - a novel eNOS binding protein“
13. März 2002                     Vortrag bei der 43. Frühjahrstagung der DGPT in Mainz  
  „NOSTRIN – A novel modulator of eNOS - caveolin-1 interaction“

Teile der Arbeit wurden publiziert:

Zimmermann, K., Opitz, N., Dedio, J., Renne, C., Müller-Esterl, W. & Oess, S. (2002).  
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.



## **10 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, den 21.07.2002

Kirstin Zimmermann

