

Aus dem Medizinischen Zentrum für Innere Medizin der Philipps-Universität Marburg

Abteilung für Kardiologie; Direktor: Prof. Dr. med. B. Maisch

Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. R. Arnold

**Mutationscreening funktionell relevanter Regionen von  
endothelialer Stickoxydsynthase, Caveolin und VEGF  
bei koronarangiographierten Patienten**

**Inaugural-Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin

dem Fachbereich Humanmedizin der

Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Margitta Melanie Moalem

Marburg/Lahn 2005

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin  
der Philipps-Universität Marburg am 18. August 2005

gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. med. B. Maisch

Referent: Prof. Dr. med. J. Schäfer

Correferent: Prof. Dr. med. Max

# **1 Einleitung**

## **1.1 *Stickoxydsynthase***

### **1.1.1 Geschichtliches zur Stickoxydsynthase**

### **1.1.2 Isoenzyme der Stickoxydsynthase**

### **1.1.3 endotheliale Stickoxydsynthase (eNOS)**

## **1.2 *Caveolae***

### **1.2.1 Interaktion von Caveolin und eNOS**

## **1.3 *Calmodulin***

## **1.4 *Akt***

## **1.5 *Aktivierung der eNOS (Nitric oxide pathway)***

### **1.5.1 Der kalziumabhängige Aktivierungsweg**

### **1.5.2 Der kalziumunabhängige Aktivierungsweg**

## **1.6 *Wirkung von NO***

## **1.7 *eNOS und Atherosklerose***

### **1.7.1 Atherosklerose und deren Bedeutung**

### **1.7.2 Risikofaktoren der KHK**

### **1.7.3 Pathogenese und Klinik der Atherosklerose**

### **1.7.4 Pathogenetische Zusammenhänge der eNOS und Atherosklerose/KHK**

### **1.7.5 Hypercholesterinämie**

**1.8 eNOS-Gen**

**1.9. Calmodulin-Gen**

**1.10. Caveolin-Gen und Mutationen**

**1.11. VEGFR-2-Gen und Mutationen**

**1.12. T-Allel Polymorphismus der eNOS (Glu298Asp) und Assoziation mit KHK**

**1.13. „Marburger KHK-Präventionsprojekt“**

**2 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit**

**3 Material und Methoden**

**3.1 Studiendesign**

**3.1.1 Patientenkollektiv**

**3.1.2 Chemikalien**

**3.1.3 Geräte**

**3.2 Molekulargenetik**

**3.2.1 Strategien zum Mutationsscreening**

**3.2.2 DNA-Gewinnung**

**3.2.3 Polymerase Chain Reaction (PCR)**

**3.2.4 Gelelektrophorese von DNA-Proben**

**3.2.5 Denaturierende Gradienten Gelelektrophorese (DGGE)**

**3.2.6 DNA-Sequenzierung**

**3.2.7 Bestimmung des eNOS Glu298Asp Polymorphismus**

**3.3 Statistische Analyse**

**4 Ergebnisse**

**4.1 Demographische Daten und kardiovaskuläres Risikoprofil der Patienten**

**4.2 Assoziation des eNOS Glu298Asp Polymorphismus zur KHK**

**4.3 Untersuchte Genbereiche der eNOS und Gene modulierender Faktoren**

**5 Diskussion**

**5.1 Konzeption der Arbeit**

**5.2 Polymorphismus Glu298Asp im eNOS Gen**

**5.3 eNOS Gen und wichtige Modulatoren**

**6 Zusammenfassung**

**7 Literaturverzeichnis**

**8 Anhang**

**8.1 Abkürzung**

**8.2 Verzeichnis der akademischen Lehrer**

**8.3 *Publikationen***

**8.4 *Danksagung***

**8.5 *Lebenslauf***

**8.6 *Ehrenwörtliche Erklärung***

## 1. Einleitung

### 1.1. Stickoxydsynthese

#### 1.1.1. Geschichtliches zur Stickoxydsynthese

Krebserregende Nitrosamine waren in den siebziger Jahren der Grund, daß man sich zum ersten Mal mit der Frage befasste, ob Nitrat und Nitrit im menschlichen Körper auch selbständig, ohne Mithilfe von Bakterien gebildet wird. Bilanzierungsstudien ergaben, daß der Mensch mehr Nitrat/Nitrit ausscheidet als er zu sich nimmt. Somit konnte die Nahrung nicht die einzige Quelle von Nitrat/Nitrit sein [Green *et al.*, 1981]. Darum begannen viele Forschergruppen die Suche nach endogenen Systemen, welche Stickstoff zu Nitrat und Nitrit oxidieren können. In den achtziger Jahren fanden unabhängig und relativ gleichzeitig mehrere Forschergruppen in drei Zelltypen Nitrat-/Nitritquellen. So fand 1985 eine Gruppe, dass Makrophagen nach Behandlung mit bakteriellem Endotoxin (Lipopolysaccharid aus Bakterien) Nitrat und Nitrit bilden [Stuehr und Marletta, 1985]. Zwei Jahre später konnte NO als primäres Syntheseprodukt dieser Zellen nachgewiesen werden. Als Stickstoffquelle für die NO-Synthese wurde einer der Guanidinostickstoffe von L-Arginin identifiziert [Hibbs, Jr. *et al.*, 1987].

Unabhängig davon entdeckte eine Gruppe um den Wissenschaftler Furchgott Anfang der achtziger Jahre, daß aus dem Endothel von Blutgefäßen eine gefäßerweiternde Substanz ausgeschüttet wird [Furchgott *et al.*, 1984]. Diese Substanz wurde als „Endothelium-derived relaxing factor“ (EDRF) bezeichnet und konnte 1987 von einer englischen Gruppe als NO identifiziert werden [Palmer *et al.*, 1987]. Analog zum Makrophagensystem wurde die Aminosäure L-Arginin als Substrat der NO-Synthese in Endothelzellen identifiziert.

Wiederum unabhängig davon wurde 1982 entdeckt, dass für die Bildung des zyklischen Guanosin-3',5'-monophosphat (cGMP) im Gehirn L-Arginin benötigt wird [Deguchi und Yoshioka, 1982]. Die Erklärung dafür lieferte später die Entdeckung, daß Nervenzellen im Gehirn aus L-Arginin NO produzieren.

Somit war seit Ende der achtziger Jahre bekannt, dass in mindestens drei unterschiedlichen Zelltypen (Makrophagen, Endothelzellen, Nervenzellen) NO aus L-Arginin gebildet wird. Die Enzyme, welche NO aus L-Arginin bilden können, wurden NO-Synthasen genannt.

1.1.2. Isoenzyme der Stickoxydsynthese

In den achtziger Jahren wurden im menschlichen Organismus drei Isoenzyme entdeckt, welche L-Arginin in L-Citrullin und Stickstoffmonoxid (NO) umwandeln.

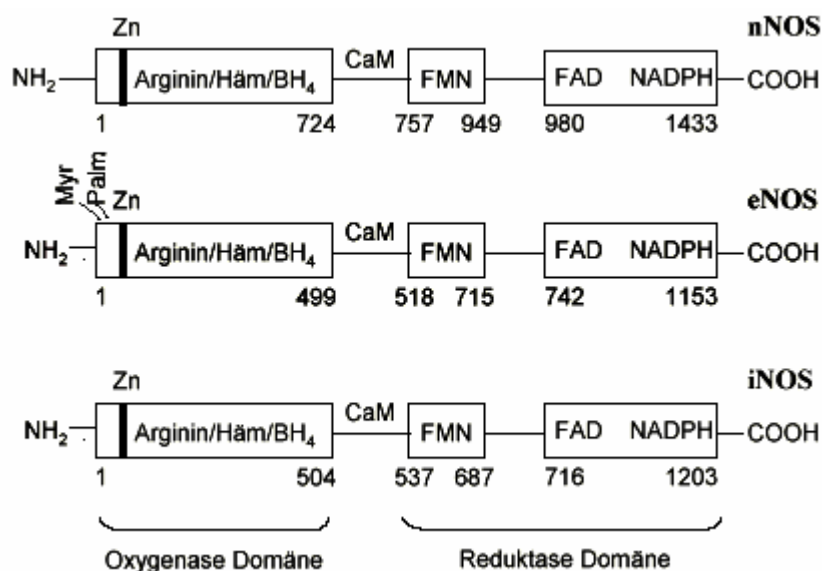
Die Stickoxydsynthese (NOS) ist ein Enzym, das in fast allen Körperzellen nachzuweisen ist.

Es gibt drei Isoenzyme: nNOS, iNOS und die eNOS (zum Aufbau siehe Abb.1).

nNOS steht für neuronale Stickoxydsynthese und wird auch als NOS 1 bezeichnet, sie ist involviert in die Übertragung von Informationen im Gehirn und im peripheren Nervensystem.

iNOS ist die Abkürzung für zytokin-induzierende NOS, auch NOS 2 genannt. Sie ist ein Mediator bei den tumor- und bakterientötenden Aktionen von Makrophagen und schließlich eNOS, die endotheliale Stickoxydsynthese. NOS 3 katalysiert die Oxidation von L-Arginin zur Produktion von L-Citrullin und NO durch eine komplexe Reaktion, die NADPH, FAD, FMN, Tetrahydrobiopterin und Häm involviert [Lamas *et al.* 1992 und Marletta *et al.* 1993].

**Abbildung 1:** Schematischer Aufbau der menschlichen nNOS, eNOS und iNOS (Alderton *et al.*, 2001).



1.1.3. endotheliale Stickoxydsynthese (eNOS)

Die eNOS ist dafür zuständig in Endothelzellen Stickstoffmonoxid (NO) zu bilden. Aus L-Arginin wird mittels der eNOS L-Citrullin und NO gebildet [Bredt und Snyder 1994].



Nach der Freisetzung diffundiert NO rasch durch die Zellmembran. NO wird auch als EDRF (“endothelium derived relaxing factor”) bezeichnet und wirkt als starker Vasodilatator und hat damit großen Einfluss auf den Blutdruck. Außerdem ist es verantwortlich für die Inhibierung der Plättchenaggregation, die verminderte Leukozytenanhaftung und das Wachstum der glatten Gefäßmuskulatur, so wird entscheidender Einfluss auf die Angiogenese und die Gefäßreparatur genommen [Garcia-Cardena *et al.* 1996]. Nach momentanem Stand der Wissenschaft stellt die endotheliale NO-Produktion die Basis für ein intaktes kardiovaskuläres System dar [Katusic, 2001]. Diese These wird durch die Erkenntnis gestützt, dass kardiovaskulären Erkrankungen wie Arteriosklerose und Bluthochdruck oftmals eine endotheliale Dysfunktion in Form einer gestörten endothelialen NO-Produktion oder reduzierten NO-Bioverfügbarkeit vorangeht [Li und Förstermann, 2000].

Weiterhin kommt NO in den Atemwegen vor. NO wird abgeatmet. Studien am Tiermodell wie auch am Menschen legen den Verdacht nahe, daß die Hauptquelle von ausgeatmetem NO die Atemwege sind [Gustaffson *et al.*, 1991 und Dweik *et al.*, 1998]. Es gibt Beweise, daß die Expression der epithelialen NOS in den Luftwegen unter einer Atemwegsinfektion reduziert ist aufgrund der Dysfunktion der Atemwege [Folkerts *et al.*, 1995].

Die eNOS ist ein zweifach acetyliertes peripheres Membranprotein, daß in der Golgi-Region und der Plasmamembran von Endothelzellen vorkommt [Liu *et al.* 1997]. Für die Aktivierung der eNOS sind drei entscheidende Domänen von Bedeutung:

- die N-terminale Oxygenase-Domäne
- die C-terminale Reduktase-Domäne [Chen *et al.* 1996]
- die Kalzium-Calmodulin-bindende Domäne,

welche die Erstgenannten verbindet [Venema *et al.* 1996].

An der N-terminalen Oxygenaseregion befindet sich eine Bindungsstelle für Arginin, Tetrahydrobiopterin, Kalzium-Calmodulin und Zink. Die C-terminale Reduktasedomäne beinhaltet eine autoinhibitorische Region und eine Bindungsstelle für FAD, FMN und NADPH als Elektronendonatoren [Sase und Michel 1997 und Fleming und Busse 1999].

Die eNOS ist zweifach acetyliert durch die gesättigten Fettsäuren Palmitinsäure (Hexadecansäure  $C_{16}H_{32}O_2$ ) und Myristinsäure (Tetradecansäure  $C_{14}H_{28}O_2$ ) [Couet *et al.* 1997]. Diese Acetylierungen sind notwendig, damit die eNOS an spezifische Regionen innerhalb des Zytoplasmas, die sogenannten Caveolae binden kann. Die im

wesentlichen irreversible Ankopplung der Fettsäure Myristin kotranslational an einen N-terminalen Glycinrest wird für die Anlagerung an die Caveolae benötigt. Die Kettenverlängerung mit der Fettsäure Palmitin (Palmierung) findet an zwei Cysteinresten (Cystein15 und Cystein 26) [Robinson und Michel 1995] nahe des N-terminalen Endes statt und stabilisiert die Anlagerung des Enzyms an die Membran. Sie ist reversibel. Die Ankopplung von Myristin an die eNOS ist notwendig, damit die eNOS zum Golgi-Apparat verbracht wird, wo dann die Palmierung stattfindet. Die mit Myristin und Palmitin verbundene eNOS bindet dann an die Caveolae, welche reich an Cholesterol sind [Shaul, 2002].

Als Antwort auf die Stimulation durch einen Agonisten wie zum Beispiel Bradykinin [Robinson *et al.* 1995] findet eine Abspaltung der Palmitinsäure (Depalmierung) statt und führt damit zur Aktivierung des Enzyms [Michel 1999]. Dies stellt einen Mechanismus für die Freierdung von Membranproteinen dar.

Die eNOS-Bindung an die Caveolae ist abhängig von der Kettenverlängerung der eNOS mit der Fettsäure Palmitin (Palmierung) [Shaul *et al.* 1996]. Palmierung ist eine reversible posttranslationale Modifikation, die charakteristisch ist für Signalproteine, die in Caveolae gelagert sind. Sie beinhaltet eine Addition der 16 Kohlenstoff-Atome langen Fettsäure Palmitin an spezifische Zystinreste im Protein. Palmitin wird dabei mittels einer Thioesterbindung angebracht. Durch Agonistenaktivierung wird die Depalmierung initiiert und die Proteine translozieren von den Caveolae [Robinson *et al.* 1995 und Milligan *et al.* 1995].

## 1.2. Caveolae

Caveolae sind cholesterol- und glykosphingolipidreiche Mikrodomänen des Zytoplasmas [Sase und Michel 1997]. Charakterisiert sind sie durch das Membranprotein Caveolin [Parton 1996]. Es lassen sich Caveolin -1, -2 und -3 unterscheiden [Sase und Michel 1997]. Caveoline sind 20-24 kDa oligomere Membranproteine.

Caveolin-1 wird in fast allen Zelltypen gefunden und ist ein wichtiges Strukturprotein der Caveolae. Caveolin-2 ist vorwiegend in Adipozyten vorhanden [Rothberg *et al.* 1992].

Caveolin-3 kommt hauptsächlich in gestreiften Muskelzellen vor [Scherer *et al.* 1996].

Caveolin ist 178 Aminosäuren lang und enthält drei Domänen:

- eine N-terminale mit 101 Aminosäuren
- eine C-terminale mit 44 Aminosäuren
- eine dazwischenliegende Domäne, die 33 Aminosäuren umspannt [Glenney und Soppet 1992].

Sowohl die N-terminale, als auch die C-terminale Domäne des Caveolin ragen ins Zytosol, was die Interaktion mit zytosolischen Molekülen möglich macht. Der membranständige Teil formt eine Haarnadelkurve in der Zellmembran [Dietzen *et al.* 1995]. Eine zytosolische Subdomäne des N-terminalen Endes von Caveolin ( Rest 82-101) interagiert direkt mit G- $\alpha$ - Untereinheiten von G-Proteinen, sowie mit den Onkogenen H-Ras und c-Src. Dabei unterdrückt Caveolin die katalytische Aktivität der G-Proteine und der zur Src-Familie gehörenden Tyrosinkinase, indem sie sie in inaktivem Zustand hält [Couet *et al.* 1997].

Caveolin ist auch involviert in der Formung eines multivalenten Caveolin-Homo-Oligomers [Li *et al.* 1996]. Das Homo-Oligomer liegt in hoher Molekülmasse von 350 kDa und 14-16 Caveolin-Monomeren pro Oligomer vor. Diese Caveolin-Homo-Oligomere lagern sich aneinander und erscheinen als Caveolae [Sargiacomo *et al.* 1995].

In den Caveolae sind Signalmoleküle konzentriert. Dabei handelt es sich um G-Protein gekoppelte Rezeptoren wie: Acetylcholinrezeptoren, Kalziumpumpen, einen Inositol-3-Phosphat sensitiven Kalziumkanal oder eine Proteinkinase C [Anderson *et al.* 1993].

#### 1.2.1. Interaktionen von Caveolin und eNOS

Caveolin und eNOS liegen intrazellulär als Komplex gebunden in den Caveolae [Feron *et al.* 1996]. So inhibiert Caveolin die eNOS, reguliert also die Aktivität der eNOS herunter [Garcia-Cardena *et al.* 1997]. Diese Enzyminhibierung kann durch Kalzium-Calmodulin aufgehoben werden [Michel *et al.* 1997]. Durch einen ansteigenden Kalziumspiegel kann Caveolin von der eNOS separiert und das freiwerdende Enzym wirksam werden. Später kommt es zur Reformation des Caveolin-eNOS-Heteromers, ein Wiederanlagern an die Caveolae findet statt und das Enzym wird inhibiert [Feron *et al.* 1998].

Die eNOS interagiert direkt mit Caveolin-1. Die Interaktion involviert sowohl das C-terminale, als auch das N-terminale Ende des Caveolin-1. Von der eNOS ist nur die Oxygenase-Domäne involviert. Die Interaktion von Caveolin-1 und eNOS führt zu einer

signifikanten Verminderung der katalytischen Aktivität des Enzyms. Es existiert eine positive allosterische Regulation durch Kalzium-Calmodulin [Ju *et al.* 1997].

### 1.3. Calmodulin

Calmodulin ist ein essentieller Regulator des inter- und intradomantiellen Elektronenflusses [Abu-Soud *et al.* 1994]. Es ist ein Regulatorprotein, daß durch Kalzium aktiviert wird. Calmodulin ist ein 148 Aminosäuren langes Polypeptid, das vier Kalziumbindungsstellen besitzt. Es reguliert eine Reihe von Enzymen, die auf den Anstieg von intrazellulärem Kalzium reagieren [James *et al.* 1995]. Durch den Kalzium getriggerten Wechsel erkennt der Kalzium-Calmodulin-Komplex spezifische amphotere  $\alpha$ -helikale Domänen in den Zielproteinen und bindet an diese mit hoher Affinität [O'Neil *et al.* 1990].

Die Calmodulin-bindende Region der eNOS ist in den Resten 493-512 situiert [Marsden *et al.* 1992].

### 1.4. Akt

Die Serin/Threonin Kinase Akt ist eine Proteinkinase B und fungiert als Protoonkogen. Sie reguliert verschiedenliche zelluläre Prozesse. So kann die Aktivierung der Rezeptor-Tyrosin-Kinase und G-Protein-gekoppelter Rezeptoren, sowie die Stimulation von Zellen durch mechanische Kräfte zu einer Phosphorylierung und damit Aktivierung der Akt führen [Downward, 1998, Fulton *et al.*, 1999]. Akt wird auf die Wirkung von laminaren Scherkräften am Endothel hin in einem zeitabhängigen Muster phosphoryliert. Für die Phosphorylierung wird die IP-3-Kinase benötigt. Die Zugabe von Wachstumsfaktor stimuliert die Akt-Phosphorylierung.

Dazu hat die Kinase noch einen anti-apoptotischen Effekt, der durch Scherkräfte am Endothel stimuliert wird, dabei aktiviert Angiopoietin-1 über die IP-3-Kinase Akt und verhindert so die Endothelzellapoptose [Kim *et al.*, 2000]. Damit hat die Akt-Kinase eine wichtige atheroprotektive Funktion, indem sie die endotheliale Zellphysiologie aktiv beeinflusst [Dimmeler *et al.* 1998].

Der Hauptangriffspunkt der Akt an der eNOS ist der Serinrest 1179 (entspricht dem humanen eNOS Serinrest 1177). Akt kann die eNOS am Serin 1179 phosphorylieren, dies wiederum erhöht über den verstärkten Elektronenfluss über die Reduktasedomäne die Produktion von NO, dieser Wirkmechanismus ist eine von Kalzium unabhängige Enzymaktivierung [Fulton *et al.*, 1999].

Hitzeschockprotein 90 (HSP 90) und Akt aktivieren synergistisch die eNOS, dafür wird kein Kalzium benötigt. Dabei verstärkt HSP 90 die initiale und maximale Rate der Akt-verursachten eNOS-Aktivierung durch Phosphorylierung am Serin-Rest 1179. Dies scheint auf die Wirkung von Insulin hin stattzufinden [Takahashi und Mendelsohn, 2003].

An bovinen aortalen Endothelzellen wurde gezeigt, dass es als Reaktion auf Scherkräfte am Endothel zur einer Phosphorylierung der eNOS am Serinrest 1179 kommt durch eine Proteinkinase A abhängige Reaktion; Akt war dazu nicht erforderlich, wohingegen die NO-Produktion von beiden Mechanismen (Akt und PKA) abhängig war. So scheint die koordinierte Interaktion zwischen Akt und PKA ein wichtiger Mechanismus zu sein, der die eNOS-Aktivität in Reaktion auf physiologische Stimuli reguliert [Boo *et al.*, 2002].

Unter oxidativem Stress, wenn H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> frei gesetzt wird, kommt es zu einer verstärkten Freisetzung von NO. Dies erfordert die Kooperation der PI-3-Kinase, sowie die Akt abhängige Phosphorylierung der eNOS am Serin 1179. So könnte dies einer der Mechanismen sein, die eine akute zelluläre Adaptation an steigendem oxidativem Stress darstellen [Cai *et al.*, 2003].

Die Frage, wie Akt direkt von einer KHK betroffen sein könnte, beschäftigte eine Arbeit aus 2003 [Mineo und Shaul, 2003]. Dort wurde gezeigt, dass HDL die eNOS über Src und PI-3-Kinasen, die wiederum parallel zur Aktivierung der Akt und anderer Proteinkinasen führen, aktiviert. So führt der Signalweg, der durch HDL initiiert wird, zu einer gesteigerten Produktion des potenten atheroprotektiven Moleküls NO. Da es im Falle einer KHK zu einer verminderten HDL-Produktion kommt, könnte dies einer der Mechanismen für die vaskuläre Fehlfunktion sein.

Angiopoietin-1, VEGF und Shear Stress (Scherkräfte am Endothel) aktivieren die Akt. Diese wiederum inhibiert Bad, Caspase-9 und die Raf. Aktiviert wird die eNOS, was zu einer verstärkten NO-Produktion führt. Weitere Aufgaben sind die Suppression der Apoptose, sowie die Endothelzellmigration.

#### 1.5. Aktivierung der eNOS (Nitric oxide pathway)

NO vermittelt im Organismus vielfältige Wirkungen. Wichtigstes Zielenzym des durch die nNOS und eNOS freigesetzten NO ist die lösliche Guanylylcyclase (sGC). NO bewirkt ihre Aktivierung, was zu einer gesteigerten Produktion an cGMP führt. cGMP

wiederum aktiviert u.a. die Proteinkinase G (PKG), welche durch Phosphorylierung von verschiedenen Zielproteinen z.B. eine Vasodilatation bewirken kann [Forth *et al.*,2001]. Durch die eNOS gebildetes NO bewirkt eine Relaxation der Blutgefäße, da es über cGMP den Tonus der vaskulären Muskelzellen reduziert. Luminal abgegebenes endotheliales NO bewirkt durch Stimulation der sGC in Thrombozyten eine reduzierte Thrombozytenaggregation und –adhäsion. Darüber hinaus vermindert endotheliales NO die Adhäsion von Leukozyten an der Gefäßwand und reduziert die Proliferation von glatten Gefäßmuskelzellen [Forth *et al.*, 2001].

Für die Freisetzung der eNOS existieren zwei unterschiedliche Aktivierungswege; ein Kalziumabhängiger und ein Kalziumunabhängiger. Agonisten, wie Acetylcholin [Peach *et al.* 1985] und VEGF (vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor) [Papapetropoulos *et al.* 1997] benötigen einen Kalziumanstieg zur Aktivierung der eNOS. Bei Scherkräften die am Endothel wirksam werden [Kuchan *et al.* 1994], wie auch bei der Aktivierung des Nitric oxide pathway durch Östrogene [Caulin-Glaser *et al.* 1997] oder Insulin [Tsukahara *et al.* 1994] ist kein Kalziumanstieg erforderlich. Die basale Aktivität der eNOS ist in Abbildung 2 dargestellt.

Eine Übersicht über die Aktivierung der eNOS gibt Abbildung 3.

In Abb.2 wird die basale Aktivität der eNOS dargestellt. Im deaktivierten Zustand ist die eNOS an Caveolin gebunden. Die Phosphorylierungsdomänen am Serin 1177 und Threonin 495 der eNOS sind dargestellt. Man sieht die Angriffspunkte der Akt-1-Kinase am Serin 1177, sowie der Proteinkinase C am Threonin 495. Es ist auch die Calmodulinbindungsseite (aa485-514) an der eNOS dargestellt. Calmodulin liegt ungebunden im Zytosol vor. Die Kalziumspeicher sind als  $Ca^{2+}$  dargestellt. Das unter basaler Aktivität produzierte NO wird außerhalb der Zellmembran wirksam und dient der Aufrechterhaltung des vaskulären Tonus.

Abbildung 2: basale Aktivität der eNOS -Normalzustand-

## vaskulärer Tonus

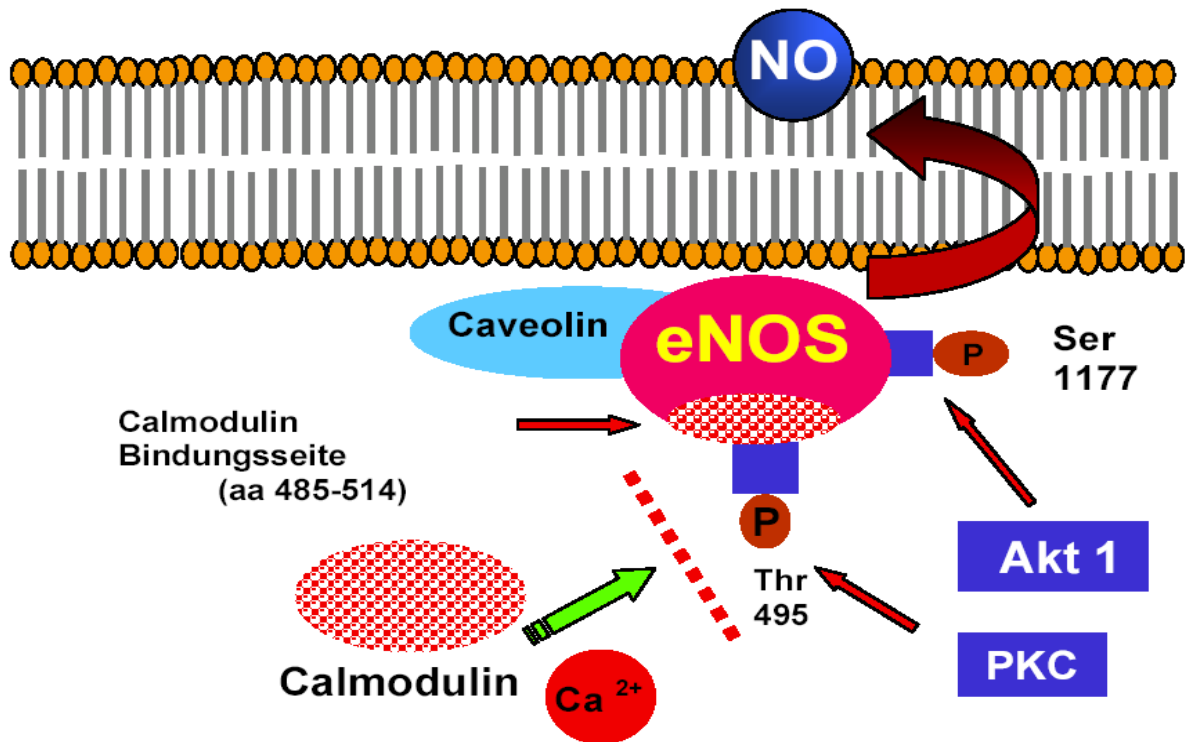
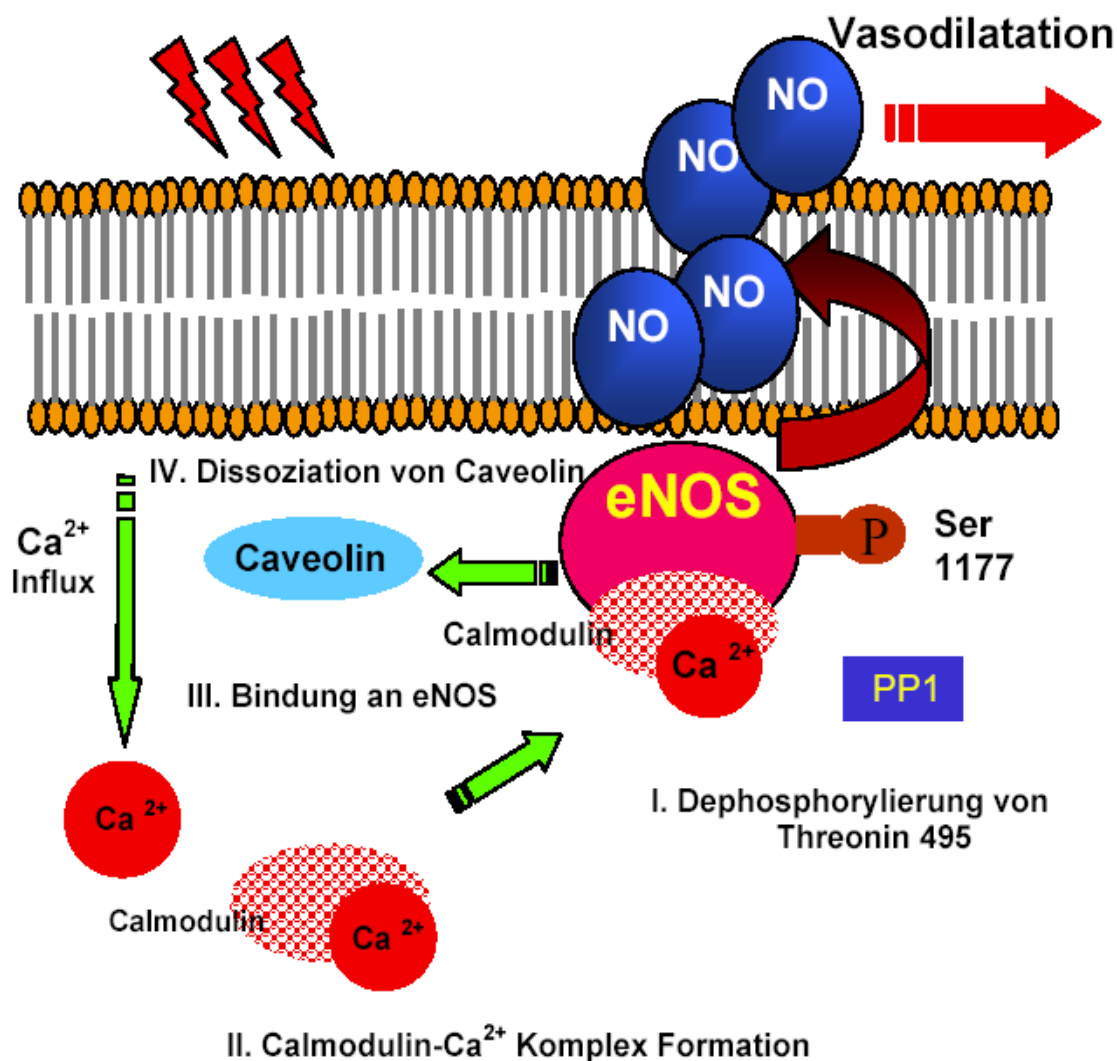


Abb.3 macht deutlich, wie es zur Aktivierung der eNOS kommt: Zum einen findet eine Dephosphorylierung von Threonin 495 (I.) statt und durch Scherkräfte (durch Stimulation gekennzeichnet) am Endothel kommt es zum Kalziuminflux und zur Bindung von Calmodulin an Kalzium; der Calmodulin-Kalzium Komplex formiert sich (II.). Dieser bindet wiederum am Caveolin-eNOS-Komplex (III.) und führt zur Dissoziation des Caveolins (IV.); somit wird die eNOS aktiviert und es kommt zur gesteigerten NO-Produktion, welche eine Gefäßdilataion bewirkt.

Abbildung 3: induzierte Aktivität der eNOS

## Stimulation (shear stress ...)

1.5.1. Der kalziumabhängige Aktivierungsweg:

Dieser Weg ist abhängig von einem Anstieg des intrazellulären Kalziums und dessen Bindung an Calmodulin [Busse und Mulsch 1990]. Agonisten wie Bradykinin, Acetylcholin, Thrombin, Histamin, Substanz P, ATP, Endothelin 1, Angiotensin 2, VEGF und vaskuläre Scherkräfte aktivieren einen Zellrezeptor. Dadurch wird die Phospholipase C aktiviert, die dann aus dem Phospholipid Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat, Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP<sub>3</sub>) und Diacylglycerin freisetzt. IP<sub>3</sub> bewirkt eine Freisetzung von Kalzium aus intrazellulären Speichern, was zum Anstieg von Kalzium führt. Das freie Kalzium bewirkt die Dissoziation des eNOS-Caveolin-Komplexes, das Enzym wird an Calmodulin gebunden. Es kommt zur Freisetzung der



eNOS und damit zur Produktion von NO. Dieser Vorgang dauert solange an, bis der Kalziumspiegel abfällt und Calmodulin von der eNOS dissoziiert. Das Enzym bindet erneut an Caveolin und wird inaktiviert [Marrero *et al.* 1999].

#### 1.5.2. Der kalziumunabhängige Aktivierungsweg:

Dieser Aktivierungsweg ist abhängig von einer Phosphorylierung der eNOS, welche über verschiedenliche zelluläre Stimulationen erfolgt.

In der Zelle existiert Akt, dabei handelt es sich um eine Serin-Protein-Kinase. Ebenso gibt es PKB (Proteinkinase B)- eine Threonin-Protein-Kinase [Burgering und Coffe 1995]. Diese Proteinkinasen sind kalziumunabhängig und können durch Scherkräfte am Endothel aktiviert werden [Ayajiki *et al.* 1996]. Die Proteinkinase Akt ist in der Lage eNOS in bovinen Zellen am Serin 1179 [Fulton *et al.* 1999], beziehungsweise am Serin 1177 in humanen Zellen [Dimmeler *et al.* 1999] zu phosphorylieren. Die Phosphorylierung ändert die Sensitivität des Enzyms für Kalzium. Dadurch führt die Phosphorylierung der eNOS zu größerer Produktion von NO auch bei niedrigen Kalziumspiegeln [Fulton *et al.* 1999].

Die Akt wird über mehrere Mechanismen aktiviert. Zum einen existiert die Möglichkeit der Aktivierung mittels Rezeptor-Tyrosin-Kinasen [Downward 1998]. Ebenso spielen G-Protein-gekoppelte Rezeptoren eine Rolle [Murga *et al.* 1998]. Auch direkt über mechanische Kräfte am Endothel besteht die Möglichkeit einer Aktivierung [Dimmeler *et al.* 1998 und Busse und Fleming 1998].

Akt phosphoryliert auch Substrate wie die Glykogensynthase-Kinase-3, Bad- und Capase-9. Die Phosphorylierung dieser Substrate führt zu einer Proteininaktivierung [Cardone *et al.* 1998]. Die Phosphorylierung der 6-Phospho-Fructo-Kinase dagegen führt zur Proteinaktivierung [Downward 1998].

Die Stimulierung der Akt erfolgt über VEGF oder IGF-1 ( insulin like growth factor) über die Phospholipase C. VEGF stimuliert die Produktion von NO durch einen Phosphatidylinositol-3-OH/Akt-Kinase-abhängigen Mechanismus [Papapetropoulos *et al.* 1997]. Wortmannin ein Phosphokinase-3(PI-3)-Inhibitor verhindert die Aktivierung der eNOS über den Akt-Signalweg [Michell *et al.* 1999].

Anwachsende Scherkräfte am Endothel stimulieren das Freiwerden von Kalzium aus intrazellulären Lagern [James *et al.* 1995]. Sie verursachen eine Phosphorylierung der eNOS am Amino-Ende am Serin-116 und am Carboxylende am Serin-1179 durch die Phosphokinase B, bzw. die PI-3 [Gallis *et al.* 1999].

In vitro wurde gezeigt, daß die eNOS am Serin 633, am Serin 477 und am Threonin 495 durch die von cAMP- und cGMP-abhängige Proteinkinase-2 phosphoryliert werden kann. Diese Phosphorylierung kann in Abwesenheit von Kalzium/Calmodulin ablaufen [Butt *et al.* 2000].

In einer neuesten Studie [Fleming *et al.* 2001] wurde gezeigt, daß die Aktivierung des PI-3-K/Akt/PKB-Signalwegs über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (z. Bsp. Bradykinin oder Histamin) nicht in ähnlich starker Weise relevant ist für die Regulation der eNOS wie die Aktivierung der eNOS über Phosphorylierung.

Relevant ist dabei nicht nur die Phosphorylierung der eNOS am Serin 1177, sondern es scheint, daß die Dephosphorylierung der eNOS am Threonin 495 von noch wichtigerer Bedeutung ist. Die Dephosphorylierung ist enorm wichtig für die Assoziation von Calmodulin an die eNOS. Diese benötigt die Anwesenheit von Kalzium.

Phosphorylierung am Threonin 495 verhindert die Bindung an Calmodulin und damit die NO-Produktion.

Zusammenfassend ist zu sagen, daß für die maximale Aktivierung der eNOS bei physiologischen Kalziumkonzentrationen die Phosphorylierung am Serin 1177 und die Dephosphorylierung von Threonin 495 essentiell ist [Fleming *et al.* 2001].

Die Phosphorylierung verstärkt den Elektronenfluss über die Reduktasedomäne und reduziert die Calmodulindissoziation von der eNOS [McCabe *et al.* 2000], was die Voraussetzung ist für eine verstärkte NO-Produktion.

Simultane Änderungen in der De- und Phosphorylierung am Serin 1177 und Threonin 495, welche zum einen in der Reduktasedomäne und zum anderen in der Calmodulinbindungsregion der eNOS lokalisiert sind, werden durch mehrere Kinasen und Phosphatasen reguliert. Diese binden und dissoziieren kontinuierlich am eNOS-Signal-Komplex, als Antwort auf verschiedenliche Stimuli. Mit der eNOS assoziierte Proteine wie Caveolin oder Hitzeschockprotein 90 und andere bilden dabei das Gerüst für die Formation des Proteinkomplexes [Fleming und Busse, 2003]. Das Zusammenspiel der einzelnen Komponenten, die zu einer Aktivierung der eNOS führen ist weiter zu großen Teilen unklar.

#### 1.6. Wirkung von NO

NO vermittelt im Organismus vielfältige Wirkungen. Wichtigstes Zielenzym des durch die nNOS und eNOS freigesetzten NO ist die lösliche Guanylylcyclase (sGC). NO bewirkt ihre Aktivierung, was zu einer gesteigerten Produktion an cGMP führt. cGMP

wiederum aktiviert u.a. die Proteinkinase G (PKG), welche durch Phosphorylierung von verschiedenen Zielproteinen z.B. eine Vasodilatation bewirken kann [Forth *et al.*, 2001].

Durch die eNOS gebildetes NO bewirkt eine Relaxation der Blutgefäße, da es über cGMP den Tonus der vaskulären Muskelzellen reduziert.

An bovinen aortalen Endothelzellen wurde gezeigt, daß die Produktion von NO größer ist, wenn anwachsende Scherkräfte am Endothel wirksam werden, als nach Agonistenstimulation. Die Scherkräfte am Gefäßendothel sorgen für eine vermehrte Phosphorylierung der eNOS und damit für einen vermehrten Anstieg von NO. Dazu ist kein Anstieg des intrazellulären Kalziums erforderlich [Corson *et al.* 1996].

NO schützt vor Plättchenaggregation *in vivo* [Yao *et al.* 1992] und verhindert eine Plättchenadhäsion an das Gefäßendothel [Radomski *et al.* 1987], luminal abgegebenes endotheliales NO bewirkt durch Stimulation der sGC in Thrombozyten eine reduzierte Thrombozytenaggregation und –adhäsion [Forth *et al.*, 2001]; auch die Adhäsion von Leukozyten an die Gefäßwand wird supprimiert [Lefer 1997]. Weiterhin hat es einen vasoprotektiven Effekt durch die Reduzierung von Superoxid-Radikalen in Gefäßen [Loscalzo *et al.* 1995]; die Proliferation von glatten Muskelzellen in Gefäßen wird in Gegenwart von NO vermindert [Forth *et al.*, 2001].

## 1.7. eNOS und Atherosklerose

### 1.7.1 Atherosklerose und deren Bedeutung

Die häufigste Todesursache in Europa und Nordamerika ist die Atherosklerose. Atherosklerotische Läsionen sind Ursache klinischer Erkrankungen wie der koronaren Herzkrankheit (KHK), Aneurysmen, arterielle Verschlusskrankheit (AVK), vor allem der unteren Extremität, zerebrovaskulärer Erkrankungen, Niereninsuffizienz, der Angina abdominalis und weiterer Erkrankungen [Windler *et al.*, 2002].

Etwa 30 % aller Todesfälle lassen sich auf den akuten Herzinfarkt oder dessen chronischen Folgen zurückführen [Wang *et al.*, 2000]

### 1.7.2. Risikofaktoren der KHK

Die bedeutendste Studie zum Risikofaktorenkonzept der Entstehung der Arteriosklerose und damit der koronaren Herzkrankheit ist wohl die Framingham-Studie. Dabei handelt es sich um eine epidemiologische Langzeitstudie, dabei wurden seit 1948 in der

amerikanischen Kleinstadt Framingham die Gesundheit von über 5000 Frauen und Männern im Alter zwischen 30 - 62 Jahren über deren gesamtes Leben hin überwacht. Die Daten der Framingham- Studie und anderer Studien zeigen folgende Risikofaktoren auf, die in nicht beeinflussbare und beeinflussbare Risikofaktoren unterteilt werden können [Castelli *et al.*,1986].

Nicht beeinflussbare Risikofaktoren sind:

- familiäre Disposition
- Lebensalter
- männliches Geschlecht

Beeinflussbare Risikofaktoren sind:

- Fettstoffwechselstörungen
- Bluthochdruck
- Diabetes mellitus
- Rauchen

Neue potentielle Risikofaktoren, die derzeit noch Gegenstand weiterer Studien sind:

- hohe Lipoprotein (a) - Plasmaspiegel
- Hyperhomozysteinämie
- Marker für Hämostase und Entzündung (z.B. Fibrinogen, CRP)
- psychosozialer Stress
- Bewegungsmangel, Ernährung und Adipositas
- CETP- Polymorphismus
- Infektionen (z.B. Chlamydien)
- niedrige Antioxidantien- Konzentrationen, reaktive Oxidantien (ROS) [Ross *et al.*,1999]
- T-Allel Polymorphismus der eNOS (Glu298Asp) [Shimasaki *et al.* 1998 und Hibi *et al.* 1998]

Ein deutsches Äquivalent der Framingham-Studie ist die multizentrische „prospektive cardiovaskuläre Münster- Studie“ (PROCAM). Bei einer Untersuchung von über 18000 Personen konnten die potenzierenden Effekte einzelner Risikofaktoren dargestellt werden [Schulte *et al.*, 1999]. Die Ergebnisse ermöglichen eine quantifizierbare Risikoermittlung und sind unter [www.chd-taskforce.de](http://www.chd-taskforce.de) abfragbar [Assmann *et al.*, 2002].

### 1.7.3. Pathogenese und Klinik der Atherosklerose

Die Atherosklerose an sich ist nicht eine Krankheit im eigentlichen Sinn, sie trägt aber hauptsächlich zur Pathogenese des Myokardinfarkts, des zerebralen Insults und der Gangrän und dem Verlust von Extremitäten bei.

Der Prozess, der zur Atherosklerose führt beinhaltet die Bildung von fibro-atherösen Plaques, der von Entzündung begleitet wird. Zunächst ist dies eine normale Reaktion des Endothels der Gefäße auf Läsionen der Arterienwand. Erst die exzessive Bildung eines entzündlich-fibroproliferativen Plaques, führt dann zu den häufig tödlichen Auswirkungen der Atherosklerose [Ross, 1993].

Diese Plaques führen zur Verdickung der Intima und zu mangelnder Elastizität der Arterienwände. Diese atherosklerotischen Veränderungen lassen sich im ganzen Körper nachweisen, vor allem die Aorta mit ihren Ästen, die Koronararterien und Karotiden sind betroffen.

Stary [Stary, 1989] teilte die atherosklerotischen Läsionen in sieben, fließend ineinander übergehende Stadien ein. Zunächst bildet sich ein sogenannter „Fatty Streak“, ein Aggregat aus lipidreichen Makrophagen und T-Lymphozyten, die sich in der innersten Wand der Arterie, der Intima ansammeln, diese konnten in Gefäßen von Kindern und nachgewiesen werden. Der Weg führt dann über Präatherom, Atherom zum Fibroatherom über die Proliferation glatter Muskelzellen, bis hin zu den manifesten komplizierten Läsionen, die am Ende sklerosieren und verkalken können.

Die Geschwindigkeit der Progression der Atherogenese hängt von vielen Faktoren ab, dabei spielt das Risikofaktorenmodell eine zentrale Rolle. Das Atherom kann über viele Jahre oder auch das ganze Leben stabil bleiben und nur selten Symptome, wie eine stabile Angina pectoris oder eine Claudicatio intermittens auslösen. Kommen aber weitere Faktoren hinzu, kann dies eine zunehmende Plaqueinstabilität bedingen, die gravierendere und akute Symptomen auslösen kann, wie einen Herzinfarkt oder einen Schlaganfall.

In den letzten Jahren konnten wir viel über die Mechanismen der Plaqueformation, -stabilisation und -ruptur lernen und einige Hauptfaktoren der Atherogenese konnten identifiziert werden. Es wird immer klarer, dass die Lipoproteine geringer Dichte, die LDL, eine zentrale Rolle im Prozess der Atherogenese spielen [Wandler et al.,2002 und Steinberg,1995].

#### 1.7.4. Pathogenetische Zusammenhänge der eNOS und Atherosklerose/KHK

Auf Grund der vielfältigen Wirkungen von NO reguliert die endotheliale NO-Synthase mittels ihrer NO-Produktion die vaskuläre Homöostase. So ist NO als potenter Vasodilatator aller Blutgefäße ein physiologischer Gegenspieler zu den Vasokonstriktoren des sympathischen Nervensystems und des Renin-Angiotensin-Systems [Li und Förstermann, 2000].

Zusätzlich zu den vasodilatatorischen Eigenschaften beeinflusst das endotheliale NO die Angiogenese und vermindert die DNA-Synthese und somit auch die Proliferation von glatten Muskelzellen [Nakaki *et al.*, 1990; Nunokawa und Tanaka, 1992]. Außerdem reduziert endotheliales NO die Leukozytenadhäsion ans Endothel und die Leukozytenmigration in die Gefäßwand. Dies wird durch eine verminderte Expression der Oberflächenadhäsionsmoleküle CD11/CD18, P-Selektin, dem vaskulären Zelladhäsionsmolekül-1 (VCAM-1) und dem intrazellulären Adhäsionsmolekül-1 (ICAM-1) vermittelt [Li und Förstermann, 2000].

Darüber hinaus reduziert NO die Aufnahme von Lipoproteinen in die Gefäßwand [Cardona-Sanclemente und Born, 1995] und verhindert die Oxidation von dem „low density lipoprotein“ (LDL) [Li und Förstermann, 2000]. Des weiteren reduziert NO die Plättchenaggregation und Plättchenadhäsion an die Gefäßwand [Radomski *et al.*, 1987; Alheid *et al.*, 1987].

Betrachtet man die vielen Wirkungen von NO im vaskulären System, liegt der Verdacht nahe, daß viele kardiovaskuläre Erkrankungen mit einer Störung der eNOS bedingten NO-Produktion oder NO-Bioverfügbarkeit in Verbindung stehen.

Die verminderte NO-Verfügbarkeit trägt zu systemischen Bluthochdruck, Atherosklerose und Dysfunktion in den Atemwegen bei [Shaul, 2002].

Es konnte nachgewiesen werden, dass Patienten und Tiere, welche kardiovaskulären Risikofaktoren wie Hypercholesterinämie, Diabetes mellitus, Bluthochdruck und Rauchen ausgesetzt sind, eine reduzierte NO-Produktion oder eine verringerte NO-Halbwertszeit aufweisen [Li und Förstermann, 2000].

Eine neueste deutsche Arbeit um Hambrecht untersuchte Patienten mit einer stabilen KHK, dabei wurde die LIMA als Zielarterie für die Untersuchung verwendet.

Dabei traten drei bedeutende Ergebnisse zu Tage:

1. Körperliches Training verbessert die Agonisten-vermittelte Endothel-abhängige vasodilatatorische Kapazität der LIMA bei Patienten mit KHK.

2. Dieser Prozess ist begleitet von einer vermehrten eNOS-Protein Expression und einer vermehrten- wahrscheinlich Akt-abhängigen- Phosphorylierung der eNOS am Ser<sup>1177</sup>.
3. In vivo korreliert die eNOS Phosphorylierung am Ser<sup>1177</sup> mit der Verbesserung der endothelialen Funktion [Hambrecht *et al.*, 2003].

So wird wiederum deutlich, welchen Einfluss die Funktion der eNOS auf eine bestehende KHK hat.

#### 1.7.5. Hypercholesterinämie

Der Zusammenhang zwischen Fettstoffwechselstörungen und der KHK- Inzidenz konnte in der Framingham- Studie [Castelli *et al.*, 1995] bewiesen werden. In der „Multiple Risk Factor Intervention Trial“- Studie (MRFIT) [Stamler *et al.*, 1986], der bislang mit über 350 000 Männern im Alter von 35 - 57 Jahren größten Populationsstudie, konnte ein linearer Zusammenhang zwischen ansteigenden Serumcholesterinwerten und der Herz-Kreislaufsterblichkeit gezeigt werden.

Die Hypercholesterinämie ist damit ein kausaler Faktor der Arteriosklerose. Hohe LDL (Low-Density-Lipoprotein)-Spiegel führen zu Plaques, was in einer Lumenverlegung von Arterien endet [Ross 1993]. Es wurde beobachtet, daß chronisch erhöhte Serum-Cholesterol-Werte oft mit verschlechterter endothelialer Vasodilatation verbunden ist [Seiler *et al.* 1993]. Diese endotheliale Dysfunktion wird auf eine Imbalance zwischen Vasodilatoren und Vasokonstriktoren zurückgeführt.

Oxidativer Stress, der durch proinflammatorische Zytokine oder Oxidantien induziert wird, aktiviert den Tyrosin-Kinase-Signalweg. Ein Anwachsen des oxidativen Stresses durch H<sub>2</sub>O oder durch Inhibitor der endogenen Protein-Tyrosin-Phosphatase verstärken die eNOS-Tyrosin-Phosphorylierung, die die eNOS-Aktivität reduziert [Garcia-Cardena *et al.* 1996].

Vor dem Hintergrund, daß kardiovaskuläre Leiden wie Arteriosklerose, diabetische Gefäßprobleme, Reperfusionsschämien und Bluthochdruck mit vermehrtem oxidativen Stress und endothelialer Dysfunktion vergesellschaftet sind [Gibbons und Dzau 1996], wird deutlich, daß dies die Aktivität der eNOS vermindert und damit weniger NO zur Gefäßdilatation zur Verfügung steht, was die kardiovaskulären Probleme noch verstärken kann.

Der Einfluss von erhöhten LDL-Konzentrationen auf die eNOS-Expression und eNOS bedingte NO-Bildung wurde in der Vergangenheit kontrovers diskutiert [Liao *et al.*, 1995; Hirata *et al.*, 1995].

In einer neueren Studie mit bovinem Aortenendothel wurden die Zellen mit Serum von Patienten mit normalen Cholesterinwerten und mit Serum von Patienten mit erhöhten Cholesterinwerten kultiviert. Dabei zeigte sich, daß hohe Spiegel an LDL-Cholesterol (LDL-C) die Produktion von NO in Endothelzellen drastisch vermindern kann. In Folge der Hypercholesterinämie kommt es wahrscheinlich zu einer Überexpression des Caveolin 1 und damit zu einer Heterokomplexbildung mit der eNOS. Dies hält die eNOS in einem inaktiven Zustand und führt konsekutiv zu einer verminderten NO-Produktion [Feron *et al.* 1999].

Der Caveolin-Überschuss ist so eine mögliche Erklärung für die endotheliale Dysfunktion bei Patienten mit Hypercholesterinämie und die proatherogenen Effekte. Studien, die den Effekt von lipidsenkenden Medikamenten auf die NO-Produktion untersuchten, bestätigen dies [Feron *et al.* 2001]. In diesen Experimenten wurde gezeigt, daß Statine die Produktion von Caveolin 1 inhibieren und es gibt ein antagonistisches Zusammenspiel zwischen LDL-Konzentrationen und Statinen auf die Produktion von Caveolin 1.

Eine cholesterinreiche Diät bei Ratten führte beispielsweise zu einer erhöhten Superoxidproduktion und somit zu einer geringeren NO-Bioverfügbarkeit [Ohara *et al.*, 1993; Minor, Jr. *et al.*, 1990]. Die erhöhte Superoxidkonzentration wiederum wird verantwortlich gemacht für die bei Hypercholesterinämie beobachtete geringere Konzentration an vollständig reduzierten Biopterin, dem BH<sub>4</sub>. Dies wiederum bewirkt eine geringere eNOS bedingte NO-Produktion und eine erhöhte eNOS bedingte Superoxidproduktion [Wever *et al.*, 1998]. Eine Forschergruppe um Olivier Feron konnte 1999 zeigen, dass cholesterinreiches Blut an Endothelzellen eine deutlich reduzierte eNOS Aktivität bewirkt [Feron *et al.*, 1999]. Außerdem wurde bei hypercholesterinämischen Ratten und Menschen eine erhöhte Plasmakonzentration des endogenen eNOS Hemmers Dimethyl-L-Arginin nachgewiesen [Li und Förstermann, 2000]. Bei diabetischen Tieren und Menschen wurde eine verminderte arterielle Gefäßerweiterung festgestellt [Luscher *et al.*, 1993]. Auch bei Patienten mit Bluthochdruck konnte eine verminderte endothelabhängige Gefäßerweiterung festgestellt werden, welche über die eNOS vermittelt sein könnte [Linder *et al.*, 1990].



Ein weiterer Faktor, der für die Funktion, bzw. Dysfunktion der eNOS verantwortlich sein könnte, ist die Tatsache, daß oxidiertes LDL als Cholesterol-Akzeptor in der Plasmamembran dient, wodurch wiederum die spezialisierte Lipidumgebung der Caveolae verändert wird (Cholesterol wird den Caveolae entzogen), dadurch wird die eNOS von der Plasmamembran in intrazelluläre Domänen verbracht, wodurch die Kapazität der Enzymaktivierung deutlich reduziert zu werden scheint [Blair *et al.*, 1999].

Eine neueste Arbeit um Ramet untersuchte die Wirkung von HDL (High-Density-Lipoprotein) auf den eNOS-pathway, dabei wurde erstmals festgestellt, daß HDL sowohl die extrazelluläre Signal-regulierte Kinase 1/2 (ERK1/2), als auch Akt aktiviert, was zu einer Akkumulation des eNOS-Proteins über eine Proteinstabilisierung führt [Ramet *et al.*, 2003].

Ein hohes HDL gilt als protektiver Faktor zur Verhütung einer KHK. Der genaue Mechanismus ist dabei noch nicht geklärt. Vielleicht ist der Eingriff des HDL in den eNOS pathway dabei ein Teilaspekt.

HDL kann in der Gegenwart von oxidiertem LDL den Caveolae Cholesterolester zur Verfügung stellen (oxidiertes LDL entzieht den Caveolae Cholesterol), und kann hiermit die Gesamt-Lipideinheit der Caveolae erhalten. Dadurch wird es der eNOS ermöglicht an die Caveolae zu binden und steht dort einer Aktivierung zur Verfügung. Dies kann einer der potenten antiatherogenen Effekte des HDL darstellen [Uittenbogaard *et al.*, 2000].

Umgekehrt sind niedrige Spiegel von HDL ein Risikofaktor für die Entstehung einer KHK. So konnte eine amerikanische Arbeit zeigen, daß das Anheben des HDL mittels Niacin bei Patienten mit einer KHK, zu einer verbesserten Endothelfunktion führt [Kuvin *et al.*, 2002].

### 1.8. eNOS-Gen

Das humane eNOS-Gen ist als einzelne Kopie im haploiden humanen Genom vorhanden und ist auf 7q35-36 lokalisiert. Die 4052 nt mRNA ist abgeleitet von 26 Exons, die über 21 Kilobasen des humanen eNOS-Gens verteilt sind [Marsden *et al.* 1993 und Nadaud *et al.* 1994].

Die mRNA der eNOS ist sehr endothelzellspezifisch [Karantzoulis-Fegaras *et al.* 1999] und umfasst 4 Kb.

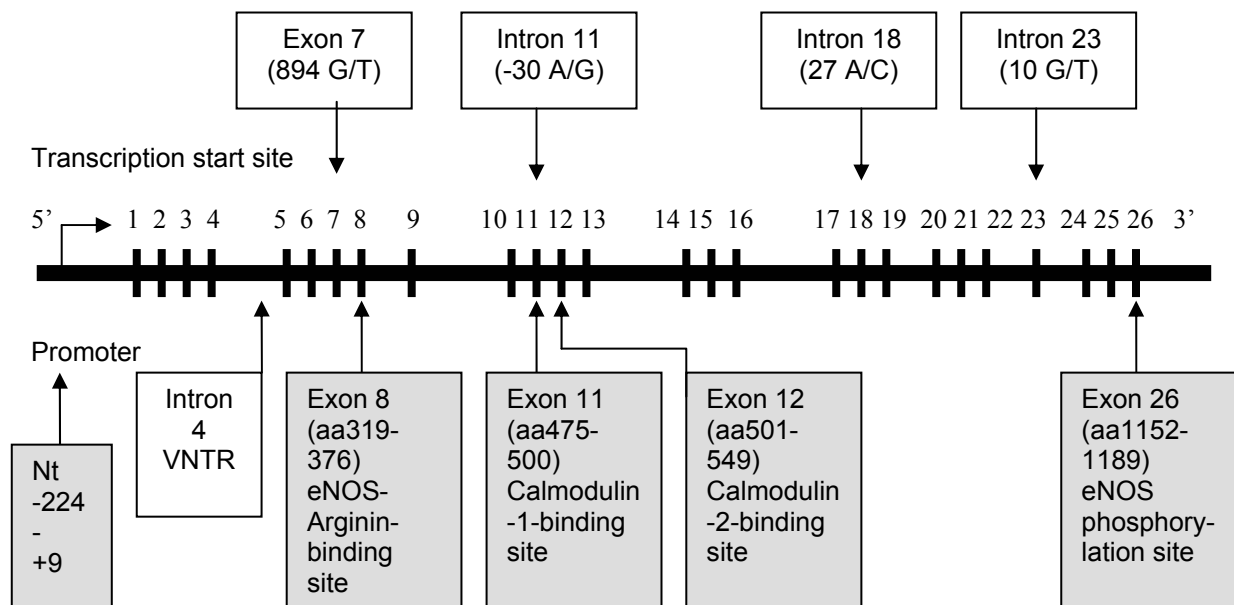
Das mRNA-Transkript der eNOS hat normalerweise eine Halbwertszeit von mehr als 24-48 Stunden. Der Tumor-Nekrose-Faktor alpha [Yoshizumi *et al.* 1993 und Marsden *et al.* 1992], Hypoxie [McQuillan *et al.* 1994] und oxidiertes LDL [Liao *et al.* 1995] verändern die Halbwertszeit der mRNA so, daß sie nur noch ein paar Stunden beträgt. Die Anzahl der Aminosäuren beträgt 1203 und die eNOS hat ein Molekulargewicht von 133kDa [Alderton *et al.* 2001]. Einen Überblick über den Aufbau des eNOS Gens gibt Abbildung 4.

**Abbildung 4:** Struktur des Gens der endothelialen Stickoxydsynthase-  
Schemata zum eNOS Gen.

Die Abbildung zeigt die Aufteilung in Promoter, Exons und Introns mit Lokalisation einiger der Polymorphismen. Es ist auch der G/T-Polymorphismus an der Position 894 aufgeführt, der auch im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurde.

Im unteren Teil der Abbildung sind schematisch die Genregionen aufgeführt, die im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden (Promoterregion, eNOS-Arginin binding site auf Exon 8, Calmodulin-1-binding site auf Exon 11, Calmodulin-2-binding site auf Exon 12 und eNOS phosphorylation site auf Exon 26). Sie sind grau unterlegt.

Aus Hingorani *et al.*, 1999.

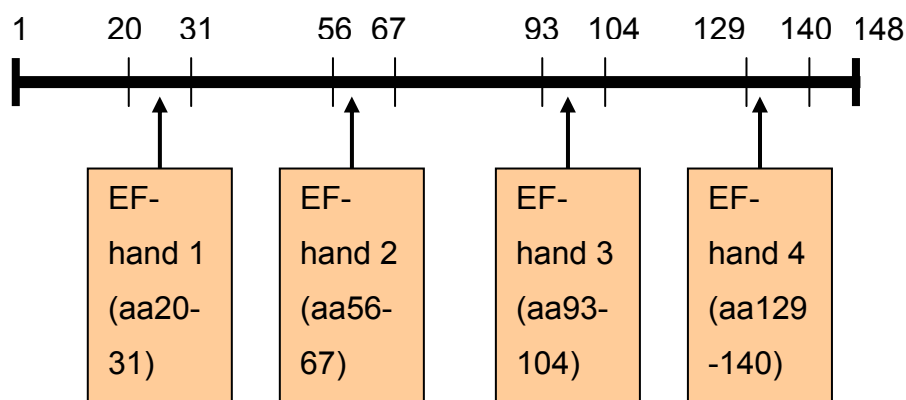


### 1.9. Calmodulin-Gen

Das humane Calmodulin (CALM1) enthält sechs Exons, die sich über 10kb genomische DNA erstrecken. Die genetische Information liegt auf Chromosom 14 (14q24-q31). Calmodulin besteht aus 148 Aminosäuren. Das Molekulargewicht beträgt 16706 Dalton. Das Protein besitzt 4 Kalzium-Bindungsstellen (EF-hand 1-4 siehe Abb. 5). Bisher wurden zwei verschiedene CALM1 zugehörige Klone für Pseudogene gefunden. CALM1P1 und CALM1P2 wurden isoliert und charakterisiert. Beide Pseudogene enthalten keine Introns und sind funktionslos [Rhyner *et al.* 1994].

#### **Abbildung 5:** Calmodulin und seine Kalzium-Bindungsstellen

Es wurden die 148 Aminosäuren aufgetragen (0,75mm entspricht etwa einer Aminosäure- zur besseren Übersicht wurde der Maßstab teils nicht korrekt eingehalten). Die vier Kalzium-Bindungsstellen am Calmodulin sind Rot unterlegt dargestellt (EF-hand 1-4). Aus OMIM accession number \*114180.



### 1.10. Caveolin-1-Gen und Mutationen

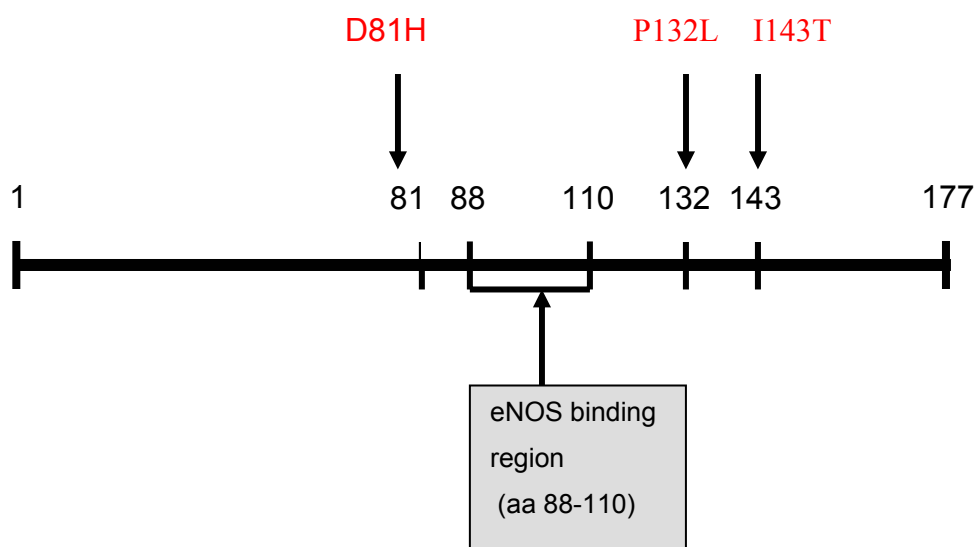
Das Caveolin-1-Gen ist auf dem Chromosom 7q31.1 lokalisiert. Caveolin-1 umfasst 177 Aminosäuren und sein Molekulargewicht beträgt 20340 Dalton. Die Abbildung zeigt drei bekannte Mutationen. An der Position 81 wurde die Punktmutation D81H und an der Position 143 die Punktmutation I143T beschrieben [Glenney 1992].

An der Position 132 wurde in Brusttumoren eine Punktmutation P132L beschrieben. Sie scheint zu bewirken, daß sich missgefaltete Oligomere bilden, die dann im Golgi-

Komplex verbleiben und nicht zu den Caveolae oder der Plasmamembran transportiert werden [Lee *et al.* 2002]. Eine Übersicht gibt Abb. 6.

#### Abbildung 6: Caveolin-1-Gen und Mutationen

Aufgetragen sind die 177 Aminosäuren des Caveolin (0,75nm entsprechen etwa einer Aminosäure, zur besseren Übersicht wurde der Maßstab teils nicht eingehalten). In roter Schrift sind drei Punktmutationen eingezeichnet. Außerdem ist der Genbereich (grauer Kasten) aufgetragen, der im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurde. Es handelt sich dabei um die eNOS-Bindungs-Region (eNOS binding region/ aa88-110) [Garcia-Cardena *et al.* 1997 und Glenney 1992]. Aus <http://kr.expasy.org/sprot/> accession number Q03135 und NCBI nucleotide accession number NM\_001753.

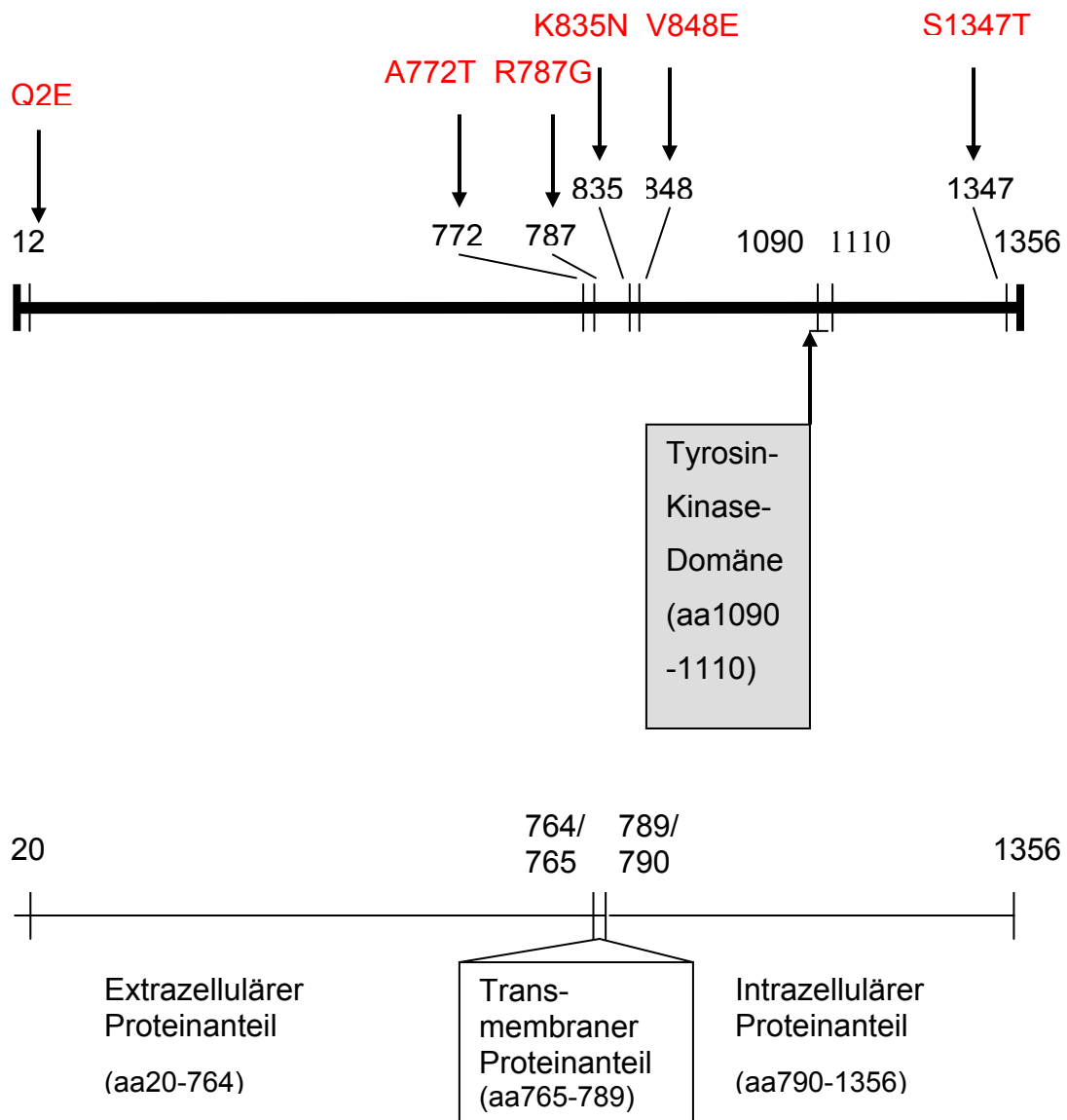


#### 1.11. VEGF-R-2-Gen und Mutationen

Der vascular endothelial growth factor receptor 2 ist ein Protein, das aus 1356 Aminosäuren aufgebaut ist und ein Gewicht von 151526 Dalton hat. Er besteht aus einem extrazellulären, einem transmembranen und einem intrazellulären Proteinanteil, ist der Rezeptor für VEGF oder VEGFC und besitzt eine Tyrosin-Proteinkinase. Der VEGF-Ligand spielt eine Schlüsselrolle in der Regulation der vaskulären Permeabilität. Die Proteinkinase funktioniert nach folgendem Prinzip:  $\text{ATP} + \text{Tyrosin} = \text{ADP} + \text{Tyrosinphosphat}$  [Terman *et al.* 1991]. Eine Übersicht gibt Abbildung 7.

**Abbildung 7:** VEGF-R-2-Gen und Mutationen

Die Abbildung zeigt VEGF-R-2, welches 1356 Aminosäuren umfasst (1mm entspricht etwa einer Aminosäure). Es ist die Tyrosin-Kinase-Domäne (aa1090-1110) aufgetragen (grau unterlegt), die auch im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurde. Sechs bekannte Punktmutationen in Rot gehalten werden im oberen Teil der Abbildung dargestellt [Herley *et al.* 1999 und Terman *et al.* 1991]. Im zweiten Teil der Graphik wird schematisch gezeigt, wie sich die verschiedenen Proteinanteile auf die Aminosäuren verteilen. Aus <http://kr.expasy.org/sprot/> accession number P35968.



### 1.12. T-Allel Polymorphismus der eNOS (Glu298Asp) und Assoziation mit KHK

Eine Assoziation zwischen dem T-Allel Polymorphismus und Koronarspasmen wurde 1998 gefunden. Im Rahmen einer Studie wurde ein möglicher Zusammenhang zwischen Koronarspasmen und einer verminderten Aktivität der endothelialen Stickoxydsynthase untersucht. Dabei fand man in der Gruppe der Patienten mit Koronarspasmen eine Punktmutation im eNOS Gen am Nukleotid 1917 im Exon 7 wodurch Guanin durch Thymin ersetzt wird, was zu einem Austausch der Aminosäure Glutamat durch Aspartat (Glu298Asp) führt. Dieser Polymorphismus zeigte sich als signifikant öfter vorkommend bei Patienten mit Koronarspasmen als in einer Kontrollgruppe [Yoshimura *et al.* 1998].

Es wurde auch ein höheres Myokardinfarkttrisiko in Zusammenhang mit dem T-Allel Polymorphismus beschrieben [Shimasaki *et al.* 1998 und Hibi *et al.* 1998].

Eine Assoziation des Polymorphismus mit KHK ist kontrovers zu betrachten. Hingorani *et al.* zeigte einen direkten Zusammenhang zwischen dem Glu298Asp Polymorphismus und einer koronaren Herzkrankheit [Hingorani *et al.* 1999], während verschiedene andere Studien diesen Zusammenhang nicht nachweisen konnten [Liyou *et al.* 1998 und Cai *et al.* 1999].

Eine Giessener Studie zeigte nur bei jüngeren Patienten mit einem zusätzlichen koronaren Risikofaktor ein höheres Risiko einer KHK [Gardemann *et al.* 2002].

Eine neueste Arbeit aus Italien konnte den Nachweis erbringen, daß sowohl der Glu298Asp-, als auch der T786C Polymorphismus mit der Präsenz, der Ausdehnung und auch der Schwere einer angiographisch definierten KHK in der italienischen Bevölkerung assoziiert ist [Colombo *et al.*, 2003]. Bei Auftreten beider Polymorphismen bei einem Patienten scheint das Risiko der Entwicklung einer KHK noch größer zu sein.

Eine tschechische Arbeit über den Zusammenhang eines essentiellen Hypertonus und dem Polymorphismus konnte ein signifikant höheres Vorkommen in der Gruppe der Hypertoniker feststellen. Interessant ist auch, daß in der Arbeit die Patienten, die sich unter Therapie gut einstellen ließen und die, die gegen eine antihypertensive Therapie resistent waren aufgesplittet wurden, dabei zeigte sich die Tendenz, daß unter den Non-Respondern das T-Allel häufiger auftritt, wenn auch keine statistische Relevanz erreicht wurde [Jáchymová *et al.*, 2001]. Vor dem Hintergrund, daß ein Hypertonus als wichtiger Risikofaktor für die Entstehung einer KHK bekannt ist, muss postuliert werden, daß der Polymorphismus eine Rolle in der Entwicklung einer KHK spielt.

Auch im Rahmen dieser Arbeit wurde der T-Allel Polymorphismus bei koronarangiographierten Patienten mit nachgewiesener KHK untersucht.

#### 1.13. „Marburger KHK-Präventionsprojekt“

In diesem Projekt werden die klinisch relevanten Daten aller herzkatheterisierten Patienten erfasst. Dies macht möglich, die Laborwerte des präventivkardiologischen Routinelabors mit des Daten des Angiographiebefundes mittels des Computerprogramms CARDDAS zu verknüpfen und optimierte Therapieempfehlungen für die Patienten zu erstellen [Schäfer *et al.*, 2000].

Weiterhin werden Risikofaktoren wie Adipositas oder Nikotin erfasst.

Dabei wird jedem Patienten nach dessen Zustimmung bei einer Koronarangiographie Blut für die Bestimmung von KHK relevanten Risikofaktoren entnommen und Cholesterol, LDL-Cholesterol, HDL-Cholesterol, Triglyceride etc. bestimmt.

Damit kann für jeden einzelnen Patienten ein Risikoprofil erstellt und dieses individuell behandelt werden. Die Blutproben können bei klinisch relevanten Auffälligkeiten bei Bedarf weiter analysiert werden. Durch die umfassende Erhebung der individuellen Risikofaktoren ist zum einen eine optimale Therapieempfehlung für die Patienten möglich und in anonymisierter Form können die Daten als regionales KHK-Register ausgewertet werden. Das Projekt wurde von der universitätsinternen Ethikkommission genehmigt.

## 2. Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

Die Atherosklerose ist die bedeutendste Todesursache in den westlichen Industrienationen. Die koronare Herzkrankheit ist die klinisch bedeutendste und am häufigsten letal verlaufende Manifestation der Atherosklerose. Die Hypercholesterinämie ist dabei ein zentraler pathogenetischer Faktor in der Entstehung. Der Aktivität der eNOS kommt dabei eine große Rolle zu. Die endotheliale Dysfunktion wird gesteuert über die Störung der intrazellulären Freisetzung der eNOS, sowie die negative Beeinflussung der Interaktion mit wichtigen Modulatoren.

Bisher durchgeführte Mutationsscreening-Studien identifizierten einen Polymorphismus im Exon 7 des eNOS-Gens, der einen Austausch der Aminosäure Glu298Asp bewirkt und mit einem erhöhten KHK Risiko in Verbindung gebracht wurde. Untersuchungen in unterschiedlichen Populationen (Australien, England, Japan, Deutschland) hinsichtlich dieses Polymorphismus erbrachten widersprüchliche Ergebnisse und ließen keinen eindeutigen Schluss zu.

Da sich bisher noch keine Studie größeren Umfangs der Untersuchung von genetischen Mutationen in anderen Regionen der eNOS, die funktionell wichtige Domänen kodieren (Substratbindung, Phosphorylierungsstellen, Calmodulinbindung), sowie der Untersuchung weiterer wichtiger Gene modulierender Faktoren des *Nitric Oxide Pathway* (Caveolin I, VEGF-RII, Akt-Kinase I) gewidmet hat, war es Ziel dieser Arbeit ein Kollektiv von 795 Patienten des „Marburger Präventionsmodells“ nach möglichen Mutationen in diesen Genbereichen, welche die Funktion der eNOS negativ beeinflussen und mit KHK assoziiert sein könnten, untersucht werden.

Daneben sollte noch der vorbeschriebene eNOS Polymorphismus (Glu298Asp), dessen Assoziation hinsichtlich der KHK kontrovers diskutiert wird, untersucht werden.



### 3. Material und Methoden

#### 3.1. Studiendesign

##### 3.1.1. Patientenkollektiv

Im Rahmen des „Marburger Präventionsmodells“ werden von allen Patienten, die sich einer Herzkatheteruntersuchung im Universitätsklinikum Marburg, Klinik für Innere Medizin, Abteilung Kardiologie, unterziehen und mit der Teilnahme an diesem Projekt einverstanden sind, Vollblutproben entnommen, sowie demographische Parameter und auch das komplette kardiovaskuläre Risikoprofil erfasst. Aus ihnen wurde die notwendige DNA isoliert. Alle Studienteilnehmer hatten vor Aufnahme in diese Studie schriftlich ihr Einverständnis erklärt. Die Studie selbst war durch die Marburger Ethik-Kommission genehmigt worden. Die Patienten wurden auf Mutationen des eNOS-Gens und modulierender Faktoren gescreent.

Eine Subgruppe von **795** konsekutiv gesammelten Patienten wurde untersucht.

Das Alter der untersuchten Patienten betrug im Median 64 Jahre. Der jüngste Patient war 22 Jahre, der älteste 86 Jahre. Es handelte sich zu 75% um Männer, zu 25% um Frauen.

Die Koronarangiographiebefunde ergaben: 18% Ausschluss KHK, 7% Koronarsklerose ohne signifikante Stenosen, 23% 1-Gefäß-KHK, 24% 2-Gefäß-KHK und 28% 3-Gefäß-KHK.

##### 3.1.2. Chemikalien

<b>Biorad</b> (California, USA)	Agarose, APS
<b>Calbiochem</b> (Merck, Darmstadt, Deutschland)	Lithiumchlorid
<b>Fresenius Kabi</b> (Bad Homburg, Deutschland)	Ampuwa
<b>Gibco</b> (UK)	Magnesiumchlorid, PCR-Puffer, Taq-Polymerase
<b>Invitrogen</b> (Paisley, Schottland)	Primer
<b>Merck</b> (Darmstadt, Deutschland)	Dimethylsulfoxid, Glycerin, Guanidiniumthiocyanat, Mercaptoethanol, Salzsäure
<b>Promega</b> (Madison, USA)	dNTP, PCR-Marker

<b>Qiagen</b> (Hilden, Deutschland)	Gel Extraction Kit (150)
<b>Riedel-de Haen</b> (Seelze, Deutschland)	Ethanol, Essigsäure, Isopropanol
<b>Roth</b> (Karlsruhe, Deutschland)	EDTA, Formamid deionisiert, Harnstoff, Roti-Phenol, Tris
<b>Serva</b> (Heidelberg, Deutschland)	Acrylamid, Bis-Acrylamid, SDS, TEMED, Triton X-100
<b>Sigma</b> (Taufkirchen, Deutschland)	Ethidiumbromid

**Tabelle 1:** Verzeichnis der verwendeten Chemikalien

### 3.1.3. Geräte

<b>ABIMED</b> (Langenfeld, Deutschland)	Schlauchpumpe Minipuls 3 M312
<b>Applied Biosystems</b> (Warrington, U.K.)	ABI Prism™ 377 DNA Sequenzer
<b>Applied Biosystems</b> (Warrington, U.K.)	Big Dye™ terminator cycle sequencing ready reaction kit
<b>Biorad</b> (California, USA)	Powerpack 300, Kammer Protean 2 Xi all, Mini-Sub, Cell GT
<b>Eppendorf</b> (Hamburg, Deutschland)	Zentrifuge 5414 S
<b>LKB</b> (Bromma, Schweden)	Thermostatic Circulator 2219 MultiTemp 2
<b>MJ Research</b> (Watertown, U.S.A.)	Cycler PTC-200

**Tabelle 2:** Verzeichnis der verwendeten Geräte

## 3.2. Molekulargenetik

Die Kapitelfolge der molekulargenetischen Untersuchungen ist nach den einzelnen Methoden eingeteilt und nicht nach dem tatsächlichen Ablauf der einzelnen Untersuchungen.

### 3.2.1. Strategien zum Mutationsscreening

Es existieren verschiedene Techniken zur schnellen Identifizierung von vorbeschriebenen oder neuen Genmutationen. Vor allem zwei Methoden haben sich hierzu durchgesetzt, die Analyse des „single strand conformation polymorphism“ (SSCP) und

die „denaturierende Gradientengelelektrophorese“ (DGGE). Mit der SSCP ist es möglich Fragmente zwischen 150 – 200 bp sehr einfach zu analysieren. Ein großer Nachteil ist, dass die Rate der detektierten Mutationen nur zwischen 80 – 90 % liegt. Dagegen können mittels der DGGE- Methode nahezu 100 % der Mutationen detektiert werden. Es ist möglich Fragmente bis zu einer Größe von 1000 bp zu analysieren.

Wegen oben genannter Gründe, verwendeten wir in unseren Untersuchungen die DGGE- Methode zum Screening auf Mutationen im eNOS-Gen und Genen modulierender Faktoren.

### 3.2.2. DNA- Gewinnung

Zur DNA- Isolierung wurde zu 200 µl Vollblut 600 µl DNA- Isolationslösung unter dem Abzug gegeben. 30 ml der DNA- Isolationspuffer- Stammlösung wurden mit 10 ml Roti- Phenol zur DNA- Isolationslösung gemischt.

Chemikalien	Menge
3M Guanidiniumisothiocyanat (GuSCN)	70,8 g
30 mM Tris- HCl (pH 7,0)	0,18 g
20g/l Triton X- 100	100 µl
15 mM EDTA	0,279 g
0,5 % SDS (sodium dodecyl sulfate)	0,25 g
2M Lithium Chlorid (LiCl)	4,2 g
5g/l β- Mercaptoethanol (filtriert)	0,25 g
3M Urea	9 g
Aqua bidest.	ad 200 ml

**Tabelle 3:** Zusammensetzung der Stammlösung des DNA- Isolationspuffers.

Der pH- Wert der Stammlösung wurde auf 7,2 eingestellt

- 200 µl Vollblut
- 600 µl Isolierungssolution
- 800 µl Isopropanol p.A.

- 1200µl 70 % Ethanol
- 200 µl Aqua bidest

In einem 1.5 ml Eppendorfgesäß wurden 200µl Vollblut aus einer Spenderprobe mit 600µl DNA-Isolierungs-Solution gemischt. Die Probe wurde anschließend 10 sec gevortext und 30-45 sec bei 1000 RPM abzentrifugiert. Ca. 800µl des wässrigen Überstandes wurden in ein neues Eppendorf überführt und mit 800µl Isopropanol p.A. gemischt. Anschließend wurde die Probe 2 min bei 100 RPM abzentrifugiert und der Überstand mit der Wasserstrahlpumpe vorsichtig abgesaugt. Gewaschen wurde das Pellet mit 1200 µl 70% igem Ethanol, für 20 sec bei 1000 RPM abzentrifugiert, der Überstand mit der Wasserstrahlpumpe vorsichtig abgesaugt und dann das Pelett gut trocken gelassen. Zum Schluss wurde das Pelett in 200 µl Aqua bidest aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei 4°C aufbewahrt, bzw. bei -20° gelagert.

### 3.2.3. Polymerase Chain Reaction (PCR)

Bei der Polymerasenkettenreaktion handelt es sich um ein Verfahren zur Vervielfältigung spezifischer Genbereiche, erfunden wurde sie von Kary Mullis [Mullis *et al.*, 1989] Mitte der achtziger Jahre . Dabei wird ein Oligonucleotidprimerpaar eingesetzt, das an den Entgegengesetzten Strängen hybridisiert, die die interessierende Region der Ziel-DNA flankieren. So wird nach Ablauf eines bestimmten Schemas, das Template Denaturierung, Primer Annealing und Prolongation der gebundenen Primer durch die DNA Polymerase beinhaltet, ein spezifisches DNA Fragment, daß durch das 5' Ende des Primers definiert ist, exponentiell vermehrt. Da nach einem Zyklus die synthetisierten Produkte wieder als Vorlage verwendet werden können, erhält man nach jedem Zyklus eine verdoppelte Menge an DNA Kopien. Im Ablauf der PCR ist es notwendig die DNA zu denaturieren, um zwei einzelne Stränge zu erhalten. Dazu benötigt man eine thermostabile Polymerase, da Temperaturen über 90°C notwendig sind. Diesen Bedingungen genügt die Taq-Polymerase, die als erstes aus *Thermus aquaticus* einem thermophilen Eubakterium, das in einer heißen Quelle im Yellowstone Nationalpark gefunden wurde, isoliert wurde [Chien *et al.*, 1976].

Wir verwendeten in dieser Arbeit die PLATINUM *Taq* DNA Polymerase (Größe 250 U) der Fa. GibcoBRL Life Technologies (USA).

Die PCR folgt nun einem Schema nachdem zuerst auf 94°C erhitzt wird, um die DNA-Stränge zu trennen, die dann als Matrizen für die Primer und die Polymerase dienen.

Anschließend wird die Temperatur auf 40-60°C abgesenkt um ein Binden der Primer an die DNA-Moleküle zu ermöglichen. Dieser Vorgang ist das so genannte Annealing. Dann wird die Temperatur wieder auf etwa 72°C erhöht, dem Temperaturoptimum für die Taq-Polymerase. Nun folgt wieder eine Temperaturerhöhung auf 94°C für 20 sec zur Trennung der doppelsträngigen DNA. Dieser Zyklus wird nun ca. 20-60x wiederholt.

Für die Amplifizierung benötigt man außer des Template, der Polymerase und der Primer noch einige andere Reagenzien. Dazu gehören das MgCl<sub>2</sub>, die Oligonukleotide und ein Puffer damit die Polymerase optimal arbeiten kann. Um die besten Bedingungen für die spezifische PCR zu finden ist es notwendig eine Optimierung durchzuführen. Zunächst wurde die Menge an MgCl<sub>2</sub> verändert. Es wurde je eine PCR mit 1mM, 1.5mM und 2mM MgCl<sub>2</sub> durchgeführt. Später wurde die Menge an MgCl<sub>2</sub> auf 1.6 mM eingestellt. Nachdem Versuche mit Glycerin nicht zu befriedigenden Ergebnissen geführt hatten, wurde DMSO zugefügt. Die Annealingtemperatur wurde ebenfalls verändert. Es fand sich ein Optimum bei 59°C für die Primer.

### ➤ *Amplifizierung*

Zur Vorbereitung der PCR wurden die Primerpaare der jeweiligen spezifischen Regionen gemischt. Dazu wurden zu 20µl des Primermix 80 µl Aqua bidest gegeben, um eine 10 pmol/ µl Lösung zu erhalten. Anschließend wurde eine 25 mM dNTP-Stammlösung aus dATP, dGTP, dCTP und dTTP hergestellt. Für den Ansatz der PCR-Proben wurden pro Probe 2.5 µl PCR-Puffer mit 0.82 µl MgCl<sub>2</sub> gemischt, dazu wurden 0.1 µl dNTP-Stammlösung, 1.25 µl DMSO, 16.23 µl Aqua bidest, 1µl Primermix und 0.1 µl Taq-Polymerase gemixt; das Gemisch dann vorsichtig gemischt. 3 µl des Template wurde je Probe in die PCR-Tubes vorgelegt. Dazu wurden 22 µl des Mastermix gegeben, so dass eine Endmenge von 25 µl je Probe erreicht wurde. Die Proben wurden dann im Cyclor unter folgenden Bedingungen amplifiziert:

Initiale Denaturierung bei 94°C für 3 min

35 Zyklen: Denaturierung bei 94°C für jeweils 30 s

Annealing bei 59°C für 15s

Extension bei 72°C für 45s

abschließende Extension bei 72°C für 5 min

Die Primerpaare für die Amplifikation der untersuchten Regionen von eNOS und modulierender Faktoren von eNOS wurden mit Primer 1-8 bezeichnet.

Die Übersicht gibt Tabelle 4.

Primer	Domäne	Genlocus (aa)	Literatur
1	Akt-1-Ser/Thr-Kinase Domäne	323-354	Downward 1998
2	Calmodulin 1-binding site	475-500	Marsden <i>et al.</i> , 1992
3	Calmodulin 2-binding site	501-549	Marsden <i>et al.</i> , 1992
4	Caveolin 1-eNOS binding site	65-129	Garcia-Cardena <i>et al.</i> , 1997, Glenney, 1992
5	eNOS-Arginin-binding site	319-376	Chen <i>et al.</i> , 1997
6	eNOS-phosphorylation site	1152-1189	Fulton <i>et al.</i> , 1999
7	eNOS-Promotor	Nt -224 -+9	Karantzoulis-Fegarast <i>et al.</i> , 1999
8	VEGFR-2 Kinase Domäne	1061-1109	Papapetropoulos <i>et al.</i> , 1997

**Tabelle 4:** Primerpaare, Genloci und Domänen

Die folgende Tabelle 5 gibt eine Übersicht über die verwendeten Genabschnitte und den Aufbau dieser. Weiterhin sind der Up- und Downstreamprimer, sowie die Exonabschnitte und die Fragmentlängen aufgeführt.

Gene	Downstream primer (5'-3')	Upstream primer (5'-3')	Exon	Fragment Länge (bp) Primernr.	Region (aa)
eNOS	AAGGCAGGAGACAGTG GATG	CAGTCAATCCCTTTGGTGCT	7	246 Glu298Asp Polymor- phismus	272-314
eNOS	* <u>AATTAACCCTCACTAA</u> <u>AGGG</u> CTTTACCTCCCCTCCCA ACCCCAT	<u>GTAATACGACTCACTATAG</u> <u>GGC</u> GTGTGTGTGGGAGAGCGGG GCT	11	224 Primer 2	475-500
eNOS	* <u>AATTAACCCTCACTAA</u> <u>AGGG</u> ACACCCTCACACCTTCC TC TC	<u>GTAATACGACTCACTATAG</u> <u>GGC</u> TGCTC CCCTGCTCAGCCTAC	12	269 Primer 3	501-549
eNOS	<u>AATTAACCCTCACTAAA</u> <u>GGG</u> CCCCCAGGCTGGAGTGG TTTGCA	* <u>GTAATACGACTCACTATA</u> <u>GGGC</u> GCCAGACTCCTGCCTTGGA CA	8	316 Primer 5	319-376
eNOS	* <u>AATTAACCCTCACTAA</u> <u>AGGG</u> GCAACGCTACCACGAAG ACAT	<u>GTAATACGACTCACTATAG</u> <u>GGC</u> GTGTCTGAGCCGGGAGGC TCG	26	220 Primer 6	1152- 1189
eNOS	* <u>AATTACCCTCCTAAA</u> <u>GGG</u> CCTCAGTCCTCACAGCG GAAC	<u>GTAATACGACTCACTATAG</u> <u>GGC</u> ACTCTGCTGCCTGCTCCA GCA	5' utr	307 Primer 7	Nt -224- + 9

Caveo- lin1	<u>*AATTAACCCTCACTAA</u> <u>AGGG</u> CTTCTATTCTGTGCTCAT GTTGT	<u>GTAATACGACTCACTATAG</u> <u>GGC</u> CCAGATGTGCAGGAAAGA GAG	3	307	65-129
Akt /PKB	<u>*AATTAACCCTCACTAA</u> <u>AGGG</u> AATGACTACGGCCGTGC AGTG	<u>GTAATACGACTCACTATAG</u> <u>GGC</u> ATGGTCCTGGTTGTAGA AGG	11	171	323-354
VEGF Rezep tor-2	<u>AATTAACCCTCACTAAA</u> <u>GGG</u> GGAGATGCTCGCCTCCC TTTGA	<u>*GTAATACGACTCACTATA</u> <u>GGGC</u> AAATATTTCCCACAGCAAA ACAC	21	188	1061- 1109

**Tabelle 5:** Gen-Struktur der eNOS und modulierender Faktoren

\*= 40bp GC clamp:GCCCCGGCGGGCCGGCGGGCGGCCGGGG

= T3/T7 sequenzierende Primersequenz

Unten zeigt Tabelle 6 die Funktionen der eNOS, sowie modulierender Faktoren. Die einzelnen Domänen sind aufgeführt und die spezifische Aufgaben sind gegenübergestellt.

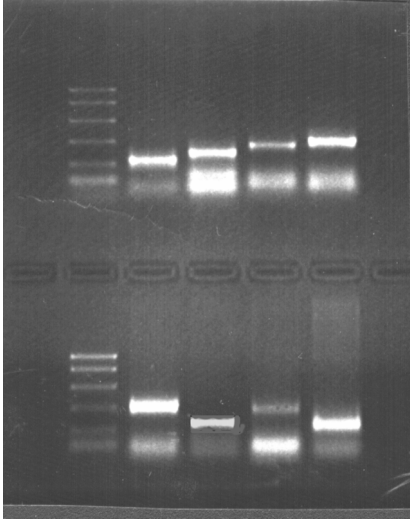


Protein	Untersuchter Bereich	Domänen	Funktion	Literatur
eNOS	Promoter	Nt. -224 - +17	Transkriptionsregulation (konstitutiver Promotor)	Karantzoulis-Fegarast <i>et al.</i> , 1999
eNOS	Glu298Asp Polymorphismus	Aa 255-365	Glu298Asp Variante; Mögliche Assoziation bei der Entstehung von KHK	Yoshimura <i>et al.</i> , 1998
eNOS	Calmodulin binding site	Aa 475-500	Bindet Calmodulin (aktiver Zustand)	Marsden <i>et al.</i> , 1992, Rhyner <i>et al.</i> , 1994
eNOS	Calmodulin binding site	Aa 501-549	Bindet Calmodulin	Marsden <i>et al.</i> , 1992, Rhyner <i>et al.</i> , 1994
eNOS	Arginine binding site	Aa 360-390	Substratbindungs-Region für Arginin (NO-Produktion)	Chen <i>et al.</i> , 1997
eNOS	Phosphorylation site	Aa 1160-1200	Phosphorylierung durch Akt 1 Kinase/ PKB	Fulton <i>et al.</i> , 1999
Caveolin 1	eNOS binding region	Aa 88-110	Bindung zu eNOS (inaktiver Zustand)	Garcia-Cardena <i>et al.</i> , 1997, Glenney, 1992
Akt 1 Kinase	Ser/Thr Kinase-Domäne	Aa 330-360	Domäne die eNOS spezifisch phosphoryliert	Downward 1998 und Dimmeler <i>et al.</i> , 1999
VEGF-Rezeptor II	Kinase-Domäne	Aa 1090-1110	Tyrosinkinase Domäne	Papapetropoulos <i>et al.</i> , 1997

**Tabelle 6:** Funktion der eNOS und modulierender Faktoren

Zur Kontrolle auf erfolgreich amplifizierte PCR- Produkte wurden je 5 µl des PCR-Ansatzes auf einem 2 % Agarose- Gel aufgetrennt.

**Abbildung 8:** amplifizierte PCR-Produkte  
**P1 P2 P3 P4 obere Spalte**  
**P5 P6 P7 P8 untere Spalte**



#### 3.2.4. Gelelektrophorese von DNA- Proben

Agarose ist ein aus Meeresalgen gewonnenes Polysaccharid. Die Porengröße der Agarosegele ist abhängig von der Konzentration der Agarose (Einwaage der Agarose/Wasservolumen). Durch Aufkochen löst sich die Agarose in Wasser und geliert beim Abkühlen, hierbei bilden sich Polysaccharid- Sol Doppelhelices, die sich in Gruppen seitlich zu relativ dicken Fäden zusammenlagern. Die Agarose-Gelelektrophorese ist die Standardmethode für die Trennung, Identifizierung und Reinigung von DNA- oder RNA- Molekülen.

Bei der nichtdenaturierenden Polyacrylamidgelelektrophorese von Nukleinsäuren wird auf den Zusatz von Denaturans verzichtet. Die Nukleinsäuren werden allein aufgrund der unterschiedlichen Molekülmasse aufgetrennt.

Wir verwendeten für die DNA- Polyacrylamidgele die Fertiglösung (40 % Acrylamid/Bis. Solution (29/1) Vernetzungsgrad C = 3,3 %) der Fa. BioRad.

#### ➤ *Herstellen der Gele und Gellösungen für Agarosegele*

Wir verwendeten für unsere 2 % Agarosegele die horizontale MINI Sub Cell GT-Einheit der Fa. BioRad. Die Elektrophoresekammer wurde mit Aqua bidest gespült und

die Umrandungen der Gellauffläche mit Klebeband abgeklebt. 0,6 g Agarose wurden mit der Analysewaage abgewogen, mit 0,6 ml TAE- Puffer (s.u.) versetzt, mit Aqua bidest. auf 30 ml aufgefüllt und in einem Mikrowellenherd für 5 min. gekocht. Nach Abkühlen der Lösung auf ca. 40 °C wurde das Gel gegossen und der Kamm vorsichtig inseriert. Die Klebestreifen wurden entfernt und die Kammer mit 1x TAE- Elektrodenpuffer gefüllt. Anschließend wurde der Kamm vorsichtig entfernt und die Taschen mit Puffer befüllt.

Zur Gelelektrophorese, der mittels PCR amplifizierten DNA wurden folgende Puffer und Lösungen verwendet.

Chemikalie	Konzentration
EDTA	1 mM
Bromphenolblau	0,25 %
Xylencyanol	0,25 %
Glycerol	50 %

**Tabelle 7:** Zusammensetzung des DNA- Auftragspuffers für Agarosegele.

➤ *Herstellen der Gele und Gellösungen für die nicht denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese*

Chemikalie	Menge
40 % Acrylamid/Bis. Solution (29/1) Vernetzungsgrad C= 3,3 %	3,75 ml
50x TAE- Puffer	200 µl
Aqua bidest.	6 ml
10 % Ammoniumpersulfat	100 µl
TEMED	10 µl

**Tabelle 8:** Zusammensetzung der Gellösung für die nicht denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese.

### ➤ **PCR- Kontrollgel**

Als PCR- Kontrollgel wurden von uns 2 % Agarosegele verwendet. Je 5 µl der Proben der wurden mit 2 µl DNA- Auftragspuffer gut vermischt und dann in die Probentaschen pipettiert. Anschließend wurden die Proben eine Stunde bei konstanten 65 Volt aufgetrennt.

Nach Beendigung des Gellaufs wurde das Gel für 10 min. in 50 ml Ethidiumbromid-Lösung (0,5 µg Ethidiumbromid/1 ml Aqua bidest.) gefärbt und für weitere 5 min. in H<sub>2</sub>O entfärbt. Das Ergebnis der Elektrophorese wurde unter der UV- Lampe beurteilt und das Gel photographiert.

#### 3.2.5. Denaturierende Gradienten Gelelektrophorese (DGGE)

Die denaturierende Gradienten- Gelelektrophorese (DGGE) basiert auf einer von Fisher *et al.*, 1979 und Myers und Lerman *et al.*, 1986 beschriebenen Separationstechnik. Mit Hilfe der DGGE- Methode lassen sich DNA- Fragmente identifizieren, die sich in nur einem Basenpaar unterscheiden. Die Differenzierung der verschiedenen DNA- Fragmente wird durch ihr Schmelzverhalten in der DGGE definiert. Jedes Fragment besitzt spezifische Bereiche, so genannte Schmelzdomänen („melting domains“), in die es aufschmilzt, wenn die Temperatur oder die Konzentration an Denaturans erhöht wird. Die Schmelztemperatur (T<sub>m</sub>) ist sequenzspezifisch. In einem Acrylamid-Gradientengel ist doppelbindige DNA einem linear anwachsenden Gradienten ausgesetzt, bis sie an ihrem Schmelzpunkt beginnt zu schmelzen. Wenn die Schmelztemperatur ( T<sub>m</sub>) der kleinsten Schmelzdomäne erreicht ist, beginnt die DNA partiell zu schmelzen. Das verlangsamt die Geschwindigkeit der DNA im Polyacrylamidgel (mobility shift). Optimale DGGE- Bedingungen setzen voraus, dass die Moleküle nicht vollständig getrennt sind und sich die zu untersuchende Region in der niedrigsten Schmelzdomäne befindet. Ist die DNA durch Mutation verändert, so ändert sich ihr Schmelzprofil im Vergleich zum Wildtyp.

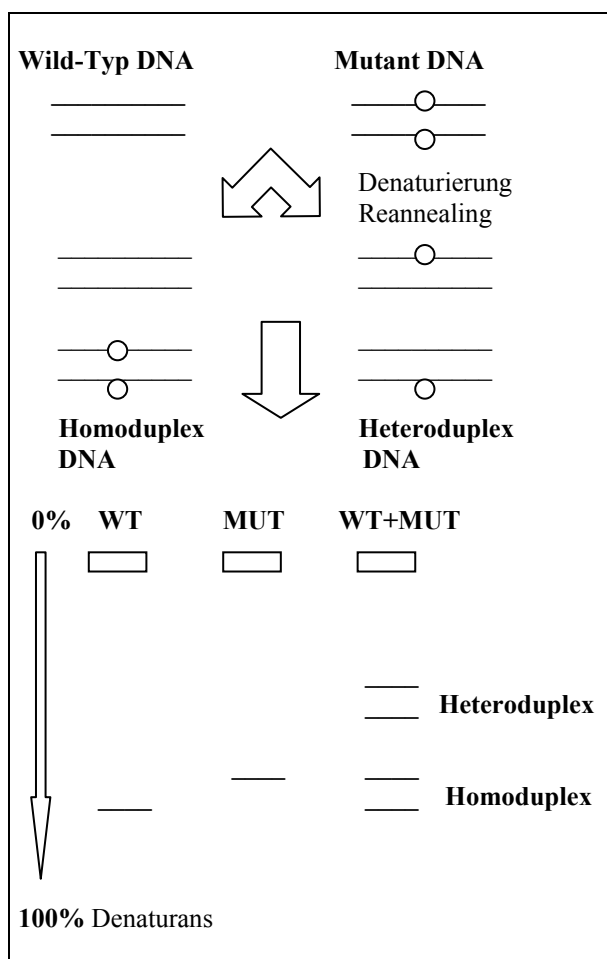
Um ein vollständiges Schmelzen der DNA und damit ein Auslaufen der DNA aus dem Gel zu verhindern, wird mittels PCR den zu untersuchenden Genregionen ein GC-clamp [Myers *et al.*, 1985] der etwa 40 Basenpaare umfasste angefügt. Damit wird sichergestellt, daß ein Teilstück der DNA doppelbindig bleibt und ein komplettes aufschmelzen der zu untersuchenden DNA nicht stattfinden kann. Einer der verwendeten PCR- Primer wird mit dem GC- Clamp versehen und anschließend eine

PCR durchgeführt, in deren Verlauf die GC- Clamp in das Produkt eingebaut und amplifiziert wird [Sheffield *et al.*, 1989]. Hierdurch ist es möglich, höher schmelzende Domänen eines Fragments gleichzeitig zu erfassen.

Mittels DGGE lassen sich so Wildtyp, Mutante und Heteroduplexbanden bis zu 1kb-Länge identifizieren (siehe Abbildung 9).

Die Methode wurde in mehreren Arbeiten in unserem Labor überprüft und zeigte dabei gute Ergebnisse. Unter anderem wurde sie für die Untersuchung des Osteoprotegerin (OPG)-Gen-Polymorphismus [Soufi *et al.*, 2004b], für das Screening des Kodons 3448-3561 des Apolipoprotein B 100 (apoB-100) [Soufi *et al.*, 2004a] und für die apo A5S19W- Mutation [Schaefer *et al.*, 2004] verwendet.

**Abbildung 9:** Schmelzverhalten von Wildtyp und Mutante



Die unterschiedlichen Schmelzverhalten von Wildtyp, Heterozygote und Mutante werden hier gegenübergestellt. Man sieht eine einfache Bande im Falle des Wildtyps und der Mutante, beim Heterozygoten zeigt sich eine Doppelbande. So lassen sich diese in der Gegenüberstellung detektieren.

Bei der denaturierenden Gradientengelelektrophorese wird der Gradient durch eine Kombination aus gleichbleibender Temperatur ( 60°C) und einem denaturierenden

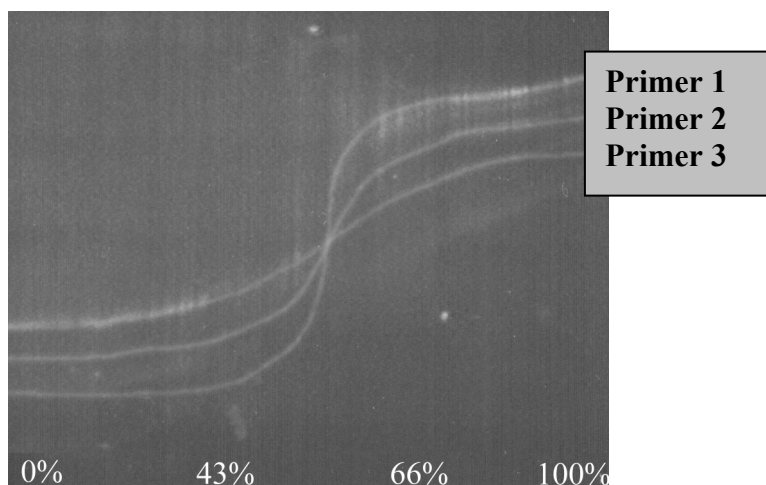
Gradienten aus Harnstoff (0-7 M) und Formamid (0-40%) gebildet. Einmal kann der Gradient parallel zur Elektrophoreserichtung oder senkrecht dazu stehen.

Zur Findung des optimalen Gradienten für das jeweilige DNA-Fragment eignet sich das sogenannte Perpendicular Denaturing Gradient Gel. Bei diesem steht der Gradient senkrecht zur Elektrophoreserichtung. Die entstehenden Schmelzkurven erlauben eine Einschränkung des Gradienten und damit eine bessere Auftrennung in der parallelen DGGE. Der Probenauftrag erfolgt hierbei über eine einzige, das Gel umfassende Probenflasche. Fragmente auf der niedrigen Seite des Gradienten wandern sehr weit ins Gel hinein, da die geringe Denaturans-Konzentration sie nicht schmelzen lässt, während die auf der hohen Seite wandernden nur eine kurze Strecke bis zur Aufspaltung zurücklegen. Im mittleren Konzentrationsbereich werden durch nur bedingtes Schmelzen entstehende Übergangszustände sichtbar. Durch Anfärben der Gele mit Ethidiumbromid erhält man eine Kurve, welche die Anzahl der Schmelzdomänen und deren Schmelzpunkt anzeigt. Anhand dieser Kurve ist es möglich, die Bedingungen für den parallelen Gradienten auszuwählen [Myers et al., 1985] (siehe Abbildung 10).

Man sieht, dass das Gradientenoptimum sich für unsere DNA-Fragmente bei 30%-60% zeigte. Die Abbildung zeigt am Beispiel für die Schmelzkurven von Primer 1-3 wie das Perpendicular Denaturing Gradient Gel funktioniert.

**Abbildung 10:** Schmelzkurven zur Gradientenoptimierung

In der unteren Leiste sind die Zahlen angegeben für die prozentualen Anteile im Gel. Die Überschneidung liegt im Bereich zwischen 43% und 66%, das heißt hier liegt auch das Gradientenoptimum.

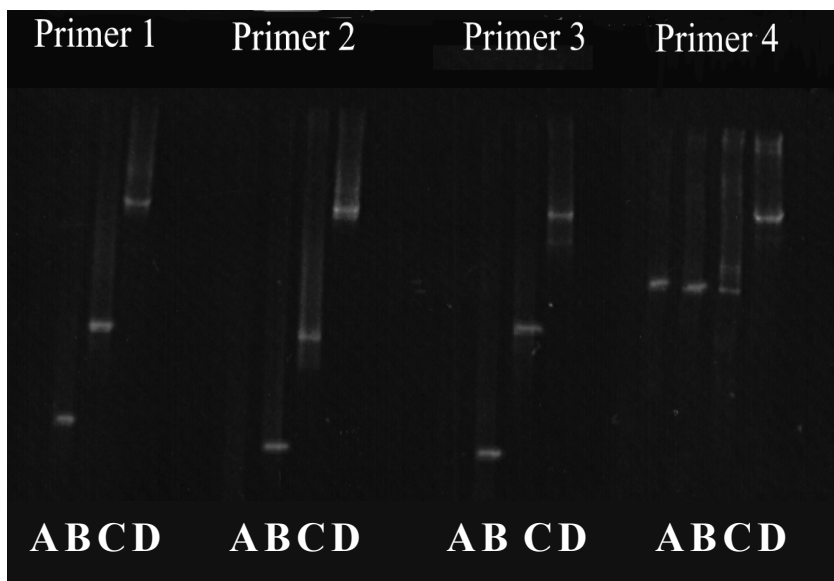


➤ *Zeitverlaufs-Experimente*

Um die optimale Dauer der Elektrophorese zu finden wurde eine Elektrophorese gestartet bei der jeweils für die einzelnen Genbereiche zum Zeitpunkt 0 Probe aufgetragen wurde. Anschließend wurde jeweils nach zwei Stunden erneut Probe aufgetragen. Nach 8 Stunden wurde ausgewertet. Anhand der Annäherung der geschmolzenen Fragmente ließ sich nun die nötige Elektrophoresedauer ermitteln, die bei vier Stunden bei 140V lag (Abbildung 11). Die Beispiele sind für Primer 1-4 aufgeführt. Die Banden wandern dabei unterschiedlich weit in das Gel ein. Nach vier Stunden zeigt sich bei Primer 4 eine ideale Aufschmelzung, die Probe wandert nicht weiter in das Gel vor. Für Primer 1-3 zeigen sich nach 2 Stunden schon deutliche Banden, die Proben wandern aber noch weiter. Nach vier Stunden Inkubation treten die Banden aber noch deutlicher fokussiert zu Tage, was für eine korrekte Auswertung der Gele von entscheidender Bedeutung ist. Nach 8h waren für Primer 1-3 die Proben bereits aus dem Gel herausgewandert. Um die Elektrophoresedauer möglichst kurz zu halten wurde deshalb die Dauer auf 4h festgelegt.

**Abbildung 11:** Optimierung der Elektrophoresedauer

Aufgeführt sind in der oberen Leiste Primer 1-4. Auf der unteren Leiste sieht man die Banden mit A,B,C,D bezeichnet. Sie entsprechen den Zeitpunkten 2-8h (A~8h, B~6h, C~4h und D~2h). Die Banden sind den Zeitpunkten zugeordnet. Zum Zeitpunkt 8h sind die Banden von Primer 1-3 im Gel schon soweit vorgewandert, daß sie aus dem Bild herausgeschnitten sind.



Um genügend DNA zur Durchführung des DGGE- Screenings zur Verfügung zu haben, müssen die Fragmente vorher durch eine PCR amplifiziert werden.

➤ **Benötigte Puffer und Materialien**

Die zum DGGE- Screening verwendeten Reagenzien sind in den folgenden Tabellen zusammengestellt.

1.) 40% iges Acrylamid

<i>Chemikalie</i>	<i>Menge</i>
Acrylamid	389,3g
Bis-Acrylamid	10,7g
Aqua bidest.	ad 1000 ml

Das Gemisch wurde durch einen 0.45 µl Filter gefiltert und bei 4°C aufbewahrt.

**Tabelle 9:** Chemikalien für 40% Acrylamid

2.) 50x TAE-Puffer

<i>Chemikalie</i>	<i>Menge</i>
Tris base	242 g
Essigsäure	57.1 ml
0.5 M EDTA, pH 8.0	100 ml
Aqua bidest	ad 1000 ml

Das Gemisch wurde bei Raumtemperatur gelagert.

**Tabelle 10:** Chemikalien für 50xTAE-Puffer

3.) 0% Denaturans-Lösung (9% iges Gel)

<i>Chemikalie</i>	<i>Menge</i>
40% Acrylamid	225ml
50x TAE-Puffer	20 ml
Aqua bidest.	ad 1000 ml

Die Lösung wurde für 10-15 min entgast, durch einen 0.45 µl Filter gefiltert und bei 4°C in einer dunklen Flasche für höchstens einen Monat aufbewahrt.

**Tabelle 11:** Chemikalien für 0% Denaturans-Lösung



## 4.) 100% Denaturans-Lösung ( 9%iges Gel)

<i>Chemikalie</i>	<i>Menge</i>
40% Acrylamid	225ml
50x TAE-Puffer	20 ml
Formamid deionisiert	400 ml
Harnstoff	420 g
Aqua bidest	ad 1000 ml

Die Lösung wurde für 10-15 min entgast, durch einen 0.45 µl Filter gefiltert und bei 4°C in einer dunklen Flasche für höchstens einen Monat aufbewahrt.

**Tabelle 12:** Chemikalien für 100% Denaturans-Lösung

## 5.) 10% Ammonium Persulfat

<i>Chemikalie</i>	<i>Menge</i>
Ammonium Persulfat	0.1 g
Aqua bidest	ad 1ml

Das APS wurde bei –20°C für höchstens eine Woche aufbewahrt.

**Tabelle 13:** Chemikalien für 10% Ammonium Persulfat

Für die Gele wurden eine 30% ige und eine 60% ige Denaturans-Lösung benötigt. Dazu wurden für die 30%ige Lösung 105 ml 0%ige Denaturans-Lösung mit 45 ml 100%iger Denaturans-Lösung gemischt; für die 60%ige Lösung wurden 60 ml 0%ige Denaturans-Lösung mit 90 ml 100%iger Denaturans-Lösung gemischt. Die Lösungen wurden in dunklen Flaschen bei 4°C aufbewahrt. bidest. auf 7 l aufgefüllt).

➤ **Vorbereitung des Elektrophoretanks und der Glasplatten**

In den Elektrophoretank wurden 110 ml 50x TAE-Puffer gegeben; der Tank mit Aqua bidest auf 5.5l aufgefüllt. Dann wurde die angeschlossene Pumpe angeschaltet und der Tankinhalt auf 60°C erwärmt.

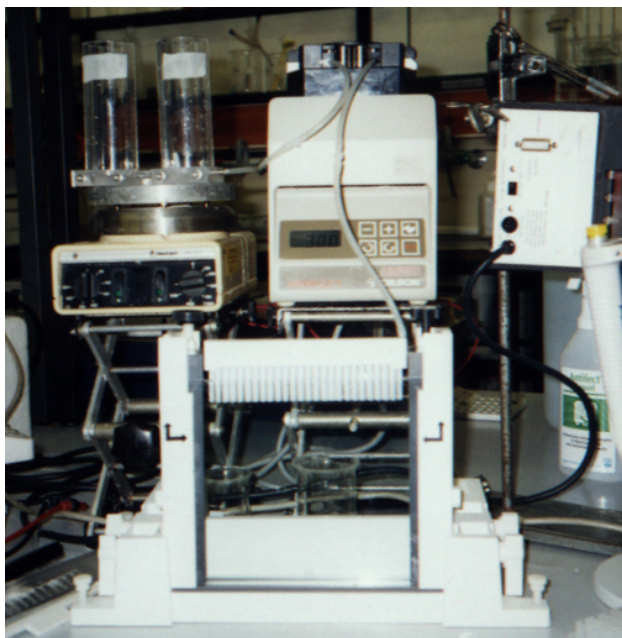
Für die Gele wurden zwei Außenplatten, zwei Zwischenplatten, zwei Innenplatten, acht Spacer à 1mm, zwei Sets Sandwich clamps und vier Kämme mit jeweils 25 Zähnen à 1mm benötigt. Die Platten wurden mit Spülmittel und Wasser abgespült und mit Ethanol gereinigt. Anschließend wurden auf die Außenplatten rechts und links je ein

Spacer positioniert, darauf wurde die Zwischenplatte gelegt, wiederum ein Spacerpaar wurde positioniert und die Innenplatte draufgesetzt. Die Sandwichclamps wurden rechts und links positioniert und fest zugezogen und im Gussständer platziert. Mit Wasser wurde die Dichtigkeit überprüft.

➤ **Herstellen von Parallel- DGGE- Gelen**

Zu jeweils 15 ml 30%iger Lösung, bzw. 60%iger Lösung wurden 15  $\mu$ l TEMED und 150  $\mu$ l 10% ige APS gegeben. In die Gießapparatur (Abbildung 12) wurde nun in die linke Kammer die 30% ige Lösung und in die rechte Kammer die 60%ige Lösung gegeben. Die Pumpe wurde eingeschaltet und das Gel wurde mit einem Gradienten von 30% bis 60% gegossen. Während des Gießens wurde der hochkonzentrierten Gellösung kontinuierlich niederkonzentrierte Lösung zugemischt, so dass die Konzentration in der Gießkammer von unten nach oben abnahm.

Es wurde ein 25- zähliger Kamm vorsichtig eingesetzt. Es musste darauf geachtet werden, dass keine Luftblasen in den Taschen und im Gel zurückbleiben, da diese die Laufstrecke der Proben beeinträchtigen können.



**Abbildung 12:** Versuchsaufbau zum Gießen der Gele

Nach vollständiger Polymerisation wurde der Puffertank mit 10 l 1x TAE- Puffer gefüllt und die Gelkammer hineingestellt. Der Puffertank war über Schläuche mit der Elektrophorese- Einheit verbunden. Eine peristaltische Pumpe gewährleistete einen ständigen Austausch des Puffers und durch einen Thermostat wurde die Temperatur in Tank und Elektrophorese- Einheit konstant bei 60 °C gehalten. Der Kamm wurde vorsichtig entfernt, die Taschen mehrmals mit Puffer gespült, um nicht polymerisierte Gellösung und schnell kristallisierenden Harnstoff aus den Taschen zu entfernen.

### ➤ *Gellauf und Auswertung der Gele*

Zu den amplifizierten Proben wurden je 20µl einer Farbstofflösung ( Farbstoff + Glycerin im Verhältnis 1:3 ) zugegeben. Nachdem die Glasplatten im Gehäuse befestigt und 1x TAE-Puffer draufgegeben worden war, wurden die Proben in die Kammern mit einer Glaspipette aufgetragen. Das Gehäuse wurde in den bereits auf 60°C erwärmten Elektrophoresetank gestellt und die Elektrophorese wurde bei 140 V gestartet. Die Dauer der Elektrophorese betrug 4-5 Stunden.

Nach Entnahme der Gele wurden sie für 10-15 min in eine Färbelösung , bestehend aus 500 ml 1x TAE-Puffer und 33µl Ethidiumbromid inkubiert; danach unter einem UV-Schirm ausgewertet. Bei Auffälligkeiten wurde die Probennummer notiert und die Probe zur späteren Sequenzierung erneut amplifiziert.

### ➤ *Aufreinigung auffälliger Proben zur Sequenzierung*

Die bei der Gelelektrophorese auffälligen Proben wurden nochmals in einem Ansatz von 150µl je Probe amplifiziert und auf ein 6% iges Agarosegel aufgetragen. Für das Agarosegel wurden 0.6 g Agarose mit 600 µl 50xTAE-Puffer gemischt und auf 30 ml aufgefüllt. Anschließend wurde das ganze erhitzt, bis sich die Agarose löste. Nach Abkühlung auf ca. 40°C wurden 2 µl Ethidiumbromid zugegeben. Nachdem das Gel ausgehärtet war, wurden die Proben aufgetragen. Die Elektrophorese wurde mit 70 V gestartet und nach 30 min wurden die Banden ausgeschnitten.

Die Banden wurden gewogen und es wurde ein dreifaches Volumen des Puffers QX1 und nach vortexen 10 µl des Puffers QX2 zugegeben. Anschließend wurden die Proben in einem 50°C warmem Wasserbad für 10 min gestellt. Dazwischen wurden die Proben alle 2 min gevortext um den Puffer QX2 in Lösung zu halten. Die Proben wurden dann 30 sec bei 2000 RPM zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen. Erneut 500 µl

QX1 zugegeben und die Probe gevortext bis zur vollständigen Lösung des Peletts. Dieser Schritt diente der Entfernung eventueller Agarosereste. Zentrifugation für 30 sec und Überstandabnahme folgten. Zuletzt wurde zweimal mit PE gespült. Dazu wurden 500 µl PE zugegeben, die Probe gevortext und für 30 sec zentrifugiert. Dieser Waschschrift diente der Entfernung eventueller Salzreste. Nach Abnahme des Überstands wurde das Pelett für 10-15 min getrocknet, bzw. bis es weiß wurde. In 20 µl Aqua bidest wurde das Pelett aufgenommen, gevortext und für 20 sec zentrifugiert. Im Überstand befand sich nun die aufgereinigte Probe.

### 3.2.6. DNA- Sequenzierung:

Alle Sequenzierungsreaktionen wurden mittels des Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Fertig-Reaktions-Kit vorwärts und rückwärts sequenziert. Die Proben wurden dann auf einem ABI Prism™377 DNA Sequenzer analysiert.

### 3.2.7. Bestimmung des eNOS Glu<sub>298</sub>Asp Polymorphismus

Der T-Allel Polymorphismus der eNOS wurde im Rahmen einer wissenschaftlichen Arbeit unserer Studiengruppe für eine Anzahl von Patienten aus unserem KHK-Kollektiv mittels PCR und RFLP für den T-Allel Polymorphismus des eNOS- Gens bestimmt. Die DNA wurde nach der oben aufgeführten Extraktionsmethode aus Vollblut gewonnen.

Die benutzten Primer waren 5'-AAGGCAGGAGACAGTGGATG-3' (vorwärts) und 5'-CAGTCAATCCCTTTGGTGCT-3' (rückwärts). Die Amplifizierung wurde in 25 µl Volumen, welches 100 ng DNA, 20 pmol jeden Primers, 1.5 mmol/l MgCl<sub>2</sub>, 50 mmol/l KCl, 25 mmol/l dNTP, 5 mmol/l Tris-HCl (pH 8.3) und 1 U Platinium Taq Polymerase (Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe, Germany) enthielt, durchgeführt. Die Proben wurden dann bei 94° C für 5 min inkubiert; es folgten 30 Zyklen mit je: Denaturierung bei 94° C für 1 min, Annealing bei 58° C für 1 min, und Extension bei 72° C für 1.5 min und eine letzte Extension bei 72° C für 5 min. Wir erhielten 246 bp umfassende PCR Produkte. Diese wurden mit dem Restriktionsenzym Sau 3A I (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) verdaut. Darauf folgte eine Gelelektrophorese in einem 2.5% Agarosegel, danach inkubierten wir das Gel in Ethidiumbromid und betrachteten es unter dem UV-Schirm. Liegt Thymidin an der Position 894 vor, wird das Produkt unter Bildung zweier Fragmente (158 bp und 88 bp) an dieser Stelle gespalten. Die

---

Genotypen wurden als GG (Glu298/Glu298:Träger des Wildtyps), GT (Glu298/Asp298: heterozygoter Träger) und TT (Asp298/Asp298: homozygoter Träger) identifiziert.

### 3.3. Statistische Analyse

Zur Vorhersage potentieller Phosphorylierungsseiten an Serin-, Threonin- oder Tyrosinresten wurde NetPhos 2.0 verwendet, ein auf einem neuronalen Netzwerk basiertes Computerprogramm, mit dem potentielle Phosphorylierungsreste in Proteinsequenzen vorhergesagt werden können (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>). Zur Analyse der Proteinstrukturen diente als Grundlage PredictProtein (PP) (erhältlich unter <http://maple.bioc.columbia.edu/predictprotein>). PredictProtein ist ein automatischer Service für die Suche von Proteinstrukturen in Proteindatenbanken. Die statistische Auswertung erfolgte EDV- unterstützt mit Hilfe der Software SPSS für Windows Version 9.0.1 (SPSS Inc., Chicago, Illinois). Summary statistics for continuous Variable wurden als Standardabweichung definiert; KHK-Patienten und Kontrollen wurden auf dem Boden von Grundcharakteristiken mittels des Wilcoxon-Rang-Summen-Tests verglichen. Es wurden Häufigkeiten und prozentuale Anteile erfasst, die Vergleiche zwischen den beiden Gruppen wurden dann mittels des Fisher's exact Test oder dem Pearson Chi-Quadrat-Test verifiziert. Eine statistische Signifikanz wurde bei einem p-Wert kleiner 0,05 angenommen.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Demographische Daten und kardiovaskuläres Risikoprofil der Patienten

Zwischen August 1998 und Januar 2000 wurden Vollblutproben von 795 Patienten, die aufgrund ihrer Klinik koronarangiographiert worden waren, auf Genmutationen in der eNOS, sowie in wichtigen Genen modulierender Faktoren untersucht. Die Patienten wurden nach den Ergebnissen der Koronarangiographie in Gruppen eingeteilt. Die eine Gruppe beinhaltete jene mit koronarer Herzkrankheit (es musste zumindest eine arteriosklerotische Läsion vorhanden gewesen sein, wenn sie auch keine Verengung der Herzkranzgefäße zur Folge hat) und jene ohne jede arteriosklerotische Veränderung der Herzkranzgefäße. Von den 795 untersuchten Patienten wurden im Rahmen des „Marburger Präventivmodells“ demographische Daten, sowie deren gesamtes kardiovaskuläres Risikoprofil erfasst. Es zeigte sich in 613 eine koronare Herzkrankheit; bei 182 Patienten zeigten sich keine Veränderungen an den Herzkranzgefäßen. Das Durchschnittsalter lag bei sechzig Jahren in den Kontrollen und bei fünfundsechzig in der KHK-Gruppe. Beim überwiegenden Anteil der Patienten handelte es sich um Männer (79%), vor allem bei den kranken Patienten fand sich ein überdurchschnittlicher Männeranteil; Raucher litten etwa doppelt so oft wie die gesunde Patientengruppe an einer KHK. Beim Hauptanteil der KHK-Patienten zeigte sich eine 3-Gefäß-Erkrankung, die eine Operationsindikation darstellt. In einem Zehntel der Fälle handelte es sich um nicht signifikante Stenosen. In der gesunden Kontrollgruppe waren die Blutfette im Durchschnitt höher als in der KHK-Gruppe. Eine Übersicht gibt Tabelle 14. Es wurden die Verteilungen der Risikofaktoren absolut, sowie prozentual erfasst. Die Patienten mit KHK zeigten folgendes Lipidprofil: Cholesterin  $187 \pm 44$  mg/dl, LDL-Cholesterin  $119 \pm 35$  mg/dl, Triglyceride  $155 \pm 111$  mg/dl, HDL-Cholesterin  $37 \pm 12$  mg/dl und Lp(a)  $42 \pm 31$  mg/dl.

+ Median und Range

n.s. = nicht signifikant

° signifikanter Unterschied

**Tabelle 14:** Risikoprofil der Studienteilnehmer

Risikofaktoren	Kontrollen (n=182)	KHK Fälle (n=613)	P-Wert
Alter(in Jahren) <sup>+</sup>	60 (22-79) <sup>°</sup>	65 (35-86) <sup>°</sup>	<0.001
Männlich	57% <sup>°</sup>	79% <sup>°</sup>	<0.001
Raucher	14% <sup>°</sup>	26% <sup>°</sup>	<0.001
Cholesterol (mg/dl)	202 ± 46 <sup>°</sup>	187 ± 44 <sup>°</sup>	<0.001
Triglyceride(mg/dl)	156 ± 109	155 ± 111	n.s.
LDL-cholesterol (mg/dl)	131 ± 35 <sup>°</sup>	119 ± 35 <sup>°</sup>	0.001
HDL-cholesterol(mg/dl)	42 ± 14 <sup>°</sup>	37 ± 12 <sup>°</sup>	<0.001
Lp(a) (mg/dl)	31 ± 24 <sup>°</sup>	42 ± 31 <sup>°</sup>	0.002
Erkrankte Gefäße			
Sklerose ohne signifikante Stenose	-	10%	
1- Gefäß	-	26%	
2- Gefäß	-	28%	
3- Gefäß	-	36%	

#### 4.2. Assoziation des eNOS Glu298Asp Polymorphismus zur KHK

Im Rahmen der Arbeit wurde auch die Assoziation des eNOS Glu298Asp Genpolymorphismus zur KHK in der Marburger Population untersucht. Dazu wurde die PCR RFLP verwandt um die Glu<sub>298</sub>Asp Mutation auf Exon 7 im eNOS Gen zu detektieren. Die Genotypen teilten sich auf die heterozygoten Glu298/Asp298-(GT), die homozygoten Asp298/Asp298(TT)- und die Wildtyp-Merkmalsträger Glu298/Glu298(GG) auf. Der Wildtyp fand sich zu 41% in beiden Gruppen. 51% der Patienten mit KHK waren heterozygote Carrier gegenüber 45% in den Kontrollen.

Homozygote Merkmalsträger hatten einen Anteil von 8% in der KHK-Gruppe gegenüber 14% in den Kontrollen. Keiner dieser ermittelten Werte war signifikant.

Die Untersuchung der Assoziation des eNOS Glu298Asp Polymorphismus mit einer koronaren Herzkrankheit ergaben folgende in Tabelle 15 zusammengefasste Ergebnisse.

Anhand der Tabelle wird deutlich, daß im untersuchten Kollektiv keine Assoziation des eNOS Glu<sub>298</sub>Asp Polymorphismus mit Koronarer Herzkrankheit nachgewiesen werden konnte. Eine Vergleichsstudie, die an der Universität Gießen durchgeführt wurde, kommt zu einem ähnlichen Ergebnis [Gardemann *et al.*2002]. Die Absolutzahlen sind zum Vergleich nochmals aufgeführt.



Marburg	Glu/Glu(GG)	Glu/Asp(GT)	Asp/Asp(TT)	Gesamt	Glu (G)	Asp(T)	Gesamt
KHK-Fälle	41% (253)	51% (311)	8% (49)	613	66,7% (817)	33,3% (409)	1226
Kontrollen	41% (75)	45% (82)	14% (25)	182	63,7% (232)	36,3% (132)	364
Giessen	Glu/Glu(GG)	Glu/Asp(GT)	Asp/Asp(TT)	Gesamt	Glu (G)	Asp(T)	Gesamt
KHK-Fälle	44% (924)	44% (927)	11% (234)	2085	66,5% (2775)	33,5% (1395)	4170
Kontrollen	49% (310)	40% (252)	11% (70)	632	60,3% (872)	39,7% (574)	1446

**Tabelle 15:** Assoziation des eNOS Glu298Asp Polymorphismus mit einer koronaren Herzkrankheit.

#### 4.3. Untersuchte Genbereiche der eNOS und Gene modulierender Faktoren

Das DGGE-basierte Mutationsscreening der oben genannten Regionen identifizierte insgesamt drei Mutationen. Zwei dieser Mutationen lagen im Bereich von Exon 8 des eNOS Gens, der Argininbindungsregion (aa319-376). Es handelte sich dabei um stille Mutationen, ein Austausch von Aminosäuren fand nicht statt.

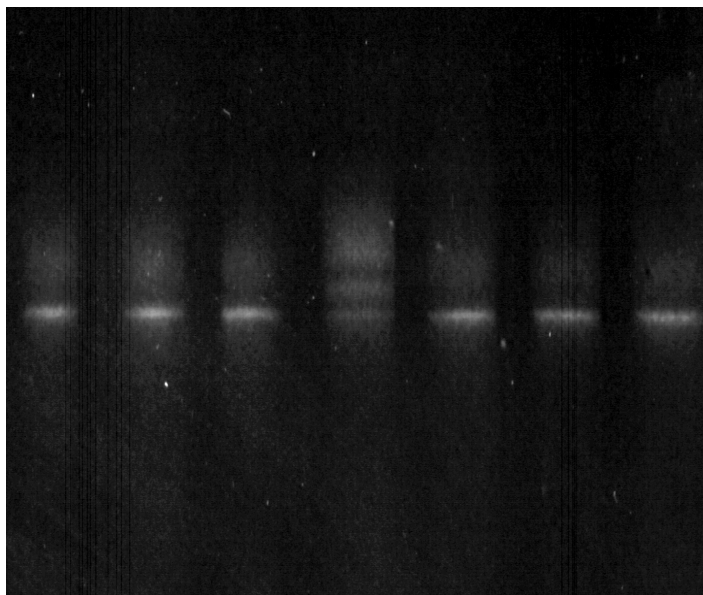
Die weitere Screeninguntersuchung deckte eine bisher noch nicht beschriebene Mutation im Exon 11 des eNOS Gens auf. Diese betrifft die Calmodulin-Bindungsregion der eNOS (Region 492-500). Die Variante befand sich im heterozygoten Zustand. Eine DNA-Sequenzierung zeigte einen Austausch eines C- zu einem T-Nukleotid an der Position 1463 der eNOS mRNA im Exon 12, was einen Austausch von Threonin zu Isoleucin in der Calmodulinbindungsregion der eNOS an der Position 488 (**Thr<sub>488</sub>Ile**) zur Folge hat.

Die mittels DGGE detektierte heterozygote Mutation in Exon 11 des eNOS Gens zeigt Abbildung 13 der Gelelektrophorese. Die Mutante ist mit M gekennzeichnet; rechts und links davon mit 1-6 nummeriert sieht man homozygote Merkmalsträger ohne Mutation.

**Abbildung 13** : Gelelektrophorese der Mutante und gesunder Merkmalsträger

##### **Exon 11 (Calmodulin binding domain)**

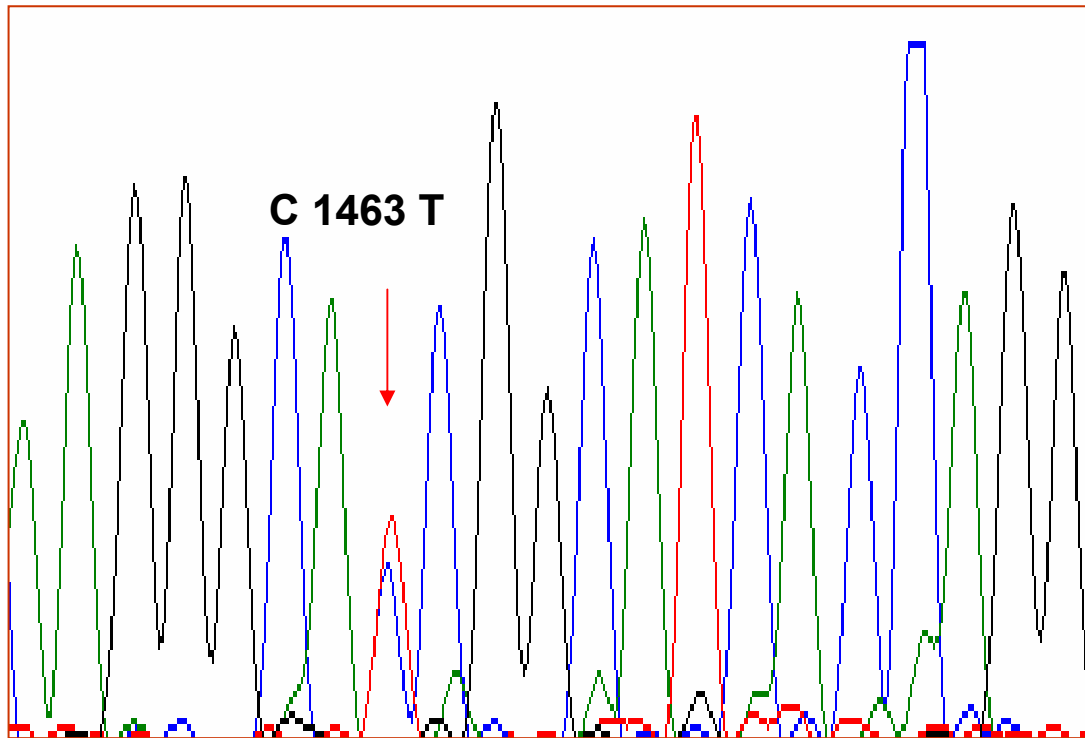
**1      2      3      M      4      5      6**



Die Sequenzierung detektierte dann den heterozygoten Basenaustausch C zu T an der Position 1463 im eNOS Gen. Die graphische Darstellung in der Abbildung 14 verdeutlicht dies.

**Abbildung 14:** Sequenzierung der Mutation

**AAG GGC ACC GGC ATC ACC AGG**



Die folgende Abbildung 15 zeigt die Proteinstruktur einerseits des Wildtyps, andererseits der Mutante. Sie verdeutlicht den Aminosäurenaustausch Thr488Ile in der Calmodulin-Bindungs-Domäne der eNOS.

**Abbildung 15:** Proteinstruktur der Mutation**Proteinstruktur**

Calmodulin-Bindungs-Domäne: AS 485-514			
-AKG <u>I</u> G <u>I</u> TR <u>K</u> K <u>T</u> FKEAVANAVKISASML-			
<b>Position:</b>	488	491	495
<b>Wildtyp :</b>	Lys-Gly- <u>Thr</u> -Gly-Ile- <u>Thr</u> -Arg-Lys-Lys- <u>Thr</u>		
<b>Thr488Ile:</b>	Lys-Gly- <u>Ile</u> -Gly-Ile- <u>Thr</u> -Arg-Lys-Lys- <u>Thr</u>		

Der 49 Jahre alte Patient mit obenbeschriebener Mutation kam notfallmäßig mit Brustschmerzen zur Aufnahme in der Medizinischen Klinik 1 des Universitätsklinikums Marburg.

Er litt an einem akuten Koronarsyndrom. Die durchgeführte Koronarangiographie ergab den Befund einer 2-Gefäß-KHK, darunter eine hochgradige Stenose des Ramus circumflexus und eine Stenose der Arteria coronaria dextra. Eine Bestimmung der Lipidwerte ergab keinen Hinweis auf das Vorliegen einer Hyperlipoproteinämie und damit ein nicht atherogenes Lipidprofil.

Ein erstelltes Risikoprofil ergab nur den Nikotinabusus und eine familiäre Disposition als Risikofaktoren der KHK.

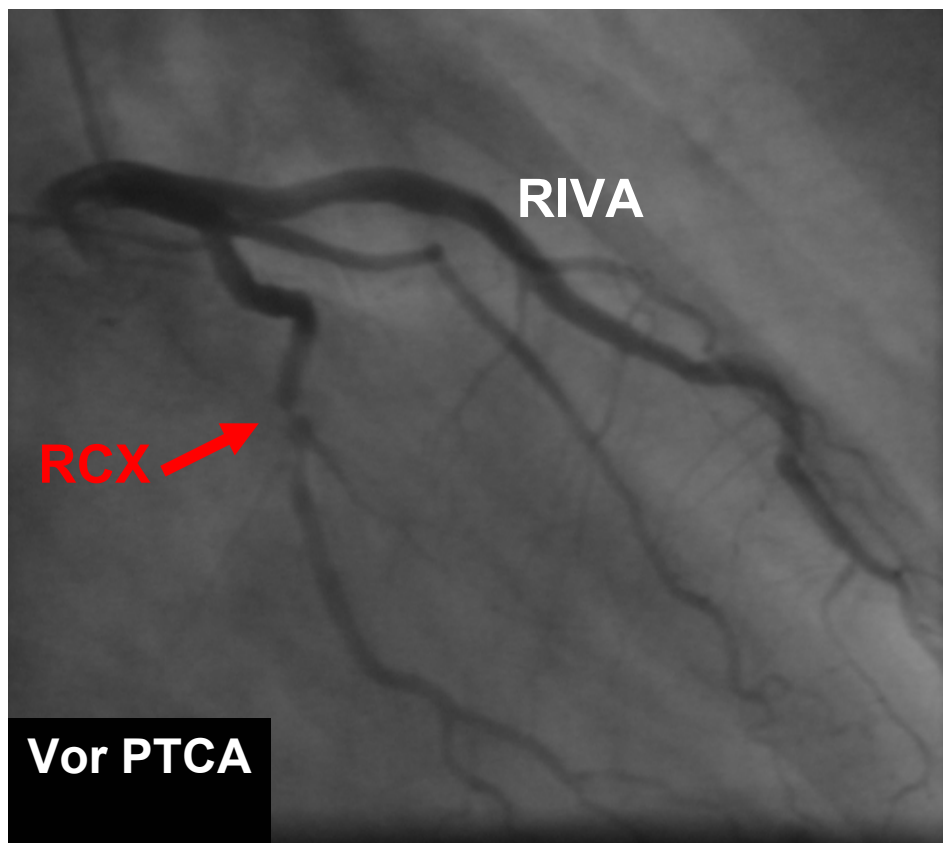
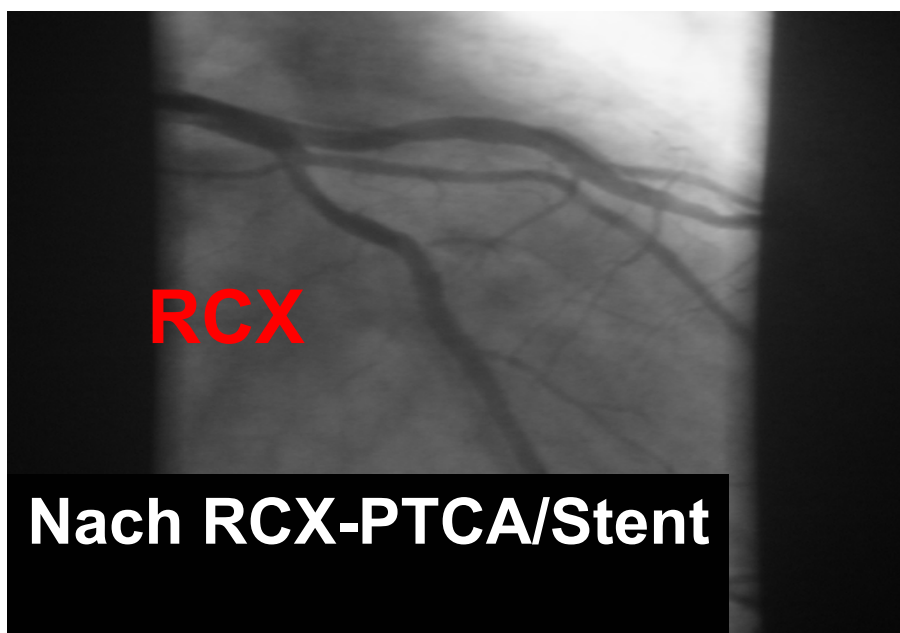
Die Patientencharakteristika einschließlich des Lipidprofils sind in folgender Tabelle nochmals zusammengefasst.

**Patientencharakteristika**

Alter ( Jahre)	49
Geschlecht	Männlich
Diabetes	Nein
Raucher	Ja
Cholesterin (mg/dl)	175
Triglyceride (mg/dl)	110
LDL-Cholesterin (mg/dl)	125
HDL-Cholesterin (mg/dl)	52
Lp(a) (mg/dl)	21
Erkrankte Gefäße	zwei

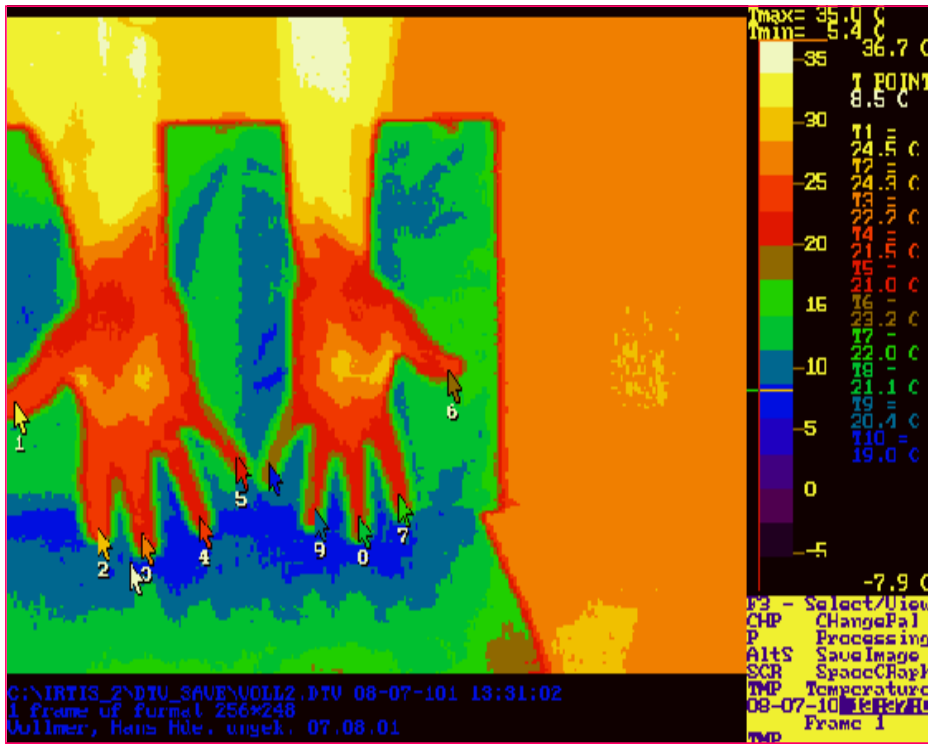
**Tabelle 16:** Patientencharakteristika

Das Angiographieergebnis zeigt Abbildung 16. Es ist der Befund vor der perkutanen transluminalen Koronarangioplastie (PTCA) zu sehen. Die Angiographie der Arteria coronaria sinistra zeigt einen freien Hauptstamm (HS) und einen freien Ramus interventricularis anterior (RIVA). Man sieht die deutliche Einengung des Ramus circumflexus (RCX). In gleicher Sitzung wurde eine PTCA vorgenommen und ein Stent eingesetzt (Abbildung 17).

**Abbildung 16:** Angiographieergebnis**Abbildung 17:** Angiographie nach PTCA und Stenteinlage

Die Thermographie des Patienten nach Kälteprovokation wird in Abbildung 18 dargestellt.

**Abbildung 18:** Thermographie nach Kälteprovokation



Der Patient berichtete über eine milde Raynaud-Symptomatik bei kaltem Wetter. Anhand der Thermographie (Abbildung 18) wird deutlich wie nach Eis-Wasser-Provokation eine leichte Reduktion des digitalen Blutflusses eintritt. Dies könnte auch ein Hinweis auf eine fehlende Aktivität der eNOS bei diesem Patienten sein.

## 5. Diskussion

### 5.1 Konzeption der Arbeit

Die vorliegende Arbeit wurde konzipiert als ein Versuch des genetischen Screenings funktionell wichtiger Regionen des eNOS Gens sowie wichtiger Modulatoren und mögliches Vorliegen einer Koronaren Herzkrankheit.

Darüber hinaus wurde auch die Assoziation einer KHK mit dem bekannten eNOS Glu298Asp Polymorphismus analysiert.

Dazu wurden aus einem gut ausgesuchten Kollektiv von 795 Patienten mit und ohne koronare Herzkrankheit Blutproben gewonnen. Diese Patienten wurden alle in der Klinik für Innere Medizin, Abteilung Kardiologie des Universitätsklinikums Marburg koronarangiographiert, eine KHK konnte somit nachgewiesen oder ausgeschlossen werden.

Weiterhin wurden die koronaren Risikofaktoren, sowie Alter, Geschlecht und andere demographische Daten erfasst. Die Patienten nahmen Teil am „Marburger Präventionsprojekt“ [Schaefer *et al.* 2000].

### 5.2 Polymorphismus Glu298Asp im eNOS Gen

Der Polymorphismus Glu298Asp im Exon 7 des eNOS Gens im Zusammenhang mit KHK ist schon in mehrfachen Studien mit kontroversen Ergebnissen untersucht worden. Einige Autoren fanden einen Zusammenhang, wie die Studien, die in Japan [Shimasaki *et al.* 1998] und England [Hingorani *et al.* 1999] durchgeführt wurden, sowie eine Arbeit von Cai [Cai *et al.* 1999]. Dabei zeigte sich im Falle der Asp-Variante ein mehr als vierfach erhöhtes Risiko einer KHK.

Eine australische Studie [Liyou *et al.* 1998], zwei Arbeiten aus dem Jahre 2001 [Granath *et al.* 2001 und Wang *et al.* 2001] und eine neuere deutsche Studie [Gardemann *et al.* 2002], konnten in ihren Populationen keinen Zusammenhang der Asp-Variante mit einer KHK nachweisen. Dabei wurden in der deutschen Studie 3250 Patienten untersucht, bei denen eine Koronarangiographie erfolgte. Bei 2717 Patienten wurde eine KHK festgestellt, bei 533 gesunden Patienten konnte eine KHK ausgeschlossen werden, sie dienten als gesunde Kontrollgruppe. In dieser Studienpopulation konnte lediglich bei jüngeren Patienten, die mindestens einen zusätzlichen koronaren Risikofaktor hatten, ein erhöhtes Risiko für eine KHK nachgewiesen werden.



In der Studienpopulation dieser Arbeit konnte keine Assoziation zwischen Asp-Variante und erhöhtem Risiko einer KHK nachgewiesen werden. Diese Studie ergab von den Häufigkeiten der Genotypen ähnliche Ergebnisse wie die Studie von Gardemann et al.. Die Allelfrequenzen für den Glu298Asp Polymorphismus waren in beiden Studien ungefähr gleich.

Der Versuch, einen Zusammenhang zwischen einer KHK mit dem T-Allel Polymorphismus zu finden, schlug fehl.

Eine neueste Arbeit [Golser *et al.* 2003] erzeugte aus einem Expressionssystem eine rekombinante Glu<sub>298</sub>Asp eNOS Variante. In vitro wurde die Enzymaktivität getestet. Es zeigte sich, dass im Vergleich zur Wildtyp eNOS der Austausch von Glutamat und Aspartat an der Position 298 in der humanen eNOS nicht die katalytische Aktivität des Proteins ändert.

Eine andere Arbeit aus dem Jahre 2001 [Fairchild *et al.* 2001 ] kam bereits zu einem ähnlichen Ergebnis; es wurde gezeigt, dass das rekombinante eNOS<sub>298</sub>Asp Protein, welches aus Zellen isoliert wurde, auch keinen Einfluss auf die Stabilität, die Halbwertszeit oder die biologische Aktivität der Enzyms hatte.

### 5.3 eNOS Gen und wichtige Modulatoren

Das Hauptziel der Arbeit war es, Mutationen in funktionell relevanten Genbereichen der eNOS, sowie in Genbereichen wichtiger Modulatoren, zu finden. Unter der Vorstellung, daß eine mögliche Mutation zu einer verschlechterten Gefäßendothelfunktion führen und dadurch die Entstehung einer KHK begünstigt werden könnte, wurde ein Kollektiv von 795 Patienten untersucht.

Acht verschiedene Genbereiche, die als funktionell relevant für den Nitric oxid pathway gesehen werden, wurden mittels DGGE gescreent.

Im Bereich der transkriptionalen Regulation des eNOS Gens wurde die Region von – 224 bis +9 des eNOS Promoters analysiert. Diese Region enthält die meisten regulatorischen Elemente, die in die Kontrolle der eNOS Expression einbezogen sind [Karantzoulis-Fegarast *et al.* 1999]. Deshalb kommt ihr in Bezug auf die korrekte Transkription der eNOS besondere Bedeutung zu.

Um festzustellen, ob es Veränderungen in funktionell katalytischen Domänen des eNOS-Proteins gibt, wurde die Region, die für die Arginin-Bindungs-Stelle kodiert, überprüft. Diese liegt an der Position aa 319-376. In vitro Mutationsstudien im Bereich dieser Genregion haben gezeigt, daß diese mehrere hochkonservierte Aminosäuren

enthält, welche für die volle enzymatische Aktivität der eNOS von bedeutender Rolle sind [Chen *et al.* 1997].

Neben der katalytischen Aktivität, die in der Oxygenase-Domäne lokalisiert ist, ist einer der wichtigsten regulatorischen Mechanismen der eNOS Aktivität die Seitenspezifische Phosphorylierung in der Reduktasedomäne. Weil einige Studien gezeigt haben, daß die eNOS am Ser 1177 in einem kalziumunabhängigen Weg durch eine Serin/Threonin-Kinase (Akt/PKB) phosphoryliert wird, wurde im Rahmen der Studie auch diese Region (aa 1152-1189) analysiert [Dimmeler *et al.* 1999 und Fisslthaler *et al.* 2000].

Auf der Ebene der Regulationsmechanismen, die eine Protein-Protein Interaktion verursachen, spielt Caveolin eine zentrale Rolle. Die zentrale Domäne des Caveolingerüsts (aa 65-129) wurde einer Analyse unterzogen. Zwei Regionen, die als Calmodulin-Bindungs-Domänen bezeichnet werden (aa 475-500 und aa 501-549) wurden ebenfalls auf Mutationen gescreent. Calmodulin hat dabei eine modulatorische Funktion in Verbindung mit Kalzium. Im basalen Zustand wird die eNOS inhibiert durch ihre Interaktion mit Caveolin 1. Verantwortlich dafür ist die Gerüstdomäne des Caveolin 1. Agonisten wie zum Beispiel Bradykinin [Marrero *et al.* 1999] mobilisieren Kalzium und generieren die Bindung von Calmodulin an die eNOS, dadurch dissoziiert Caveolin 1 vom Enzym und es wird in den aktiven Zustand versetzt. Wenn der intrazelluläre Kalziumspiegel wieder abfällt und das Kalzium in intrazelluläre Speicher verbraucht wird, kommt es zur Reformation des eNOS-Caveolin Komplexes und die Aktivität der eNOS wird inhibiert [Michel *et al.* 1997].

Dies verdeutlicht den Einfluss dieser beiden Genbereiche im Nitric oxide pathway und war der Grund für die Untersuchung dieser.

Außer diesen wurde auch die Domäne an der die Akt/PKB Kinase (aa 323-354) an die eNOS angreift gescreent. Die Akt/PKB Kinase ist in den Prozess der Phosphorylierung der eNOS involviert und interagiert mit ihr an der Phosphorylierungsseite der eNOS. Sie reguliert so die Aktivierung dieser, in Folge derer es zu vermehrter NO Produktion kommt. Dieser Regulationsmechanismus ist kalziumunabhängig [Dimmeler *et al.* 1999].

An letzter Stelle wurde noch ein konservierter Ausschnitt des VEGFR-2 Gens (aa 1061-1109) examiniert. Er wird durch Caveolin 1 herunterreguliert. Der endotheliale Wachstumsfaktor ist weiterhin involviert in der Signaltransduktion der eNOS und stimuliert endotheliales Zellwachstum. Eine Inhibierung der NO-Synthese führt zu

vermindertem Wachstum. Einen entscheidenden Einfluss hat dabei die Akt-Kinase. Eine Stimulierung dieser bewirkt ein vermehrtes, eine Unterdrückung einen verminderten Aufbau der Endothelzellen. Eine suffiziente Aktivierung der eNOS durch die Akt-Kinase wird für einen VEGF-vermittelten Endothelaufbau vorausgesetzt [Dimmeler *et al.* 2000].

In allen 795 DGGE analysierten Patientenproben fanden sich drei Mutationen. Zwei davon waren stille Mutationen und bewirkten somit keinen Aminosäureaustausch. Die heterozygote Mutation in der Calmodulinbindungsregion der eNOS führte aber zu einem Aminosäureaustausch. An der Position 1463 in der cDNA wurde ein C durch ein T (C1463T) ausgetauscht, was eine Substitution eines Threonins durch ein Isoleucin an Position 488 (T488I) zur Folge hat.

Der Patient, bei dem die Mutation gefunden wurde, kam notfallmäßig zur Aufnahme wegen eines akuten Koronarsyndroms. Die Koronarangiographie zeigte eine 2-Gefäß-KHK. Die Stenosen lagen im Bereich des Ramus circumflexus und der Arteria coronaria dextra; noch in selber Sitzung wurde interveniert und der Patient gestentet. Außer einem Nikotinabusus war kein anderer koronarer Risikofaktor eruierbar. Er zeigte nur eine milde Raynaudsymptomatik als Zeichen der endothelialen Dysfunktion. Fleming *et al.* hat gezeigt, daß die eNOS Aktivität unter verschiedenen physiologischen Bedingungen durch die schnellen Wechsel von Phosphorylierung und Dephosphorylierung der eNOS an zwei separaten Resten nämlich Threonin 495 und Serin 1177 reguliert wird.

Im basalen Zustand sind beide Reste phosphoryliert. Die durch die Proteinkinase C (PKC) induzierte Phosphorylierung des Threonin 495 in der Calmodulin-Bindungs-Domäne der eNOS verhindert die Bindung des Kalzium/Calmodulin (CaM)-Komplexes; dadurch wird die Aktivität des Proteins erheblich eingeschränkt [Fleming *et al.* 2001].

Im aktivierten Zustand, zum Beispiel beim Wirksamwerden von Scherkräften am Endothel, bleibt die Phosphorylierung von Serin1177 erhalten, Threonin 495 hingegen wird durch die Phosphatase PP1 dephosphoryliert [Michell *et al.* 2001 und Harris *et al.* 2001], dies führt zur Bindung des Kalzium/Calmodulin Komplexes und die NO Produktion steigt.

Diese Ergebnisse zeigen die entscheidende Rolle des Threonin 495 in der Calmodulin-Bindungs-Region der eNOS. Bei Untersuchungen mit *in vitro* Mutationen an diesem Rest wurde dies auch schon bekräftigt [Fleming *et al.* 2001].

Eine Analyse der humanen Calmodulin-Bindungs-Domäne (aa492-510) ergab, daß außer dem zentralen Thr495 die angrenzenden Threoninreste an der Position 488 und 491 vorhanden sind. Unter Benutzung von NetPhos 2.0 wurde gezeigt, daß außer dem Thr495 auch Thr491 eine hohe Wahrscheinlichkeit besitzt durch die PKC phosphoryliert zu werden (0,813 Thr491 vs. 0,971 Thr495) [Blom *et al.* 1999]; dahingegen scheint die in dieser Studie gefundene Mutation im Thr488 (0,021) kein direktes Ziel der Phosphorylierung zu sein. Das Thr an der Position 488 scheint aber eine wichtige Rolle für die Struktur der Calmodulin-Bindungs-Domäne zu spielen. Sekundäre Analysen zur Struktur dieser Region an Predict Proteinen (PP) gaben Hinweise darauf, daß die Struktur des Proteins sich ändert, wenn ein Thr 488 durch ein Isoleucin ausgetauscht wird.

Am interessantesten ist aber, daß die Substitution von Thr 488 durch Isoleucin die Wahrscheinlichkeit der Phosphorylierung von Thr 491 durch PKC auf einen Wert von 0,607 senkt. Diese Reduktion scheint durch Thr 488 spezifisch vermittelt zu werden, da auch der Austausch verschiedener Aminosäuren aller angrenzenden Reste und sogar die Substitution der Aminosäure an Position 488 ( mit der Ausnahme von Alanin) keine Senkung der Phosphorylierungsrate von Thr 491 bewirkten [Rost 1996].

Eine neueste Arbeit aus 2003 von Bauer [Bauer *et al.*, 2003] untersuchte den Einfluss verschiedntlicher Serinphosphorylierungsreste der eNOS auf die NO-Produktion und deren Assoziation mit HSP90 und Akt. Dabei zeigte sich, dass die Mutation der Serinreste 116, 617 und 1179 zu Alanin zu Affektionen des Phosphorylierungszustandes zumindest einer anderen Region führte. Die Mutationen des Serin 116 und 617 zu Alanin bewirkte eine größere Proteininteraktion zwischen HSP90 und Akt und eine verstärkte Phosphorylierung am Serin 1179. Diese Arbeit zeigte das komplexe Zusammenwirken der unterschiedlichen Phosphorylierungen an unterschiedlichen Serinresten und deren gegenseitige Beeinflussung.

An bovinen aortalen Endothelzellen konnte gezeigt werden, dass H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, welches durch oxidativen Stress am Endothel entsteht, zu einer verstärkten eNOS-Aktivität führt. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aktiviert die Akt, verstärkt die eNOS Phosphorylierung am Ser-1177 und vermindert die Phosphorylierung am Thr-495 [Thomas *et al.*, 2002]. Es kommt also zu einer direkten

Beeinflussung der eNOS Aktivität durch oxidativen Stress und dadurch zu einem gestörten Zusammenspiel des Endothels mit NO im Falle einer KHK.

Allen eNOS Enzymen unterschiedlichster Spezies (Kuh, Ratte, Meerschweinchen, Maus) ist gemeinsam, daß immer ein Threonin oder ein Alanin an dieser Position vorhanden ist, was auf eine strukturelle Konservierung dieses Restes in der eNOS hinweist. So ist es möglich, daß die T488I Mutation die Zugänglichkeit von Thr 495 beeinflusst. Dies könnte den Phosphorylierung/Dephosphorylierungsmechanismus betreffen und zu einer verminderten eNOS Aktivität führen.

Eine neueste Arbeit aus 2003 [Fleming und Busse, 2003] untersuchte nochmals, welche Auswirkungen die Alterationen in der Phosphorylierung des Serinrestes (Ser(1177)) in der Reduktasedomäne und des Threoninrestes (Thr(495)) in der Calmodulinbindungsdomäne auf die Aktivität der eNOS haben. Dabei zeigte sich, dass verschiedene Stimuli zu einer simultanen Alteration in der Phosphorylierung des Threonin und des Serin führen. Reguliert wird der ganze Prozess durch eine ganze Anzahl von Kinasen und Phosphatasen, die kontinuierlich vom eNOS-Signal-Komplex dissoziieren und assoziieren. Mit der eNOS assoziierte Proteine, wie Caveolin, Hitzeschockprotein 90 und möglicherweise auch Motorproteine stellen das Gerüst für die Formation des Proteinkomplexes, essentiell ist dabei auch die intrazelluläre Lokalisation des Komplexes. Diese Arbeit macht deutlich, wie komplex die Interaktionen sind und wie leicht eine Mutation zu einer Fehlfunktion führen kann.

Die detektierte Mutation beim Studienpatienten könnte Einfluss auf die Freisetzung von NO gehabt haben und somit die Entstehung einer KHK begünstigt haben.

Das DGGE basierte Mutationsscreening in Regionen der eNOS, sowie in modulierenden Faktoren, diente dem Versuch, Mutationen zu identifizieren, die den Regulationsmechanismus der eNOS maßgeblich beeinflussen und damit zu der Entstehung einer vorzeitigen koronaren Herzkrankheit und zu erektiler Dysfunktion bei Männern führen könnten. Unter der Annahme, daß sich die gefundenen Mutation nur bei Männern ausprägt, könnte eine Infertilität aufgrund der erektilen Dysfunktion die Ursache einer fehlenden Vererbung sein.

Das Ergebnis, daß außer zweier stiller Mutationen nur eine strukturell relevante Mutation in der Studie gefunden wurde, deutet darauf hin, daß es sich bei diesen Regionen im Nitric oxide pathway um hochkonservierte Regionen handelt.

Um die Ergebnisse und Thesen zu bestätigen sind weitergehende Studien erforderlich. Dazu sind Screeninguntersuchungen auf genetische Veränderungen mit einer größeren

Anzahl von Patienten, wie auch einer Kontrollgruppe von Gesunden, sowie funktionelle in vitro Studien der T488I Mutation notwendig. Zur Einschätzung der funktionellen Relevanz sind in vitro Studien mit transfizierten Endothelzellen geplant.

## 6. Zusammenfassung

Die endotheliale Stickoxydsynthase (eNOS) ist ein wichtiges regulatorisches Enzym, welches die Produktion von vasoprotektivem Stickstoffmonoxid (NO) aus L-Arginin katalysiert. Sie reguliert somit den systemischen Blutdruck und greift in den Gefäßumbau und die Angiogenese ein. Verminderte NO Produktion, die durch Störungen im NO-Zyklus zustande kommt, ist assoziiert mit der Entwicklung vorzeitiger Atherosklerose.

Bis jetzt sind zwei Polymorphismen für das eNOS-Gen in der Literatur beschrieben worden mit unterschiedlichen Ergebnissen bezüglich der Entwicklung einer Atherosklerose.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 795 Patienten aus dem Marburger KHK Präventionsprojekts nach bekannten und unbekanntem Mutationen in wichtigen Regionen des eNOS-Gens sowie Regionen in Genen, die für wichtige Proteine kodieren, die die Aktivität der eNOS entscheidend beeinflussen, gesucht. Ein schon beschriebener Polymorphismus der eNOS (Glu<sub>298</sub>Asp) und sieben verschiedene Genregionen wurden mittels PCR und Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus (RFLP) bzw. PCR und denaturierender Gradientengelelektrophorese (DGGE) untersucht. Die untersuchten Genbereiche sind: 1.) die eNOS-Promoter Region, 2.) die Calmodulin-Bindungsseite, 3.) die Arginin-Substrat-Bindungsseite, 4.) die Akt/PKB Phosphorylierungsseite, 5.) die Hauptdomäne von Caveolin, 6.) die Serin-/Threoninkinase Domäne Akt/PKB und 7.) der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor-Rezeptor 2 (VEGFR-2).

Im ganzen wurden drei neue Mutationen bei den 795 Patienten identifiziert. Dabei handelte es sich bei zweien um stille Mutationen. Sie lagen in der Region, die für die Arginin-Bindungsseite kodiert.

Bei der dritten handelte es sich um eine heterozygote Mutation, die die Calmodulinbindungsseite der eNOS betrifft. Ein C wird an der Position 1463 der cDNA in ein T ausgetauscht, so wird Threonin an der Stelle 488 zu Isoleucin (Thr<sub>488</sub>Ile). Der Träger dieser Mutation litt an vorzeitiger koronarer Herzkrankheit (KHK) und milder Raynaud-Symptomatik. Koronarangiographisch zeigten sich eine 2-Gefäßerkrankung und koronare Vasospasmen.

Wie schon in anderen Arbeiten beschrieben, wurde auch in dieser keine Assoziation des Glu<sub>298</sub>Asp Polymorphismus mit KHK gefunden.

Die Ergebnisse zeigen, daß es sich bei den untersuchten Genbereichen um hochkonservierte Regionen handelt, die für die Funktion der eNOS von entscheidender Bedeutung sind.

Die eNOS Aktivität wird durch den schnellen Wechsel von Phosphorylierung und Dephosphorylierung an den Resten Threonin 495 und Serin 1177 reguliert. Dabei kommt der Phosphorylierung des Thr 495 eine entscheidende Rolle zu. Die angrenzenden Threoninresten 488 und 491 sind für die Modifizierung von Bedeutung. Der Aminosäureaustausch Thr488Ile bewirkt eine Senkung der Phosphorylierungsrate von Thr491. Dieser Mechanismus scheint spezifisch für den Rest Thr488 zu sein. Allen eNOS Enzymen unterschiedlicher Spezies ist ein Threonin oder Alanin an dieser Stelle 488 gemeinsam. Dies weist auf eine strukturelle Konservierung dieses Restes der eNOS hin. So ist es möglich, daß die T488I Mutation die Zugänglichkeit von Thr 495 beeinflusst und damit zu einer verminderten eNOS Aktivität führt.

Die detektierte Mutation könnte also erheblichen Einfluss auf die Freisetzung von NO gehabt haben und damit die Entstehung einer KHK beim Studienpatienten begünstigt- wenn nicht sogar verursacht- haben.

Um die Ergebnisse zu stützen sind weitergehende Untersuchungen erforderlich. So sollten die Genbereiche in einem größeren Studenumfang untersucht werden und sich eine in vitro Studie der T488I Mutation anschließen.



## 7. Literaturverzeichnis

1. Abu-Soud HM, Yoho LL, Stuehr DJ. Calmodulin controls neuronal nitric-oxide synthase by a dual mechanism. Activation of intra-and interdomain electron transfer. *J Biol Chem.* 1994; 269(51):32047-32050.
2. Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J.* 2001; 357:593-615.
3. Alheid U, Frolich JC, Forstermann U. Endothelium-derived relaxing factor from cultured human endothelial cells inhibits aggregation of human platelets. *Thromb Res.* 1987; 47:561-571.
4. Anderson RG. Caveolae: where incoming and outgoing messengers meet. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993; 90:10909-10913.
5. Assmann G, Cullen P, Schulte H. Simple scoring scheme for calculating the risk of acute coronary events based on the 10-year follow-up of the prospective cardiovascular Munster (PROCAM) study. *Circulation.* 2002; 105(3):310-315.
6. Ayajiki K, Kindermann M, Hecker M, Fleming I, Busse R. Intracellular pH and tyrosine phosphorylation but not calcium determine shear stress-induced nitric oxide production in native endothelial cells. *Circ Res.* 1996; 78:750-758.
7. Bauer PM, Fulton D, Boo YC, Sorescu GP, Kemp BE, Jo H, Sessa WC. Compensatory phosphorylation and protein-protein interactions revealed by loss of function and gain of function mutants of multiple serine phosphorylation sites in endothelial nitric-oxide synthase. *J Biol Chem.* 2003; 278(17):14841-14849.
8. Blair A, Shaul PW, Yuhanna IS, Conrad PA, Smart EJ. Oxidized low-density lipoprotein displaces eNOS from plasmalemmal caveolae and impairs eNOS activation. *J Biol Chem.* 1999; 274:32512-32519.
9. Blom N, Gammeltoft S, Brunak S. Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. *J Mol Biol* 1999; 294:1351-1362.
10. Boo YC, Sorescu G, Boyd N, Shiojima I, Walsh K, Du J, Jo H. Shear stress stimulates phosphorylation of endothelial nitric-oxide synthase at Ser1179 by Akt-independent mechanisms: role of proteinkinase A. *J Biol Chem.* 2002; 277(5):3388-3396.
11. Bredt DS, Snyder SH. Nitric oxide: a physiologic messenger molecule. *Annu Rev Biochem.* 1994; 63:175-195.

12. Burgering BM, Coffey PJ. Protein kinase B (c-Akt) in phosphatidylinositol-3-OH kinase signal transduction. *Nature*. 1995; 376:599-602.
13. Busse R, Mulsch A. Calcium-dependent nitric oxide synthesis in endothelial cytosol is mediated by calmodulin. *FEBS Lett*. 1990; 265:133-136.
14. Busse R, Fleming I. Pulsatile stretch and shear stress: physical stimuli determining the production of endothelium-derived relaxing factors. *J Vasc Res*. 1998; 35:73-84.
15. Butt E, Bernhardt M, Smolenski A, Kotsonis P, Fröhlich LG, Sickmann A, Meyer HE, Lohmann SM, Schmidt HHHW. Endothelial nitric oxide synthase (type III) is activated and becomes calcium independent upon phosphorylation by cyclic nucleotide-dependent protein kinases. *J Biol Chem*. 2000; 275:5179-5187.
16. Cai H, Wilcken DEL, Wang XL. The Glu-298->Asp (894G->T) mutation at exon 7 of the endothelial nitric oxide synthase gene and coronary artery disease. *J Mol Med*. 1999; 77:511-514.
17. Cardona-Sanclemente LE, Born GV. Effect of inhibition of nitric oxide synthesis on the uptake of LDL and fibrinogen by arterial walls and other organs of the rat. *Br J Pharmacol*. 1995; 114:1490-1494.
18. Cardone MH, Roy N, Stennicke HR, Salvesen GS, Franke TF, Stanbridge E, Frisch S, Reed JC. Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science*. 1998; 282:1318-1321.
19. Castelli WP, Garrison RJ, Wilson PW, Abbott RD, Kalousdian S, Kannel WB. Incidence of coronary heart disease and lipoprotein cholesterol levels. The Framingham Study. *JAMA*. 1986; 256(20):2835-2838.
20. Caulin-Glaser T, Garcia-Cardena G, Sarrel P, Sessa WC, Bender JR. 17 $\beta$ -estradiol regulation of human endothelial cell basal nitric oxide release, independent of cytosolic Ca<sup>2+</sup> mobilization. *Circ Res*. 1997; 81:885-892.
21. Chen PF, Tsai AL, Berka V, Wu KK. Endothelial nitric-oxide synthase. Evidence for bidomain structure and successful reconstitution of catalytic activity from two separate domains generated by a baculovirus expression system. *J Biol Chem*. 1996; 271:14631-14635.
22. Chen PF, Tsai AL, Berka V, Wu KK. Mutation of Glu-361 in human endothelial nitric-oxide synthase selectively abolishes L-arginine binding without

- perturbing the behavior of heme and other redox centers. *J Biol Chem.* 1997; 272:6114-6118.
23. Chien A, Edgar DB, Trela JM. Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *thermus aquaticus*. *J Bacteriol.* 1976; 127(3):1550-1557.
24. Corson MA, James NL, Latta SE, Nerem RM, Berk BC, Harrison DG. Phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase in response to fluid shear stress. *Circ Res.* 1996; 79:984-991.
25. Couet J, Li SW, Okamoto T, Scherer PE, Lisanti MP. Molecular and cellular biology of caveolae: paradoxes and plasticities. *Trends Cardiovasc Med.* 1997; 7:103-110.
26. Deguchi T, Yoshioka M. L-arginine identified as an endogenous activator for soluble guanylate cyclase from neuroblastoma cells. *J Biol Chem.* 1982; 257:10147-10151.
27. Dietzen DJ, Hastings WR, Lublin DM. Caveolin is palmitoylated on multiple cysteine residues. Palmitoylation is not necessary for localization of caveolin to caveolae. *J Biol Chem.* 1995; 270:6838-6842.
28. Dimmeler S, Assmus B, Hermann C, Haendeler J, Zeiher AM. Fluid shear stress stimulates phosphorylation of Akt in human endothelial cells: involvement in suppression of apoptosis. *Circ Res.* 1998; 83:334-341.
29. Dimmeler S, Dernbach E, Zeiher AM. Phosphorylation of the endothelial nitric oxide synthase at ser-1177 is required for VEGF-induced endothelial cell migration. *FEBS-Lett.* 2000; 477:258-262.
30. Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R, Zeiher AM. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature.* 1999; 399:601-605.
31. Downward J. Mechanisms and consequences of activation of protein kinase B/Akt. *Curr Opin Cell Biol.* 1998; 10:262-267.
32. Dweik RA, Laskowski D, Abu-Soud HM, Kaneko FT, Hutte R, et al.. Nitric oxide synthesis in the lung. Regulation by oxygen through a kinetic mechanism. *J Clin Invest.* 1998; 101:660-666.
33. Fairchild TA, Fulton D, Fontana JT, Gratton JP, McCabe TJ, Sessa WC. Acidic hydrolysis as a mechanism for the cleavage of the Glu(298)-->Asp variant of human endothelial nitric-oxide synthase. *J Biol Chem.* 2001; 276:26674-26679.

34. Feron O, Belhassen L, Kobzik L, Smith TW, Kelly RA, Michel T. Endothelial nitric oxide synthase targeting to caveolae. Specific interactions with caveolin isoforms in cardiac myocytes and endothelial cells. *J Biol Chem.* 1996; 271:22810-22814.
35. Feron O, Dessy C, Desager JP. Hydroxy-methylglutaryl-coenzyme A reductase inhibition promotes endothelial nitric oxide synthase activation through a decrease in caveolin abundance. *Circulation.* 2001; 103:113-118.
36. Feron O, Dessy C, Moniotte S, Desager J-P, Balligand JL. Hypercholesterolemia decreases nitric oxide production by promoting the interaction of caveolin and endothelial nitric oxide synthase. *J Clin Invest.* 1999; 103:897-905.
37. Feron O, Saldana F, Michel JB, Michel T. The endothelial nitric oxide synthase-caveolin regulatory cycle. *J Biol Chem.* 1998; 273:3125-3128.
38. Fischer SG, Lerman LS. Separation of random fragments of DNA according to properties of their sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1980; 77(8):4420-4424.
39. Fisslthaler B, Dimmeler S, Hermann C, Busse R, Fleming I. Phosphorylation and activation of the endothelial nitric oxide synthase by fluid shear stress. *Acta Physiol Scand.* 2000; 168:81-88.
40. Fleming I, Busse R. Signal transduction of eNOS activation. *Cardiovasc Res.* 1999; 43:532-541.
41. Fleming I, Busse R. Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2003; 284(1):R1-12.
42. Fleming I, Fisslthaler B, Dimmeler S, Kemp BE, Busse R. Phosphorylation of Thr(495) regulates Ca(2+)/calmodulin-dependent endothelial nitric oxide synthase activity. *Circ Res.* 2001; 88:E68-E75.
43. Folkerts G, van der Linde HJ, Nijkamp FP. Virus-induced airway hyperresponsiveness in guinea pigs is related to a deficiency in nitric oxide. *J Clin Invest.* 1995; 95:26-30.
44. Fulton D, Gratton J-P, McCabe TJ, Fontana J, Fujio Y, Walsh K, Franke TF, Papapetropoulos A, Sessa WC. Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature.* 1999; 399:579-601.

45. Furchgott RF, Cherry PD, Zawadzki JV, Jothianandan D. Endothelial cells as mediators of vasodilation of arteries. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1984; 6 Suppl 2:S336-S343.
46. Gallis B, Corthals GL, Goodlett DR, Ueba H, Kim F, Presnell SR, Figeys D, Harrison DG, Berte BC, Aebersold R, Corson MA. Identification of flow-dependent endothelial nitric oxide synthase phosphorylation sites by mass spectrometry and regulation of phosphorylation and nitric oxide production by the phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor LY294002. *J Biol Chem.* 1999; 274:30101-30108.
47. Garcia-Cardena G, Fan R, Stern DF, Liu J, Sessa WC. Endothelial nitric oxide synthase is regulated by tyrosine phosphorylation and interacts with caveolin-1. *J Biol Chem.* 1996; 271:27237-27240.
48. Garcia-Cardena G, Martasek P, Masters BS, Skidd PM, Couet J, Li S, Lisanti MP, Sessa WC. Dissecting the interaction between nitric oxide synthase (NOS) and caveolin. Functional significance of the NOS caveolin binding domain in vivo. *J Biol Chem.* 1997; 272:25437-25440.
49. Garcia-Cardena G, Oh P, Liu J, Schnitzer JE, Sessa WC. Targeting of nitric oxide synthase to endothelial cell caveolae via phosphorylation: implications for nitric oxide signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996; 93:6448-6453.
50. Gardemann A, Lohre J, Cayci S, Katz N, Tillmanns H, Haberbosch W. The T allele of the missense Glu (298) Asp endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism is associated with coronary heart disease in younger individuals with high atherosclerotic risk profile. *Artherosclerosis.* 2002; 160:167-175.
51. Gibbons GH, Dzau VJ. Molecular therapies for vascular diseases. *Science.* 1996; 272: 689-693.
52. Glenney JR Jr. The sequence of human caveolin reveals identity with VIP21, a component of transport vesicles. *FEBS Lett.* 1992; 314:45-48.
53. Glenney JR Jr., Soppet D. Sequence, expression of caveolin, a protein component of caveolae plasma membrane domains phosphorylated on tyrosine in Rous sarcoma virus-transformed fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992; 89:10517-10521.
54. Golser R, Gorren AC, Mayer B, Schmidt K. Functional characterization of Glu298Asp mutant human endothelial nitric oxide synthase purified from a yeast expression system. *Nitric Oxide.* 2003; 8:7-14.

55. Granath B, Taylor RR, van Bockxmeer FM, Mamotte CD. Lack of evidence for association between endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and coronary artery disease in the Australian Caucasian population. *J Cardiovasc Risk*. 2001; 8:235-241.
56. Green LC, Tannenbaum SR, Goldman P. Nitrate synthesis in the germfree and conventional rat. *Science*. 1981; 212:56-58.
57. Gustaffson LE, Leone AM, Persson MG, Wiklund NP, Moncada S. Endogenous nitric oxide is present in the exhaled air of rabbits, guinea pigs and humans. *Biochem Biophys Res Commun*. 1991; 181:852-57.
58. Hambrecht R, Adams V, Erbs S, Linke A, Kränkel N, Shu Y, Baither BS, Gielen S, Thiele H, Gummert JF, Mohr FW, Schuler G. Regular physical activity improves endothelial function in patients with coronary artery disease by increasing phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase. *Eur Heart J*. 2003; 24(9):820-827.
59. Harris MB, Ju H, Venema VJ, Liang H, Zou R, Michell BJ, Chen ZP, Kemp BE, Venema RC. Reciprocal phosphorylation and regulation of endothelial nitric-oxide synthase in response to bradykinin stimulation. *J Biol Chem*. 2001; 276:16587-16591.
60. Herley MT, Yu Y, Whitney RG, Sato JD. Characterization of the VEGF binding site on the Flt-1 receptor. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999; 262(3):731-738.
61. Hibbs JB Jr, Taintor RR, Vavrin Z. Macrophage Cytotoxicity: Role for L-arginine deiminase and imino nitrogen oxidation to nitrite. *Science*. 1987; 235:473-476.
62. Hibi K, Ishigami T, Tamura K, Mizushima S, Nyui N, Fujita T, Ochiai H, Kosuge M, Watanabe Y, Yoshii Y, Kihara M, Kimura K, Ishii M, Umemura S. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism and acute myocardial infarction. *Hypertension*. 1998; 32:521-526.
63. Hingorani AD, Liang CF, Fatibene J, Lyon A, Monteith S, Parsons A, Haydock S, Hopper RV, Stephens NG, O'Shaughnessy KM, Brown MJ. A common variant of the endothelial nitric oxide synthase ( Glu298->Asp) is a major risk factor for coronary artery disease in the UK. *Circulation*. 1999; 100:1515-1520.

64. Hirata K, Miki N, Kuroda Y, Sakoda T, Kawashima S, Yokoyama M. Low Concentration of oxidized low-density lipoprotein and lysophosphatidylcholine upregulate constitutive nitric oxide synthase mRNA expression in bovine aortic endothelial cells. *Circ Res.* 1995; 76:958-962.
65. Jáchymova M, Horký K, Bultas J, Kozich V, Jindra A, Peleska J, Martásek P. Association of the Glu298Asp polymorphism in the endothelial nitric oxide synthase gene with essential hypertension resistant to conventional therapy. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001; 284(2):426-430.
66. James NC, Harrison DG, Nerem RM. Effects of shear on endothelial cell calcium in the presence and absence of ATP. *FASEB J.* 1995; 9:968-973.
67. James P, Vorherr T, Carafoli E. Calmodulin-binding domains: just two faced or multi-faceted? *Trends Biochem Sci.* 1995; 20:38-42.
68. Ju H, Zou R, Venema VJ, Venema RC. Direct interaction of endothelial nitric oxide synthase and caveolin-1 inhibits synthase activity. *J Biol Chem.* 1997; 272:18522-18525.
69. Karantzoulis-Fegarast F, Antoniou H, Lai Scheue-Lim M, Kulkarni G, D'Abreo C, Wong GKT, Miller TL, Chan Y, Atkins J, Wang Y, Marsden PA. Characterization of the human endothelial nitric-oxide synthase promoter. *J Biol Chem.* 1999; Vol.274:3076-3093.
70. Katusic ZS. Vascular endothelial dysfunction: does Tetrahydrobiopterin play a role? *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2001; 281:H981-H986.
71. Kim I, Kim HG, So J-N, Kim JH, Kwak HJ, Koh GY. Angiotensin-1 regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol-3'-kinase/Akt signal transduction pathway. *Circ Res.* 2000; 86:24-29.
72. Kuchan MJ, Frangos JA. Role of calcium and calmodulin in flow-induced nitric oxide production in endothelial cells. *Am J Physiol.* 1994; 266:C628-C636.
73. Kuvin JT, Ramet ME, Patel AR, Pandian NG, Mendelsohn ME, Karas RH. A novel mechanism for the beneficial vascular effects of high-density lipoprotein cholesterol: enhanced vasorelaxation and increased endothelial nitric oxide synthase expression. *Am Heart J.* 2002; 144(1):165-72.
74. Lamas S, Marsden P, Li GK, Tempst P, Michel T. Endothelial nitric oxide synthase: molecular cloning and characterization of a distinct constitutive enzyme isoform. *Proc. Natl Acad Sci U S A.* 1992; 93:6348-6352.

75. Lamas S, Michel T, Collins T, Brenner BM, Marsden PA. Effects of interferon-gamma on nitric oxide synthase activity and endothelin-1 production by vascular endothelial cells. *J Clin Invest.* 1992; 90:879-887.
76. Lee H, Park DS, Razani B, Russell RG, Pestell RG, Lisanti MP. Caveolin-1 mutations (P132 and null) and the pathogenesis of breast cancer: caveolin-1 (P132L) behaves in a dominant-negative manner and caveolin-1 (-/-) null mice show mammary epithelial cell hyperplasia. *Am J Pathol.* 2002; 161:1357-1369.
77. Lefer AM. Nitric oxide: nature's naturally occurring leukocyte inhibitor. *Circulation.* 1997; 95:553-554.
78. Li H, Förstermann U. Nitric oxide in the pathogenesis of vascular disease. *J Pathol.* 2000; 190:244-254.
79. Li S, Couet J, Lisanti MP. Src tyrosine kinases, G-a-subunits, and H-ras share a common membrane-anchored scaffolding protein, caveolin. Caveolin binding negatively regulates the auto-activation of Src tyrosine kinases. *J Biol Chem.* 1996; 271:29182-29190.
80. Liao JK, Shin WS, Lee WY, Clark SL. Oxidized low-density lipoprotein decreases the expression of endothelial nitric oxide synthase. *J Biol Chem.* 1995; 270:319-324.
81. Linder L, Kiowski W, Buhler FR, Luscher TF. Indirect evidence for release of endothelium-derived relaxing factor in human forearm circulation in vivo. Blunted response in essential hypertension. *Circulation.* 1990; 81:1762-1767.
82. Liu J, Hughes TE, Sessa WC. The first 35 amino acids and fatty acylation sites determine the molecular targeting of endothelial nitric oxide synthase into Golgi region of cells: a green fluorescent protein study. *J Cell Biol.* 1997; 137:1525-1535.
83. Liyou N, Simons L, Friedlander Y, Simons J, McCallum J, O'Shaughnessy K, Johnson A. Coronary artery disease is not associated with the E298D variant of the constitutive, endothelial nitric oxide synthase gene. *Clin Genet.* 1998; 54:528-529.
84. Loscalzo J, Welch G. Nitric oxide and its role in the cardiovascular system. *Prog Cardiovasc Dis.* 1995; 38:87-104.
85. Luscher TF, Tanner FC, Tschudi MR, Noll G. Endothelial dysfunction in coronary artery disease. *Annu Rev Med.* 1993; 44:395-418.



- 
86. Marletta MA. Nitric oxide synthase structure and mechanism. *J Biol Chem.* 1993; 268:12231-12234.
  87. Marrero MB, Venema VJ, Ju H, He H, Liang H, Caldwell RB, Venema RC. Endothelial nitric oxide synthase interactions with G-protein coupled receptors. *Biochem J.* 1999; 343:335-340.
  88. Marsden PA, Heng HH, Scherer SW, Stewart RJ, Hall AV, Shi XM, Tsui LC, Schappert KT. Structure and chromosomal localization of the human constitutive endothelial nitric oxide synthase gene. *J Biol Chem.* 1993; 268:17478-17488.
  89. Marsden PA, Schappert KT, Chen HS, Flowers M, Sundell CL, Wilcox JN, Lamas S, Michel T. Molecular cloning and characterization of human endothelial nitric oxide synthase. *FEBS Lett.* 1992; 307:287-293.
  90. McCabe TJ, Fulton D, Roman LJ, Sessa WC. Enhanced electron flux and reduced calmodulin dissociation may explain „calcium-independent“ eNOS activation by phosphorylation. *J Biol Chem.* 2000; 275:6123-6128.
  91. McQuillan LP, Leung GK, Marsden PA, Kostyk SK, Kourembanas S. Hypoxia inhibits expression of eNOS via transcriptional and posttranscriptional mechanisms. *Am J Physiol.* 1994; 267:H1921-H1927.
  92. Michel JB, Feron O, Sase K, Prabhakar P, Michel T. Caveolin versus Calmodulin – Counterbalancing allosteric modulators of endothelial nitric oxide synthase. *J Biol Chem.* 1997; 272:25907-25912.
  93. Michel T. Targeting and translocation of endothelial nitric oxide synthase. *Braz J Med Biol Res.* 1999; 32:1361-1366.
  94. Michell BJ, Chen Z, Tiganis T, Stapleton D, Katsis F, Power DA, Sim AT, Kemp BE. Coordinated Control of endothelial nitric-oxide synthase phosphorylation by protein kinase C and the cAMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem.* 2001; 276:17625-17628.
  95. Michell BJ, Griffiths JE, Mitchelhill KI, Rodriguez-Crespo, Tiganis T, Bozinovski S, Ortiz de Montellano PR, Kemp BE, Pearson RB. The Akt Kinase signals directly to endothelial nitric oxide synthase. *Curr Biol.* 1999; 9:845-848.
  96. Milligan G, Parenti M, Magee AI. The dynamic role of palmitoylation in signal transduction. *Trends Biochem Sci.* 1995; 20:181-187.

97. Mineo C, Shaul PW. HDL stimulation of endothelial nitric oxide synthase: a novel mechanism of HDL action. *Trends Cardiovasc Med.* 2003; 13(6):226-231.
98. Minor RL, Jr., Myers PR, Guerra R, Jr., Bates JN, Harrison DG. Diet-induced atherosclerosis increases the release of nitrogen oxides from rabbit aorta. *J Clin Invest.* 1990; 86:2109-2116.
99. Mullis KB, Erlich HA, Arnheim N, Horn GT, Saiki R, Scharf SJ, assigned to Cetus Corporation. Process for amplifying, detecting, and/or cloning nucleic acid sequences. *Biotechnol Adv.* 1989; 7(2):250.
100. Murga C, Laguinge L, Wetzker R, Cuadrado A, Gutkind JS. Activation of Akt/proteinkinase B by G-protein-coupled receptors. A role for  $\alpha$ - and  $\beta$ -subunits of heterotrimeric G proteins acting through phosphatidylinositol-3-OH kinase gamma. *J Biol Chem.* 1998; 273:19080-19085.
101. Myers RM, Fischer SG, Maniatis T, Lerman LS. Modification of the melting properties of duplex DNA by attachment of a GC-rich DNA sequence as determined by denaturing gradient gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res.* 1985; 13(9):3111-3129.
102. Myers RM, Lerman LS, Maniatis T. A general method for saturation mutagenesis of cloned DNA fragments. *Science.* 1985; 19;229(4710):242-247.
103. Nadaud S, Bonnardeaux A, Lathrop M, Soubrier F. Gene structure, polymorphism and mapping of the human endothelial nitric oxide synthase gene. *Biochem Biophys Res Commun.* 1994; 198:1027-1033.
104. Nakaki T, Nakayama M, Kato R. Inhibition by nitric oxide and nitric oxide-producing vasodilators of DNA synthesis in vascular smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol.* 1990; 189:347-353.
105. Nunokawa Y, Tanaka S. Interferon-Gamma inhibits proliferation of rat vascular smooth muscle cells by nitric oxide generation. *Biochem Biophys Res Commun.* 1992; 188:409-415.
106. O'Neil KT, DeGrado WF. How calmodulin binds its targets: sequence independent recognition of amphiphilic  $\alpha$ -helices. *Trends Biochem Sci.* 1990; 15:59-64.
107. Ohara Y, Peterson TE, Harrison DG. Hypercholesterolemia increases endothelial superoxide anion production. *J Clin Invest.* 1993; 91:2546-2551.

108. Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*. 1987; 327:524-526.
109. Papapetropoulos A, Garcia-Cardena G, Madri JA, Sessa WC. Nitric oxide production contributes to the angiogenic properties of vascular endothelial growth factor in human endothelial cells. *J Clin Invest*. 1997; 100:3131-3139.
110. Parton RG. Caveolae and caveolins. *Curr Opin Cell Biol*. 1996; 8:542-548.
111. Peach MJ, Loeb AL, Singer HA, Saye J. Endothelium-derived vascular relaxing factor. *Hypertension*. 1985; 7:194-1100.
112. Radomski MW, Palmer RM, Moncada S. The anti-aggregating properties of vascular endothelium: interactions between prostacyclin and nitric oxide. *Br J Pharmacol*. 1987; 92:639-646.
113. Radomski MW, Palmer RMJ, Moncada S. Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium. *Lancet*. 1987; 2:1057-1058.
114. Ramet ME, Ramet M, Lu Q, Nickerson M, Savolainen MJ, Malzone A, Karas RH. High-density lipoprotein increases the abundance of eNOS protein in human vascular endothelial cells by increasing its half-life. *J Am Coll Cardiol*. 2003 18; 41(12):2288-2297.
115. Rhyner JA, Ottiger M, Wicki R, Greenwood TM, Strehler EE. Structure of the human CALM1 calmodulin gene and identification of two CALM1-related pseudogenes CALM1P1 and CALM1P2. *Eur J Biochem*. 1994; 225(1):71-82.
116. Robinson LJ, Michel T. Mutagenesis of palmitoylation sites in endothelial nitric oxide synthase identifies a novel motif for dual acylation and subcellular targeting. *Proc Natl Acad Sci*. 1995; 92:11776-11780.
117. Robinson LJ, Busconi L, Michel T. Agonist-modulated palmitoylation of endothelial nitric oxide synthase. *J Biol Chem*. 1995; 270:995-998.
118. Ross R. Atherosclerosis-an inflammatory disease. *N Engl J Med*. 1999; 340(2):115-126.
119. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature*. 1993; 362:801-809.
120. Rost B. PHD: predicting one-dimensional protein structure by profile-based neural networks. *Methods Enzymol*. 1996; 266:525-539.

121. Rothenberg KG, Heuser JE, Donzell WC, Ying YS, Glenney JR, Anderson RG. Caveolin, a protein component of caveolae membrane Coats. *Cell*. 1992; 68:673-682.
122. Sargiacomo M, Scherer P, Tang Z-L, Kubler E, Song KS, Sanders MC, Lisanti MP. Oligomeric structure of caveolin: implications for caveolae membrane organization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995; 92:9407-9411.
123. Sase K, Michel T. Expression and regulation of endothelial nitric oxide synthase. *Trends Clin Med*. 1997; 7:28-37.
124. Schaefer JR, Sattler AM, Hackler B, Kurt B, Hackler R, Maisch B, Soufi M. Hyperlipidemia in patients with apolipoprotein E 2/2 phenotype: apolipoprotein A5 S19W mutation as a cofactor. *Clin Chem*. 2004; 50:2214.
125. Schaefer JR, Simon B, Soufi M, Sattler A, Noll B, Herzum M, Maisch B. Strategies to optimize CAD prevention in modern cardiology. *Herz*. 2000; 25(2):113-116.
126. Scherer PE, Okamoto T, Chun M, Nishimoto I, Lodish HF, Lisanti MP. Identification, sequence, and expression of caveolin-2 defines a caveolin gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996; 93:131-135.
127. Schulte H, Cullen P, Assmann G. Obesity, mortality and cardiovascular disease in the Munster Heart Study (PROCAM). *Atherosclerosis*. 1999; 144(1):199-209.
128. Seiler C, Hess OM, Buechi M, Suter TM, Krayenbuehl HP. Influence of serum cholesterol and other coronary risk factors on vasomotion of angiographically normal coronary arteries. *Circulation*. 1993; 88:2139-2148.
129. Shaul PW, Smart EJ, Robinson LJ, German Z, Yuhanna IS, Ying Y, Anderson RG, Michel T. Acylation targets endothelial nitric-oxide synthase to plasmalemmal caveolae. *J Biol Chem*. 1996; 27:6518-6522.
130. Shaul PW. Regulation of endothelial nitric oxide synthase: location, location, location. *Annu Rev Physiol*. 2002; 64:749-774.
131. Sheffield VC, Cox DR, Lerman LS, Myers RM. Attachment of a 40-base-pair G + C-rich sequence (GC-clamp) to genomic DNA fragments by the polymerase chain reaction results in improved detection of single-base changes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989; 86(1):232-236.
132. Shimasaki Y, Yasue H, Yoshimura M, Nakayama M, Kugiyama K, Ogawa H, Harada E, Masuda T, Koyama W, Saito Y, Miyamoto Y, Ogawa Y, Nakao K.

- Association of the missense Glu298Asp variant of the endothelial nitric oxide synthase gene with myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol.* 1998; 31:1506-1510.
133. Stamler J, Wentworth D, Neaton JD. Is relationship between serum cholesterol and risk of premature death from coronary heart disease continuous and graded? Findings in 356,222 primary screenees of the Multiple Risk Factor Intervention Trial (MRFIT). *JAMA.* 1986; 256(20):2823-2828.
134. Stary HC. Pathologie der Atherosklerose. In: Schwandt P, Richter WO, editors. *Handbuch der Fettstoffwechselstörungen.* Stuttgart - New York: Schattauer-Verlag, 1995:48-64.
135. Steinberg D. Role of oxidized LDL and antioxidants in atherosclerosis. *Adv Exp Med Biol.* 1995; 369:39-48.
136. Stuehr DJ, Marletta MA. Mammalian nitrate biosynthesis: mouse macrophages produce nitrite and nitrate in response to escherichia coli lipopolysaccharide. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1985; 82:7738-7742.
137. Soufi M, Sattler AM, Maerz W, Starke A, Herzum M, Maisch B, Schaefer JR. A new but frequent mutation of apoB-100-apoB His3543Tyr. *Atherosclerosis.* 2004a; 174(1):11-16.
138. Soufi M, Schoppet M, Sattler AM, Herzum M, Maisch B, Hofbauer LC, Schaefer JR. Osteoprotegrin gene polymorphisms in men with coronary artery disease. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004b; 89(8):3764-3768.
139. Takahashi S, Mendelsohn ME. Synergistic activation of endothelial nitric-oxide synthase (eNOS) by HSP 90 and Akt: calcium-independent eNOS activation involves formation of an HSP90-Akt-CaM-bound eNOS complex. *J Biol Chem.* 2003; 278(33):30821-30827.
140. Terman BI, Carrion ME, Kovacs E, Rasmussen BA, Eddy RL, Shows TB. Identification of a new endothelial cell growth factor tyrosine kinase. *Oncogene.* 1991; 6:1677-1683.
141. Thomas SR, Chen K, Keaney JF Jr.. Hydrogen peroxide activates endothelial nitric-oxide synthase through coordinated phosphorylation and dephosphorylation via a phosphoinositide 3-kinase-dependent signaling pathway. *J Biol Chem.* 2002; 277(8):6017-6024.

142. Tsukahara H, Gordienko DV, Tonshoff B, Gelato MC, Goligorsky MS. Direct demonstration of insulin-like growth factor-I-induced nitric oxide production by endothelial cells. *Kidney Int.* 1994; 45:598-604.
143. Uittenbogaard A, Shaul PW, Yuhanna IS, Blair A, Smart EJ. High density lipoprotein prevents oxidized low density lipoprotein-induced inhibition of endothelial nitric-oxide synthase localization and activation in caveolae. *J Biol Chem.* 2000; 275:11278-11283.
144. Venema RC, Sayegh HS, Kent JD, Harrison DG. Identification, characterization, and comparison of the calmodulin-binding domains of the endothelial and inducible nitric oxide synthases. *J Biol Chem* 1996; 271:6435-6440.
145. Wang CL, Hsu LA, Ko YS, Ko YL, Lee YH. Lack of association between the Glu298Asp variant of the endothelial nitric oxide synthase gene and the risk of coronary artery disease among Taiwanese. *J Formos Med.* 2001; 100:736-740.
146. Wang X, Pease R, Bertinato J, Milne RW. Well-defined regions of apolipoprotein B-100 undergo conformational change during its intravascular metabolism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000; 20(5):1301-1308.
147. Wever RM, Luscher T F, Cosentino F, Rabelink T J. Atherosclerosis and the Two Faces of Endothelial Nitric Oxide Synthase. *Circulation.* 1998; 97:108-112.
148. Windler E, Hanefeld M, Klever-Deichert G, Klose G, Lauterbach K, Teupser D et al. Therapie von Fettstoffwechselfpatienten bei Risikopatienten. 1 ed. Bremen: UNI-MED Verlag AG, 2002.
149. Yao S-K, Ober JC, Krisnaswami A, Ferguson JJ, Anderson V, Golino P, Buja LM, Willerson JT. Endogenous nitric oxide inhibits human platelet aggregation and cyclic flow variations in stenosed and endothelium-injured arteries. *Circulation.* 1992; 86:1302-9.
150. Yoshimura M, Yasue H, Nakayama M, Shimasaki Y, Sumida H, Sugiyama S, Kugiyama K, Ogawa H, Orgawa Y, Saito Y, Miyamoto Y, Nakao K. A missense Glu298Asp variant in the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary spasm in the Japanese. *Hum Genet.* 1998; 103:65-69.
151. Yoshizumi M, Perrella M, Burnett, JC Jr., Lee M. Tumor necrosis factor downregulates endothelial nitric oxide synthase mRNA by shortening its half-life. *Circ Res.* 1993; 73:205-209.

## 8. Anhang

### 8.1. Abkürzungen

➤ AMP	Adenosin-5'-monophosphat
➤ A	Alanin
➤ Asp	Aspartat
➤ ATP	Adenosin-5'-diphosphat
➤ AVK	arterielle Verschlusskrankheit
➤ BH4	Tetrahydrobiopterin
➤ bp	Basenpaare
➤ C	Cytidin
➤ cAMP	3',5'-cyclo-AMP
➤ cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
➤ cGMP	3',5'-cyclo-GMP
➤ CRP	C-reaktives Protein
➤ DGGE	denaturierende Gradientengelelektrophorese
➤ DNA	Desoxyribonucleinsäure
➤ EDRF	Endothelium-derived relaxing factor
➤ eNOS	endotheliale Stickoxydsynthase
➤ FAD	Flavin-Adenin-Dinucleotid
➤ FMN	Flavin-Mononucleotid
➤ G	Guanosin
➤ Glu	Glutamat
➤ HDL	High-Density-Lipoprotein
➤ HSP90	Hitzeschockprotein 90
➤ IGF-1	insulin like growth factor
➤ Ile	Isoleucin
➤ iNOS	zytokin-induzierte Stickoxydsynthase
➤ IP3	Inositol-1,4,5-trisphosphat
➤ KHK	koronare Herzkrankheit
➤ LDL	Low Density Lipoprotein
➤ LDL-C	LDL-Cholesterol
➤ LIMA	left interventricular myocardial artery
➤ mRNA	Messenger-Ribonucleinsäure
➤ NADPH	reduziertes Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
➤ nNOS	neuronale Stickoxydsynthase
➤ NO	Stickstoffmonoxyd
➤ NOS	Stickoxydsynthase
➤ PCR	Polymerase Chain Reaction
➤ PKA	Proteinkinase A
➤ PKB	Proteinkinase B
➤ PKG	Proteinkinase G
➤ PTCA	perkutane transluminale coronare Angioplastie
➤ RFLP	Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus
➤ RPM	rounds per minute
➤ SDS	sodium dodecyl sulfate
➤ Ser	Serin
➤ sGC	lösliche Guanylylcyclase
➤ SSCP	single strand conformation polymorphism
➤ T	Thymidin

- 
- TAE-Puffer            Tris Acetic EDTA-Puffer
  - TEMED                N,N,N,N - Tetramethylethylenediamine
  - Thr                    Threonin
  - VEGF                 vascular endothelial growth factor

## 8.2      Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer an der Philipps- Universität zu Marburg von April 1997 bis April 2002 waren die Damen und Herren:

Arnold, Aumüller, Basler, Baum, Beato, Berger, Bertalanffy, Berndt, Brilla, Cetin, Daut, Engel, Engenhardt- Cabillic, Fruhstorfer, Fuhrmann, Gemsa, Geus, Gotzen, Griss, Grzeschik, Hadji, Happle, Hasilik, Heeg, Herzum, Hofmann, Joseph, Kern, Klenk, Klose, Koolmann, Kretschmer, Krieg, Kroll, Lange, Lennartz, Lippert, Maisch, Mennel, Moll, Moosdorf, Mueller, Mutters, Neubauer, Noll, Oertel, Peters, Pfab, Prinz, Remschmidt, Richter, Röhm, Rothmund, Schachtschabel, Schäfer, Schmitz- Moormann, Schnabel, Schneider, Schüffel, Schulz, Schwarz, Seitz, Seyberth, Siegrist, Simon, Slencka, Sommer, Steiniger, Steinmetz, Sturm, Vogelmeier, Vohland, Voigt, Weihe, Werner, von Wichert, Wulf, Zelder.

Meine akademischen Lehrer am Klinikum Fulda, Lehrkrankenhaus der Universität Marburg waren von April 2002 bis Mai 2003 während meines praktischen Jahres die Damen und Herren:

Arps, Behr, Bohner, Bonzel, Draf, Fassbinder, Höffkes, Jaspersen, Kälble, Langohr, Spätling, Stegmann, Wörsdörfer.

## 8.3      Publikationen

Als Poster wurden veröffentlicht:

- Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Arterioskleroseforschung Blaubeuren 2001

Untersuchung funktionell relevanter Genbereiche der endothelialen NO-Synthase (eNOS) bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit.

Imhof M, Soufi M, Sattler AM, Herzum M, Maisch B, Schaefer JR.

Klinik für Innere Medizin – Abteilung Kardiologie, AG Präventive Kardiologie, Klinikum der Philipps-Universität, D-35033 Marburg.



➤ Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin Wiesbaden 2002

Mutationscreening der endothelialen NO-Synthase (eNOS).

Soufi M, Imhof M, Sattler AM, Rafat M, Maisch B, Schäfer JR.

Klinik für Innere Medizin – Abteilung Kardiologie, AG Präventive Kardiologie,  
Klinikum der Philipps-Universität, D-35033 Marburg.

Auszeichnung mit dem Posterpreis im Schwerpunkt Angiologie.

#### 8.4 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Muhidien Soufi für die Betreuung und Überlassung des Themas der hier vorliegenden Doktorarbeit unter der Leitung von Prof. Dr. Jürgen Schaefer, sowie seinen Mitarbeitern Daniela Forge, Sabine Motzny, Ulrike Otte, Alexander Sattler, Rolf Hackler, und meinen Mitdoktoranden Katja Stober und Alexander Starke. Im Besonderen möchte ich mich bei meiner Mutter bedanken, die es geschafft hat aus meinen Geschwistern und mir intelligente, kritische und lebensfähige Menschen zu machen.

Weiterhin danke ich von ganzem Herzen meinem Ehemann Adnan Moalem, der mir immer wieder Mut zugesprochen und mich bestärkt hat.

Zum Schluss möchte ich mich noch bei allen anderen Verwandten, Freunden und Bekannten bedanken, die mir durch welche Hilfe auch immer Unterstützung waren.

---

## 8.5 Lebenslauf

### ➤ **Persönliche Daten**

Name: Margitta Melanie Imhof  
Geburtsdatum/-ort: 14.11.1976 in Freiburg im Breisgau  
Nationalität: deutsch  
Anschrift: Hövelstr.17, 36100 Petersberg  
Familienstand: ledig

### ➤ **Schulbildung:**

1983-1987 Grund-und Hauptschule Winden  
1987-1996 Geschwister-Scholl-Gymnasium Waldkirch  
1996 ABITUR

### ➤ **Militärische Ausbildung:**

1.07.-31.08.1996 Grundausbildung in Hildesheim  
1.09.-30.10.1996 Fahnenjunkerlehrgang in Hildesheim  
1.11.-31.12.1996 Sanitätsoffizierlehrgang in München  
1.01.-31.01.1997 Lebensrettende Maßnahmen in München  
1.02.-31.03.1997 Truppenpraktikum in Horb am Neckar

### ➤ **Hochschulbildung:**

1997-2002 Studium der Humanmedizin an der Philipps-Universität Marburg  
2002-2003 Praktisches Jahr am Klinikum Fulda  
1999 Ärztliche Vorprüfung  
2000 Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung  
2002 Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung  
2003 Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung

### ➤ **Klinische Tätigkeiten**

1999 Praxisfamulatur in der Inneren Medizin  
2000 Famulatur in der Inneren Medizin  
2001 Famulatur in der HNO-Heilkunde  
2002-2003.1 Praktisches Jahr am Klinikum Fulda  
Seit 06/2003 ÄiP in der Inneren Abteilung des BWK Ulm

8.6 Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre hiermit ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel „Mutationsscreening der endothelialen Stickoxydsynthase und deren Zusammenhang mit koronarer Herzkrankheit“ unter der Leitung von Herrn Professor Dr. med. Jürgen R. Schaefer mit Unterstützung durch Herrn Muhidien Soufi ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt habe. Bei der Abfassung der Arbeit habe ich keine anderen, als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel verwendet. Ich habe bisher an keinem in- und ausländischen medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

---

Ort, Datum

---

Margitta Moalem