

II. Medizinische Klinik und Poliklinik
Fakultät für Medizin
Klinikum rechts der Isar

**Funktionelle Charakterisierung der cGKI Substratproteine IRAG und ESP1/CRP2
im humanen Gastrointestinaltrakt**

Daniela Oesterle

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Dr. rer. nat. habil. G. Rechkemmer

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. rer. nat. M. Schemann
2. Univ.-Prof. Dr. med. R.M. Schmid

Die Dissertation wurde am 09.03.2006 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 06.11.2006 angenommen.

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
2	MATERIAL UND METHODEN	
2.1	Präparation von humanem gastrointestinalem Muskelgewebe und der Mukosa	11
2.2	Extraktion und Reinigung von Proteinen	11
2.2.1	Proteinextraktion aus Zelllinien und Gewebepreparaten	11
2.2.2	Proteinbestimmung	11
2.3	Western Blot Analyse	12
2.3.1	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	12
2.3.2	Western Blot	12
2.4	DNA-Klonierungen	14
2.4.1	Klonierungstechniken	14
2.4.2	Agarosegelelektrophorese	15
2.4.3	Transformation von kompetenten Bakterien	16
2.5	Polymerasekettenreaktion (PCR)	16
2.5.1	PCR zur Generierung von spezifischen DNA-Fragmenten	16
2.5.2	Anhängen 3'-überhängender Adenosine	17
2.5.3	PCR-Analyse von Transformandenklonen	18
2.6	RACE-PCR	18
2.6.1	5' RACE-PCR	18
2.6.2	3' RACE-PCR	19
2.7	Echt-Zeit-RT-PCR	20
2.8	Plasmidvervielfältigung	21
2.9	Isolierung von DNA und RNA	22
2.9.1	DNA-Isolierung	22
2.9.2	RNA-Isolierung	22
2.9.3	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	22
2.10	Expression und Reinigung von Proteinen	22
2.10.1	Bakterielle Proteinexpression	22
2.10.2	Proteinaufreinigung	23
2.11	Funktionelle Studien	23
2.11.1	Kultivierung von Zelllinien	23
2.11.2	Transiente Transfektion kultivierter Zelllinien	24
2.11.3	Luziferase-Assay	24
2.11.4	Kalzium Messungen	25
2.12	Fluoreszenzmikroskopie	26
3	ERGEBNISSE	
3.1	IRAG	27
3.1.1	Identifizierung von humanen IRAG 5' und 3' mRNA Varianten	27
3.1.2	5' IRAG mRNA Varianten kodieren für aminoternale Isoformen	33
3.1.3	Nachweis der 5' IRAG mRNA Varianten im humanen Gastrointestinaltrakt	35
3.1.4	3' IRAG mRNA Varianten kodieren für carboxyterminale Proteinisoformen	37

3.1.5	Nachweis der 3' IRAG mRNA Varianten im humanen Gastrointestinaltrakt.....	39
3.1.6	Organ- und gewebsspezifische IRAG mRNA Expression.....	43
3.1.7	Klonierung von IRAG mRNA Varianten in eukaryotische Expressionsplasmide.....	42
3.1.8	Immunologischer Nachweis von rekombinanten IRAG Varianten in CoSMC und Cos-7-Zellen.....	43
3.1.9	Immunologischer Nachweis von IRAG.....	44
3.1.10	Einfluss der C-terminalen IRAG Isoformen auf die Kalziumregulation.....	45
3.2	ESP1/CRP2	50
3.2.1	Organ- und gewebsspezifische ESP1/CRP2 mRNA Expression.....	50
3.2.2	5' und 3' RACE-PCR ESP1/CRP2.....	51
3.2.3	Bakterielle Proteinexpression von ESP1/CRP2.....	52
3.2.4	Herstellung eines spezifischen Antikörpers gegen humanes ESP1/CRP2.....	53
3.2.5	Akuter <i>knockdown</i> von ESP1/CRP2: Funktionelle Untersuchungen.....	54
3.2.6	Subzelluläre Lokalisation von ESP1/CRP2 in kultivierten glatten Muskelzellen des Kolons.....	55
4	DISKUSSION	57
5	ZUSAMMENFASSUNG	71
6	LITERATUR	73
7	GENORGANISATION IRAG	80
8	IRAG 5' mRNA Varianten	85
9	IRAG 3' mRNA Varianten	90
10	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	96

1 EINLEITUNG

cGMP-abhängige Proteinkinasen

Innerhalb der letzten Jahre wurde eine Reihe von biochemischen und funktionellen Daten über cGMP-abhängige Proteinkinasen (cGKs) gewonnen und es wurde gezeigt, dass die cGKs diverse physiologische Prozesse regulieren. Die cGKs gehören zur Familie der Serin/Threonin-Kinasen und kommen in einer Vielzahl von eukaryotischen Organismen vor. In Säugetieren gibt es zwei Gene für die cGK, *prkg1* und *prkg2*, die für die cGKI und cGKII kodieren. Der N-Terminus der cGKI wird von zwei alternativ gespleißten ersten Exons kodiert, die zur Expression von zwei cGKI Isoformen führen: Die Isoform cGKI α und die Isoform cGKI β . Die cGKI α , cGKI β und cGKII besitzen in ihrer Proteinstruktur drei funktionelle Domänen: Die N-terminale Domäne, die regulatorische Domäne und die katalytische Domäne. Der N-Terminus der homodimeren cGKs vermittelt die Dimerisierung über eine Leukin-Zipper Struktur und die zielgerichtete intrazelluläre Lokalisation (Hofmann *et al.*, 2000).

Die regulatorische Domäne hat zwei zyklische Guanosinmonophosphat (cGMP)-bindende Stellen, an denen cGMP bereits mit geringer Affinität gebunden wird. Die Synthese von cGMP erfolgt durch lösliche Guanylatzyklasen (sGCs), die durch Stickstoffmonoxid (NO) oder Kohlenstoffmonoxid (CO) aktiviert werden, und durch Rezeptorguanylatzyklasen (pGCs), die durch Bindung der natriuretischen Peptide ANP (atrial natriuretic peptide), BNP (brain-type natriuretic peptide) oder CNP (C-type natriuretic peptide) aktiviert werden. Die katalytische Domäne der cGMP-abhängigen Proteinkinasen enthält ATP- und peptidbindende Taschen. Die Bindung zweier cGMP-Moleküle führt zur Exposition des katalytischen Zentrums, das durch den N-Terminus der nichtstimulierten Kinasen verdeckt wird, und ermöglicht die Phosphorylierung von Serin/Threoninresten von Substratproteinen sowie einer N-terminalen Autophosphorylierungsstelle der cGK (Hofmann *et al.*, 2000). Die Autophosphorylierung erhöht die spontane Aktivität der cGKI und der cGKII und wird initiiert durch sehr geringe Konzentrationen des cGMP.

Diese Kinasen werden in glatten Muskelzellen, Blutplättchen, dem Cerebellum, Hippocampus, in Ganglien, in der neuromuskulären Endplatte und in der Niere sehr hoch exprimiert. Geringere Konzentrationen sind im Herzmuskel, im Gefäßendothelium, in Granulozyten, Chondrozyten und Osteoklasten vorhanden. Die Expression der cGKI α und der cGKI β ist sehr hoch in glatten Muskelzellen des Eileiters, von Blutgefäßen, des Intestinums und der Trachea. Neurone des Hippocampus und olfaktorische Nervenzellen exprimieren vorwiegend die cGKI β , die cGKI α wird dagegen stärker in der Lunge, im Herz und im Cerebellum exprimiert. Die cGKII wird in diversen Gehirnregionen, in der intestinalen Mukosa, in der Niere, in der Lunge und in Chondrozyten exprimiert (Hofmann, 2005).

Unterschiedliche funktionelle Prozesse werden durch die cGMP-abhängigen Proteinkinasen reguliert, womit sie eine wichtige Rolle in der Physiologie von Säugetieren einnehmen: Die Funktion der cGKII wurde an cGKII-defizienten Mäusen untersucht. Hierbei zeigte sich, dass diese Kinase die intestinale Sekretion, das Knochenwachstum, die Reninsekretion und den zirkadianen Rhythmus moduliert. Die intestinale Chlorionen/Wasser- Sekretion wird durch Substanzen erhöht, die den cAMP-, so Cholera Toxin oder den cGMP-, so *E.coli* Enterotoxine, Level erhöhen. Die Mukosa von cGKII-defizienten Mäusen reagiert auf cAMP-Analoga normal, wohingegen die STa (*Escherichia coli* heat-stable enterotoxin)-induzierte Anionensekretion inhibiert ist. Dieser Prozess wird über die cGKII-abhängige Phosphorylierung des cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) vermittelt (Pfeifer *et al.*, 1996; Vaandrager *et al.*, 1998). Das Knochenwachstum von cGKII *knockout* Mäusen ist stark reduziert, so dass acht Wochen alte Mäuse verglichen mit Wildtyp Mäusen einen zwerghaften Phänotyp aufweisen (Pfeifer *et al.*, 1996). In der Niere wird die cGKII unter anderem in juxtaglomerulären Zellen exprimiert. Stimulation der endogenen cGK oder adenovirale Überexpression der cGKI und cGKII in diesen Zellen führt zu einer verminderten Reninsekretion. Ein physiologischer Einfluss auf die Reninsekretion – möglicherweise durch eine veränderte Exozytose von Renin (Schrickler *et al.*, 1993) – wird jedoch für die cGKII vermutet, da ausschließlich diese Isoform mit Renin in juxtaglomerulären Zellen der Ratte kolokalisiert vorliegt (Gambaryan *et al.*, 1998). Diese Vermutung wurde durch Versuche an cGKII-defizienten Mäusen bestätigt: In diesen Tieren war die Inhibition der Reninsekretion vollständig aufgehoben (Wagner *et al.*, 1998). Eine weitere Rolle spielt die cGKII in der Regulation der zirkadianen Uhr, die im Suprachiasmatischen Nukleus (SCN) lokalisiert ist und tagesrhythmische Schwankungen von biologischen Funktionen reguliert. Studien an cGKII *knockout* Mäusen zeigten, dass die cGKII Einfluss auf den Phasenwechsel der zirkadianen Uhr hat, indem sie die Expression der Gene *mPer1* und *mPer2* beeinflusst (Oster *et al.*, 2003).

Die Funktion der cGKI ist die Regulation von *downstream* Proteinen, die unter anderem die Blutplättchenaggregation, die Proliferation und die Genexpression beeinflussen. Die Blutplättchenaggregation wird inhibiert durch Prostacycline und NO, die von endothelialen Zellen freigesetzt werden und die Konzentration von cGMP in Blutplättchen erhöhen. Die cGKI aktiviert dann zelluläre Prozesse, die zur Inhibierung der Blutplättchenaggregation führen. Die Aggregation wird in cGKI-defizienten Blutplättchen weder durch NO noch durch cGMP inhibiert. Höchstwahrscheinlich vermittelt die cGKI β Isoform diesen Prozess, da sie in Blutplättchen im Gegensatz zur cGKI α sehr hoch exprimiert wird (Massberg *et al.*, 1999). Ebenso wurde eine cGMP-abhängige Inhibierung der Proliferation, Migration und Dedifferenzierung glatter Muskelzellen beschrieben (Hofmann *et al.*, 2000; Pilz *et al.*, 2003). Ein sowohl stimulatorischer als auch inhibitorischer Einfluss auf die Genexpression durch cGMP konnte ebenfalls nachgewiesen werden: Die Regulation der Genexpression findet auf transkriptionellem und posttranskriptionellem Niveau statt (Pilz *et al.*, 2003). Es wird

angenommen, dass neben der direkten Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, die Genexpression durch die cGKI indirekt über die Inhibierung oder Aktivierung des mitogen-activated protein kinase (MAPK)-Signalwegs moduliert wird (Suhasini *et al.*, 1998). Welche cGKI Isoform jedoch bei diesen Prozessen eine funktionelle Rolle spielt, ist nicht geklärt. Eine weitere Funktion der cGKI wurde für das Nervensystem beschrieben: Die cGKI hat Einfluss auf die long-term potentiation (LTP) in Zellen des Hippocampus und die long-term depression (LTD) in Purkinje Zellen des Cerebellums. cGKI *knockout* Tiere haben eine reduzierte LTP (Kleppisch *et al.*, 1999) und LTD (Feil *et al.*, 2003). Obwohl die Stärke der LTP und LTD Indikatoren für das Gedächtnis und das Lernen sind, haben diese Tiere hier keine Defekte (Kleppisch *et al.*, 1999; Feil *et al.*, 2003). Die biologische Signifikanz dieses Ergebnisses und die cGKI Isoform, die diese Mechanismen reguliert, sind nicht geklärt.

Eine weitere wichtige Funktion der cGKI ist die Relaxation glatter Muskelzellen. In Blutgefäßen regulieren die Muskelzellen den Gefäßtonus und spielen eine zentrale Rolle in der Pathogenese von Artherosklerose und anderen Gefäßkrankheiten (Hofmann *et al.*, 2000). cGKI-defiziente Mäuse (beide Isoformen α und β sind deletiert) haben Bluthochdruck im Alter von 4-6 Wochen. Kontrahierte glatte Muskelstreifen dieser Tiere werden zudem nicht durch das Relaxanz NO relaxiert (Pfeifer *et al.*, 1998). Im Gastrointestinaltrakt (GIT) dieser Tiere konnten schwere Motilitätsstörungen beobachtet werden: eine Pylorusstenose mit einhergehender Magenvergrößerung und gestörter Peristaltik und eine verzögerte Magen/Darmpassage sind phänotypische Merkmale dieser Tiere. Die Lebensspanne von cGKI-defizienten Mäusen ist mit 4-6 Wochen stark verringert (Pfeifer *et al.*, 1998).

Reguliert wird der Tonus glatter Muskelzellen durch eine steigende und sinkende intrazelluläre Konzentration von Kalzium (Ca^{2+}). Eine Kontraktion von glatten Muskelzellen wird initiiert durch eine rezeptorvermittelte Synthese von Inositol-1,4,5-Triphosphat (IP_3), das den Kalziumeinstrom aus intrazellulären Speichern wie dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR) über den Inositol-1,4,5-Triphosphat Rezeptor (IP_3R) aktiviert (Berridge *et al.*, 2003). Der Anstieg des intrazellulären Kalziumspiegels führt desweiteren zum Einstrom von extrazellulärem Kalzium über spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle und resultierender Kontraktion der Zelle durch die Aktivierung der kalziumsensitiven Ca^{2+} /calmodulin-dependent myosin light chain kinase (MLCK). Die aktivierte MLCK phosphoryliert die myosin light chain (MLC) und letztlich wird das Endprotein dieser Signalkaskade Myosin aktiviert (Somlyo *et al.*, 2000). Myosin ist Hauptbestandteil der dicken Filamente und besitzt eine ATPase Wirkung. Die ATPase Aktivität liefert in mehreren Teilschritten freie Energie, welche zur reversiblen Assoziation von Myosin und Aktin, dem Hauptprotein der dünnen Filamente, und daher zur Kontraktion der Muskelzelle führt (Stryer, 1999).

Zur Relaxation kontrahierter gastrointestinaler Muskelzellen führen die inhibitorischen Neurotransmitter NO und CO: Im Gastrointestinaltrakt induzieren NO und CO die Aktivierung der löslichen Guanylatzyklen und somit steigende cGMP Konzentrationen. Im humanen Kolon ist NO der bedeutsamere inhibitorische Neurotransmitter (Porter *et al.*, 1997;

Beranano *et al.*, 2001). Die cGKI-abhängigen Mechanismen zur Relaxation glatter Muskelzellen modulieren sowohl die Kalziumsensitivität als auch die Kalziumkonzentration in der Zelle. So führt beispielsweise die cGKI zu einer Inhibierung des kalziumsensitiven MLCK-Signalweges: Die cGKI-induzierte Aktivierung der Myosin-bindenden Untereinheit, eine regulatorische Einheit in der Myosin Phosphatase, führt zur Inaktivierung der MLC und Inhibierung der Myosin ATPase Aktivität. Die Isoform, die diesen Prozess reguliert ist die cGKI α (Surks *et al.*, 1999). Kürzlich wurde gezeigt, dass die cGKI möglicherweise das GTP-bindende Protein RhoA inhibiert, wodurch die Aktivität der Myosin Phosphatase ebenfalls zunimmt (Ellerbroek *et al.*, 2003). Die cGKI-induzierte Reduktion von intrazellulärem Kalzium kann über drei Hauptmechanismen reguliert werden: 1.) Die Inhibierung der IP₃-Synthese, 2.) die Regulation von Kaliumkanälen und 3.) die Inhibition des IP₃-induzierten Kalziumausstroms aus intrazellulären Speichern: 1.) Die cGKI reduziert die Synthese von IP₃ entweder über den RGS-2 Signaltransduktionsweg (Tang *et al.*, 2003; Sun *et al.*, 2005) oder über die Inaktivierung der Phospholipase C (Xia *et al.*, 2001). Man nimmt an, dass die cGKI α Isoform diese Prozesse vermittelt (Hofmann, 2005). 2.) Die direkte Aktivierung des Ca²⁺-aktivierten maxi-K⁺-Kanals (BK_{ca}) durch die cGKI induziert die Öffnung dieses Kanals bei konstanter intrazellulärer Kalziumkonzentration und führt zur Hyperpolarisierung der Zellmembran, so dass Ca²⁺-Kanäle geschlossen werden und es zum reduzierten Ca²⁺-Einstrom aus dem extrazellulären Raum kommt (Alioua *et al.*, 1998; Fukao *et al.*, 1999). Es ist nicht bekannt, welche cGKI Isoform zur BK_{ca} Aktivierung führt. 3.) Neben den oben beschriebenen Mechanismen konnte kürzlich von der Arbeitsgruppe um Dr. Schlossmann ein weiterer cGKI-abhängiger Signaltransduktionsweg identifiziert werden. Ein Makromolekularkomplex bestehend aus dem IP₃R, der cGKI β und dem in dieser Arbeit neu identifizierten IP₃Rezeptor-assoziiertem cGMP-abhängigen Kinase Substrat (IRAG) führt zur Inhibition des IP₃R-induzierten Kalziumanstiegs in COS-7-Zellen (Schlossmann *et al.*, 2000). In einer jüngst erschienenen Publikation konnte gezeigt werden, dass die Herabregulation von IRAG mRNA zum Verlust der cGMP-abhängigen Inhibition eines IP₃R-induzierten Kalziumanstiegs in glatten Muskelzellen des Kolons führt (Fritsch *et al.*, 2004). IRAG ist demnach ein essentieller Bestandteil der cGMP-induzierten Relaxation glatter Muskelzellen des Kolons und sollte in der hier vorliegenden Arbeit untersucht werden.

IRAG

Erstmals beschrieben wurde IRAG durch die Arbeitsgruppe um John Shaugnessy (1999) als Produkt des *Mrvi1* (*MRV integration site 1*) Gens. In dieser Arbeit wurde nach Genen gesucht, die durch die Integration des Virus MRV (murine AIDS-related virus) aktiviert oder inaktiviert werden und damit zur Entwicklung einer myeloischen Leukämie in BXH2 Mäusen führen. In zwei von 21 untersuchten Mäusen, die eine myeloische Leukämie entwickelt hatten, konnte die Integration von MRV in das, auf Chromosom 7 lokalisierten, *Mrvi1* Gens

nachgewiesen werden. Die Charakterisierung des 5' Bereichs dieses murinen Gens führte zur Identifizierung sechs verschiedener mRNA Transkripte: Zwei alternativ gespleißte erste Exons kodieren für die Proteine Mrvi1a und Mrvi1b. Fünf verschiedene 5' mRNA Varianten wurden von Mrvi1b identifiziert. Alle beginnen mit dem ersten Exon 1a, gefolgt vom alternativ inserierten bzw. deletierten Exon 1b. Zusätzlich generieren unterschiedliche Spleißdonor- und akzeptorstellen ein verkürztes Exon 1a und ein verkürztes Exon 2. Die Translation der fünf mRNA Transkripte startet vom CTG Translationsstartkodon in Exon 2, so dass sich die Varianten in ihrer 5' untranslatierten Region (UTR), nicht aber in der Proteinsequenz unterscheiden. Die kodierende mRNA Sequenz und die 3' UTR sind bei allen Varianten identisch. Die heterologe Expression von *Mrvi1b* führt zu einem Protein mit einem Molekulargewicht von 115 kDa. Der Mrvi1a mRNA fehlt das Exon 1a. Die 5' mRNA dieser Variante beginnt mit Exon 1b und führt *in vitro* zur Translation, ausgehend vom ATG Translationsstartkodon in Exon 1b, zu einem 140 kDa großen Protein. Die Aminosäuresequenz der Proteine Mrvi1a und Mrvi1b sind identisch ab dem durch das CTG in Exon 2 kodierten Methionin, das zur Translation von Mrvi1b führt. Somit besitzt Mrvi1a eine 84 Aminosäuren (AS) längere Proteinsequenz verglichen mit Mrvi1b. Rekombinantes Mrvi1a führt *in vitro* zur Translation eines weiteren, 49 AS verkürzten N-terminalen Proteins mit einem Molekulargewicht von 123 kDa. Diese Translation startet von einem zweiten ATG Initiationskodon in Exon 1b 3' abwärts des ersten ATG Kodons (Shaugnessy *et al.*, 1999). In wenigen Fällen beginnt die Translation nicht vom ersten ATG, sondern von weiter 3' gelegenen ATG Kodons, insofern diese von konservierten Konsensussequenzen flankiert sind. Die 40S ribosomale Untereinheit kann in diesem Fall das erste Startkodon überlesen und es kommt zur Translation eines verkürzten Proteins („leaky scanning“; Xiong *et al.*, 2001).

Eine 83%-ige Homologie besteht zwischen dem murinem und dem humanem Protein. Das humane *Mrvi1* Gen ist auf Chromosom 11p15 lokalisiert und ist zu 42% homolog zu Jaw1 (lymphoid-restricted membrane protein 1), einem in die Membran des endoplasmatischen Retikulums verankertem Protein, dessen Expression während lymphoider Zelldifferenzierung herunterreguliert wird (Shaugnessy *et al.*, 1999). Da die Integration des Retrovirus von *Mrvi1* zur Entwicklung einer myeloischen Leukämie in Mäusen führt, wird vermutet, dass *Mrvi1* ein Onkogen ist. Dies konnte jedoch bis heute nicht nachgewiesen werden.

Ein Jahr nach der Veröffentlichung von *Mrvi1* konnte die Arbeitsgruppe um Dr. Schlossmann in mikrosomalen Membranen der Trachea des Rinds ein neues Substrat der cGKI identifizieren: Im Komplex mit der cGKI und dem IP₃Rezeptor wurde ein 125 kDa großes Protein isoliert, das sich nach Analyse der Proteinsequenz als das bovine Homolog vom *Mrvi1* Gen herausstellte. Da es ein Substrat der cGKIβ ist, wurde es IP₃Rezeptor-assoziiertes cGMP-abhängiges Kinase Substrat (IRAG) genannt. Es wurden vier unterschiedliche aminoterminalen Proteinsequenzen von bovinem IRAG identifiziert: IRAGa, IRAGb, IRAGΔa und IRAGΔb. Die Translation von IRAGΔa und IRAGΔb startet am

gemeinsamen CTG Translationsstartkodon in Exon 2. Diese Proteine sind in ihrer Struktur identisch und entsprechen dem murinem Mrvi1b. Die Proteine IRAGa und IRAGb werden ausgehend von zwei verschiedenen ATG Translationsstartkodons in Exon 1b translatiert und entsprechen damit den murinen Mrvi1a Proteinvarianten. IRAGb ist um 52 Aminosäuren kürzer als IRAGa. IRAGa, IRAGb, IRAG Δ a und IRAG Δ b sind ab dem Methionin kodiert durch das CTG in Exon 2, das das Translationsstartkodon für IRAG Δ a und IRAG Δ b darstellt, in ihrer Aminosäuresequenz identisch. Die heterologe Expression von IRAGa und IRAGb in COS-7-Zellen führt zur Translation eines 130 kDa großen IRAGa und eines 125 kDa großen IRAGb Proteins. Natives IRAG Protein aus bovinen mikrosomalen Membranen der Aorta und der Trachea hat ein Molekulargewicht von etwa 125 kDa (Schlossmann *et al.*, 2000). Die molekulare Größe von IRAG Δ a und IRAG Δ b ist nicht bekannt.

Bovines IRAG besitzt hochkonservierte Domänen in seiner Aminosäuresequenz: eine carboxyterminale Transmembrandomäne (TMD), eine zentrale coiled coil Domäne, mehrere Phosphorylierungsstellen, Glykosylierungsstellen und eine ATP-bindende Domäne. Die lange Isoform von IRAGa besitzt in seinem N-terminalen Abschnitt eine weitere TMD (Schlossmann *et al.*, 2000). Die coiled coil Domäne vermittelt die Interaktion mit dem IP₃R (Geiselhöringer *et al.*, 2004). Eine perinukleäre Lokalisation von IRAGa und IRAGb konnte nach Überexpression in COS-7-Zellen gezeigt werden. Diese Lokalisation spricht für eine Verankerung von IRAG in der Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER) (Schlossmann *et al.*, 2000). Funktionell spielt IRAG, wie oben beschrieben, eine wesentliche Rolle bei der cGMP-induzierten Inhibierung des Kalziumeinstroms aus intrazellulären Speichern in die Zelle: Die Überexpression von IRAGa und der cGKI β in COS-7-Zellen führte zur cGMP-abhängigen Inhibierung eines hormoninduzierten Kalziumanstiegs in der Zelle (Schlossmann *et al.*, 2000). Darüberhinaus führte in humanen glatten Muskelzellen des Kolons die Herabregulation der IRAG Expression durch Antisenseoligonukleotide zur Reduktion des inhibitorischen Effekts von cGMP auf den IP₃R-abhängigen Kalziumeinstrom aus intrazellulären Speichern ins Zytoplasma (Fritsch *et al.*, 2004).

Eine fehlende Relaxation glatter gastrointestinaler Muskelzellen von Mäusen konnte von NO und cGMP auf hormoninduzierte Kalziumtransienten mit einem trunkierten IRAG Protein gezeigt werden. Die Tiere exprimieren durch eine Deletion von Exon 12 des *IRAG* Gens ein mutiertes IRAG Δ 12/ Δ 12 Protein, das nicht mehr mit dem IP₃Rezeptor interagiert. Diese Mäuse haben einen dilatierten Gastrointestinaltrakt, eine gestörte gastrointestinale Motilität und eine verminderte Relaxation gastrointestinaler Muskelstreifen. Im Gegensatz zu den cGKI^{-/-} Mäusen haben die IRAG Δ 12/ Δ 12 Mäuse einen normalen Blutdruck. IRAG spielt demnach keine physiologische Rolle in der Modulation des Tonus vaskulärer glatter Muskelzellen (Geiselhöringer *et al.*, 2004).

Die cGKI Isoform, die mit IRAG interagiert und es phosphoryliert, konnte bis heute nicht eindeutig identifiziert werden. Es gibt jedoch zahlreiche Hinweise, dass die cGKI β die IRAG-interagierende Isoform ist: Im Zwei-Hybrid-System und nach Koimmunopräzipitation wurde

eine Interaktion lediglich mit der cGKI β nachgewiesen (Schlossmann *et al.*, 2000). Die Mutation von IRAG am Serin⁶⁷⁷, der Phosphorylierungsstelle für die cGKI β , führte zum Verlust der cGMP-induzierten Inhibierung des Kalziumausstroms aus intrazellulären Speichern (Ammendola *et al.*, 2001). Zwei weitere Ergebnisse demonstrieren die spezifische Interaktion von IRAG mit der β -Isoform der cGKI: IRAG und die cGKI β sind nahezu ubiquitär in der glatten Muskulatur kolokalisiert und die cGKI β , nicht aber die cGKI α , wird *in vitro* zum - im endoplasmatischen Retikulum membranverankerten - IRAG in COS-7-Zellen dirigiert. Auch in einer kürzlich erschienenen Publikation wurde die cGKI β , nicht die cGKI α , als IRAG-interagierende Isoform beschrieben: in einem *in vivo* Proteininteraktionsversuch interagiert IRAG mit der cGKI β und nicht mit der cGKI α . Spezifische Mutationen in der cGKI β , als auch im IRAG Protein führten zu einem Verlust der Interaktion (Casteel *et al.*, 2005). Andererseits konnte keine Expression von der cGKI β im Thalamus und einigen Zellen des myenterischen Plexus nachgewiesen werden. Hier könnte IRAG ein Substrat der cAK, der cGKI α oder der cGKII darstellen (Geiselhöringer *et al.*, 2004).

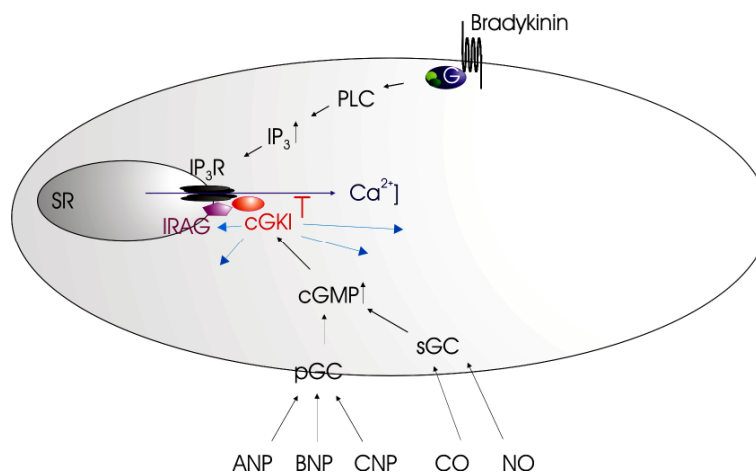


Abb. 1: Der cGMP/cGKI-Signaltransduktionsweg in glatten Muskelzellen. Ein bradykinininduzierter Anstieg von IP₃ führt nach Bindung an den IP₃Rezeptor (IP₃R) zur Konformationsänderung des IP₃R und einhergehendem Ausstrom von im sarkoplasmatischen Retikulum (SR) gespeichertem Kalzium (Ca²⁺) in die Zelle. Steigende Kalziumkonzentrationen führen zur Kontraktion der Zelle. Zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP) wird durch die membrangebundene Guanylatzyklase (pGC) und durch die lösliche Guanylatzyklase (sGC) synthetisiert. Membrangebundene Guanylatzyklasen werden durch ANP, BNP und CNP, lösliche Guanylatzyklasen durch CO und NO aktiviert. In gastrointestinalen Muskelzellen ist NO der bedeutendste inhibitorische Neurotransmitter. Der Anstieg von cGMP aktiviert die cGMP-abhängige Proteinkinase I (cGKI), deren Substratprotein unter anderem IRAG (IP₃Rezeptor-assoziiertes cGMP-abhängiges Kinase Substrat) ist. Die Aktivierung von IRAG und die Inhibierung des IP₃R führt zur Hemmung des hormoninduzierten, IP₃-abhängigen Kalziumanstiegs in der Zelle. Abkürzungen: PLC: Phospholipase C; ANP: atrial natriuretic peptide; BNP: brain-type natriuretic peptide; CNP: C-type natriuretic peptide; CO: Kohlenstoffmonoxid; NO: Stickstoffmonoxid.

In Abbildung 1 ist die cGMP-abhängige Inhibierung eines bradykinininduzierten Kalziumanstiegs in glatten Muskelzellen über den cGKI/IP₃R/IRAG Komplex dargestellt: Die Stimulation des Bradykininrezeptors durch Bindung des Hormons Bradykinin führt zur Aktivierung eines an den Rezeptor intrazellulär gekoppelten G-Proteins und somit zur Signalübertragung. In der bradykinininduzierten Signalkaskade ist die Phospholipase C (PLC)

das Effektorprotein des aktivierten G-Proteins. Die PLC spaltet Phosphatidylinositol-4, 5-Bisphosphat (PIP₂) in Diacylglycerin und Inositol-1,4,5-Triphosphat (IP₃). Der Anstieg von IP₃ stimuliert den IP₃R, der in den Membranen des sarkoplasmatischen Retikulum in glatten Muskelzellen verankert ist. Eine IP₃-induzierte Konformationsänderung des IP₃R führt zum Einstrom von SR-gespeichertem Kalzium in die Zelle, was letztlich zur Kontraktion führt. Der cGMP/cGKI-Signaltransduktionsweg stellt mit der Aktivierung des IP₃R und IRAG einen wesentlichen Gegenspieler des IP₃-induzierten Ca²⁺-Anstiegs dar und spielt daher eine essentielle Rolle bei der Relaxation glatter Muskelzellen.

ESP1/CRP2

Das zweite Substratprotein der cGKI, das in dieser Arbeit untersucht wurde, wird kodiert durch das Gen *ESP1/CRP2* (*estradiol-stimulated protein 1/cysteine-rich protein 2*). 1996 wurde *ESP1/CRP2* identifiziert und näher charakterisiert: Die Gruppe um Karim detektierte die genomische Lokalisation des Gens auf Chromosom 14q32.3 mittels *fluorescence in situ hybridisation* (FISH). Die cDNA umspannt eine 1171 Basen lange Region, davon stellen die Basen 1-26 die 5' untranslatierte Region (UTR), die Basen 27-624 die kodierende Region und die Basen 625 bis 521 die 3' UTR dar. Translatiert wird ein 23 kDa großes Protein mit dem Namen ESP1/CRP2 (Karim *et al.*, 1996).

Da ESP1/CRP2 zwei LIM-Domänen gefolgt von zwei glyzinreichen Aminosäurewiederholungen besitzt, wird dieses Protein in eine Gruppe verwandter LIM-Proteine eingegliedert, von denen bisher diverse Funktionen bekannt sind: So regulieren sie beispielsweise die Genexpression, die Zytoarchitektur, die Zelladhäsion, die Zellmotilität und die Signaltransduktion (Weiskirchen *et al.*, 2003).

Die LIM-Domäne ist ein hoch konserviertes Motiv, das erstmals in den Proteinen Lin-11 von *Caenorhabditis elegans* (Freyd *et al.*, 1990), Isl-1 der Ratte (Karlsson *et al.*, 1990) und Mec-3 von *Caenorhabditis elegans* (Way *et al.*, 1988) identifiziert wurde. LIM-Domänen bestehen aus zwei Zinkfingerstrukturen, die Protein-Proteininteraktionen vermitteln. Die LIM-Konsensus Sequenz wurde definiert als CX₂-CX₁₇-HX₂-CX₂-CX₂-CX₁₇-CHX₂ (C=Cystein, H=Histidin, X=beliebige Aminosäure) (Sadler *et al.*, 1992). Sequenzvergleiche der bekannten LIM-Proteine führten zur Einteilung dieser Proteine in drei Gruppen (Dawid *et al.*, 1998): 1.) LIM-Homeodomänen Proteine, die zwei LIM-Domänen an ihrem N-Terminus besitzen. 2.) Proteine, die LIM-Domänen besitzen, gefolgt von zwei glyzinreichen Konsensussequenzen und 3.) Proteine mit unterschiedlicher Anzahl C-terminaler LIM-Domänen. Zu der zweiten Gruppe, zu der auch ESP1/CRP2 gerechnet wird, gehören CRP1, CRP2/SmLIM (CRP2/ smooth muscle LIM), CRP3/MLP (CRP3/ muscle LIM protein) und TLP (thymus LIM protein), die in der Maus, im Menschen, in der Ratte und in diversen anderen Spezies gefunden wurden und eine sehr hohe Homologie innerhalb der verschiedenen Spezies aufweisen. Gemeinsame Bindungspartner dieser Proteine sind α -Aktin und Zyxin,

wenn sie in adhärennten Fibroblasten überexprimiert werden (Arber *et al.*, 1996; Pomiès *et al.*, 1997; Schmeichel *et al.*, 1998). Desweiteren haben sie aber auch spezifische Proteinbindungspartner, so zum Beispiel interagiert CRP3/MLP mit den Transkriptionsfaktoren MyoD, Myogenin und MRF4, wodurch deren Bindungsaffinität zur DNA erhöht wird (Kong *et al.*, 1997). CRP2/SmLIM interagiert spezifisch mit den Transkriptionsfaktoren SRF und GATA. Es wird spekuliert, dass CRP2/SmLIM ein Modulator zytokinregulierter Signalwege oder an der Transkription von Genen beteiligt ist (Weiskirchen *et al.*, 2003). In der subzellulären Lokalisation weisen CRP1, CRP2/SmLIM und CRP3/MLP eine unterschiedliche Verteilung auf: Diese Proteine akkumulieren entlang von Aktinfilamenten im Zytosol und im Zellkern. Die nukleäre Lokalisation wird durch ein konserviertes nukleäres Lokalisationsignal (NLS) mit der Konsensussequenz KKYGPK vermittelt (Arber *et al.*, 1996). TLP fehlt diese Sequenz, so dass es ausschließlich zytoplasmatisch vorhanden ist (Kirchner *et al.*, 2001).

Humanes ESP1/CRP2, CRP2 der Ratte (entspricht nicht CRP2/SmLIM) und CRIP (cysteine-rich intestinal protein) der Ratte wurden ebenfalls in diese Gruppe eingeteilt. CRIP besitzt nur eine LIM-Domäne und es könnte sein, dass es bei der Differenzierung von murinen intestinalen Epithelien eine Rolle spielt (Birkenmeier *et al.*, 1986). CRP2 der Ratte wurde als neues Substrat der cGKI mit Hilfe des Hefe Zwei-Hybrid-Systems aus einer cDNA-Bibliothek des Dünndarms mit der cGKI β als Köderprotein identifiziert. Es wurde gezeigt, dass dieses Protein *in vitro* von der cGKI β phosphoryliert wird. Außerdem wurde immunhistochemisch die Kolokalisation der beiden Proteine in der inneren Zirkulärmuskelschicht, der Muscularis mucosae und in Neuronen des myenterischen und submukösen Plexus nachgewiesen. CRP2 der Ratte stellt daher ein weiteres Substrat der cGKI β in Neuronen und in glatten Muskelzellen des Dünndarms dar (Huber *et al.*, 2000). ESP1/CRP2 ist zu 93% homolog zu CRP2 der Ratte. Die funktionelle Rolle von ESP1/CRP2 ist bisher unklar.

Weitere Substrate der cGMP-abhängigen Proteinkinase I

Neben IRAG und ESP1/CRP2 sind weitere Substratproteine der cGKI bekannt, die an der Relaxation und anderen physiologischen Prozessen glatter Muskelzellen beteiligt sind. Der IP₃R, die Myosin-bindende Untereinheit, RhoA und BK_{Ca} wurden oben bereits kurz erläutert und spielen eine Rolle bei der Relaxation glatter Muskelzellen (Murthy *et al.*, 2003; Sausbier *et al.*, 2000; Schlossmann *et al.*, 2005). Ebenso an der Relaxation beteiligt sind die cGKI Substratproteine Phospholamban (PLB), RGS-2 (regulator of G-protein signaling-2) und möglicherweise TRPC3 (transient receptor potential channel 3):

Phospholamban konnte kürzlich im Komplex mit dem IP₃R, IRAG und der cGKI in bovinen glatten Muskelzellmembranen der Trachea identifiziert werden. PLB könnte möglicherweise mit der Modulation der IP₃Rezeptoraktivität und einer damit resultierenden

Abnahme des Kalziumausstroms assoziiert sein (Koller *et al.*, 2003). Ebenso mit der cGKI und dem IP₃Rezeptor koimmunopräzipitiert wurden aus bovinen glatten Muskelzellen Calponin und α -Aktin, zwei Zytoskelettproteine. Eine denkbare Funktion dieser Interaktion ist die Verankerung IP₃-sensitiver Speicher mit der Zellmembran (Koller *et al.*, 2003).

RGS-2, ein Substrat der cGKI α in vaskulären Muskelzellen, hat nach Phosphorylierung durch die cGKI eine erhöhte GTPase Aktivität für G_q-Protein-gekoppelte Rezeptoren, was zur Inhibierung dieser Rezeptoren führt (Tang *et al.*, 2003).

TRPC3 induziert eventuell nach Phosphorylierung durch die cGKI eine Abnahme der intrazellulären Kalziumkonzentration (Kwan *et al.*, 2004).

Weitere Substrate der cGKI modulieren die Zytoarchitektur, die intrazelluläre Lokalisation der cGKI und die Genexpression, so zum Beispiel VASP (vasodilator-stimulated phosphoprotein), TroponinT und TFII-I (transcription factor II-I):

VASP ist sowohl Substrat für die cAMP-abhängige Proteinkinase (cAK) als auch für die cGKI. VASP ist *in vitro* involviert in einen NO-abhängigen Anstieg des Zytoskelettproteins F-Aktin und reguliert die Aktinpolymerisation *in vivo*. Darüber hinaus wird die transkriptionelle Regulation von Genen über Serum-responsive Elemente durch Phosphorylierung von VASP inhibiert (Zhuang *et al.*, 2004; André *et al.*, 2005). TroponinT gehört zu einer Familie von Proteinen, die muskelspezifisch in myofibrillären Strukturen eine Rolle spielen. Außerdem sind sie an der Ca²⁺-abhängigen Regulation der Kontraktion in einigen Muskelzellen beteiligt. TroponinT konnte als Substrat der α -Isoform der cGKI identifiziert werden und dient der Kinase möglicherweise als Ankerprotein (Yuasa *et al.*, 1999).

TFII-I wurde als weiteres Substrat der cGKI identifiziert, interagiert mit verschiedenen Transkriptionsfaktoren und reguliert diverse basale und induzierbare Promotoren (Casteel *et al.*, 2002).

Die cGKI vermittelt daher eine Reihe von intrazellulären Prozessen in verschiedenen Geweben. Im Gastrointestinaltrakt ist die cGKI essentiell für die Regulation der Motilität des Darms, vor allem vermittelt durch die Inhibierung des IP₃-induzierten Kalziumausstroms aus dem SR in die Zelle.

Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die funktionelle Charakterisierung der cGKI Substratproteine IRAG und ESP1/CRP2 im humanen Gastrointestinaltrakt.

Spezifische Ziele waren: 1.) Die Klonierung von humanem *IRAG* und *ESP1/CRP2* und die heterologe Expression der beiden Proteine. 2.) Bestimmung des Genexpressionsprofils von *IRAG* und *ESP1/CRP2* im humanen GIT. 3.) Die Identifizierung differentiell exprimierter mRNA und Proteinvarianten von *IRAG* und *ESP1/CRP2* im humanen GIT und 4. die funktionelle Charakterisierung dieser Varianten.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Präparation von humanem gastrointestinalem Muskelgewebe und der Mukosa

Resektate aus dem humanen Gastrointestinaltrakt wurden für die Weiterverarbeitung für die RNA Isolierung und Proteinextraktion präpariert. Die Mukosa wurde sorgfältig vom Muskelgewebe abgetrennt. Mukosa sowie Muskelgewebe wurden in für die Weiterverarbeitung nötigen Puffern aufgenommen. Mit Hilfe eines elektrischen Homogenisators (Polytron PT3100, Kinematika) wurde 50-100 mg Präparat in dem entsprechenden Puffer mehrere Male für maximal 30 sek, 26.000 rpm vollständig zerkleinert. Zwischen den Homogenisierungsschritten wurden die Proben auf Eis gestellt, um eine Degradation der RNA oder Denaturierung der Proteine durch zu hohe Wärmeentwicklung zu verhindern.

Die Forschungsversuche an den entnommenen humanen Geweben wurden von der Ethikkommission der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München genehmigt.

2.2 Extraktion und Reinigung von Proteinen

2.2.1 Proteinextraktion aus Zelllinien und Gewebepräparaten

Zum immunologischen Nachweis von Proteinen wurden Ganzzellextrakte aus eukaryotischen Zelllinien und humanem Gastrointestinalgewebe gewonnen. Die kultivierten Zelllinien wurden nach Entfernung des Mediums zunächst mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Lyse der Zellen durch Zugabe von IP-Puffer (50 mM HEPES, pH 7,9, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 8,0, 0,5% NP-40, 10% Glycerin, 1 mM DTT, 5 mM PMSF) und darauffolgender Homogenisierung. Nach Inkubation auf Eis für 15 min wurden die Proben für 10 min bei 4°C und 14.000 rpm zentrifugiert, der Überstand aliquotiert und nach Schockgefrieren in flüssigen Stickstoff bei -80°C aufbewahrt.

2.2.2 Proteinbestimmung

Die Proteinkonzentration wurde nach der Bradfordmethode (Bradford, 1976) mit Rinderserumalbumin als Standard gemessen. Durch Proteinbindung an Coomassie® Brilliant Blue G-250 (Bio-Rad protein assay, Bio-Rad laboratories) ändert sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffs von 465 nm nach 595 nm. Diese Änderung wurde im

anthos 2001-Spektrophotometer (anthos 2001, lab.tec instruments) bei einer Wellenlänge von 595 nm ermittelt.

2.3 Western Blot Analyse

2.3.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Proteine wurden in einem Ladepuffer (250 mM Tris/HCl, pH 6,8, 2% SDS, 10% Glycerin, 20 mM DTT, 0,01% Bromphenolblau) im Verhältnis 1:1 aufgenommen, für 5 min bei 95°C denaturiert und in einem diskontinuierlichen SDS-Elektrophoresesystem nach Laemmli (1970) mit einem Sammelgel (Sammelgelpuffer: 0,13 M Tris/HCl, pH 6,8, 4,5% Acrylamid, 0,1% SDS, 0,05% APS, 0,2% TEMED) und einem Trenngel (Trenngelpuffer: 0,39 M Tris/HCl, pH 8,9, X% Acrylamid, 0,1% SDS, 0,05 % APS, 0,2% TEMED) in einer Hoefer SE 250 Elektrophorese-Kammer (Amersham Biosciences) aufgetrennt. Die Prozentigkeit des Trenngels wurde in Abhängigkeit der Größe der nachzuweisenden Proteine definiert und mit der entsprechenden Menge Acrylamid angefertigt. Die vertikale Auftrennung der Proteine erfolgte in einem Elektrophoresepuffer (192 mM Glyzin, 250 mM TRIS, 1% SDS, pH 8,8). Zur Ermittlung der Molekulargewichte wurde ein Proteingrößenstandard zwischen 10 kD und 250 kD (Precision Plus Protein™ Standard, Bio-Rad laboratories) verwendet.

2.3.2 Western Blot

Die in der SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennten Proteine wurden durch das semi-dry Verfahren (PerfectBlue™ Semi-Dry-Electroblotter, PeqLab) bei 150 mA pro 46 cm² Gelfläche in Transferpuffer (39 mM Glyzin, 48 mM TRIS, 0,038% SDS, 20% Ethanol) auf eine Polyvinylidendifluorid (PDVF)-Membran transferiert. Die Dauer des Transfers richtete sich nach der Größe der zu transferierenden Proteine (Tab. 1). Nach dem Transfer wurden freie Bindungsstellen der Membran durch 30-minütiges Schwenken in 5% Milchpulver (Blotting Grade Blocker Non-Fat Dry Milk, Bio-Rad laboratories), das in TBS nach Zugabe von 0,1% NP-40 gelöst wurde, blockiert. Daraufhin wurde die Membran über Nacht bei 4°C mit dem jeweiligen spezifischen ersten Antikörper (Tab. 1) in TBS plus 0,1% NP-40 auf einem Schwenker inkubiert. Die Zugabe des spezifischen zweiten Antikörpers (Tab. 2) erfolgte nach dreimaligem Waschen der Membran mit TBS plus 0,1% NP-40 für jeweils 15 min. Nach Entfernen des zweiten Antikörpers durch dreifaches Waschen für 15 min mit TBS plus 0,1% NP-40 erfolgte die Visualisierung der Immunkomplexe. In Abhängigkeit des zweiten Antikörpers wurde wie folgt gearbeitet: Nach Inkubation der Membran mit einem

Meerrettich-Peroxidase-gekoppelten Antikörper wurde diese für 1 min mit einer Substratlösung für Meerrettich-Peroxidase (ECL, Amersham) inkubiert. Die entstandene Chemilumineszenz wurde mit Hilfe eines Röntgenfilms (Hyperfilm™ ECL, Amersham Biosciences) detektiert: Der Röntgenfilm wurde lichtgeschützt auf die Membran in einer Dunkelkassette gelegt und für 15 sek bis 30 min exponiert. Bei Verwendung eines fluorophorgekoppelten zweiten Antikörpers mit einer Anregungswellenlänge von 680 nm und einer Emissionswellenlänge von 700 nm wurden die Immunkomplexe am Odyssey Infrarot Scanner (LI-COR Biosciences) und entsprechenden Einstellungen an der Odyssey Software (Version 2.0.1, LI-COR Biosciences) visualisiert. Die Kontrolle für eine gleichmäßige Proteinbeladung erfolgte mit dem Nachweis des ubiquitär exprimiertem β -Aktin. Dafür wurde die bereits entwickelte Membran eine Stunde in einer Pufferlösung geschwenkt, um bestehende Antikörperkomplexe aufzulösen. Die Membran wurde dreimal für 15 min mit TBS plus 0,1% NP-40 gewaschen und anschließend für 30 min in 5% Milchpulverlösung zum Sättigen freier Proteinbindungsstellen geschwenkt. Die darauffolgende Arbeitsweise zur Visualisierung des β -Aktin wurde wie oben beschrieben durchgeführt.

Tab. 1: Verwendete erste Antikörper im Western Blot Verfahren

Antikörper	Spezifität	Verdünnung	Protein- größe	Prozentigkeit SDS-Gel	Transferzeit
polyklonaler Maus-Anti-IRAG-Antikörper (Dr. Jens Schlossmann)	humanes IRAG; AS 53 – 499	1:500	55 – 130 kDa	7,5%	90 min
polyklonaler Hase-Anti-ESP1/CRP2-Antikörper (Sigma)	humanes ESP1/CRP2; AS 95 – 108	1:100	23 kDa	15%	20 min
monoklonaler Maus-Anti-V5-Antikörper (Invitrogen)	V5-Epitop	1:2000	5 kDa	10% (bei Fusion an IRAG)	1h (bei Fusion an IRAG)
monoklonaler Maus-Anti- β -Aktin-Antikörper (Sigma)	humanes β -Aktin	1:2000	42 kDa		

AS = Aminosäure; kDa = kilo Dalton

Tab. 2: Verwendete zweite Antikörper im Western Blot Verfahren

Antikörper	Spezifität	Verdünnung
polyklonaler Alexa Fluor [®] 680-Ziege-Anti-Hase-Antikörper (Molecular Probes)	IgG (schwere und leichte Kette)	1:2000
polyklonaler Alexa Fluor [®] 680-Ziege-Anti-Maus-Antikörper (Molecular Probes)	IgG (schwere und leichte Kette)	1:2000
polyklonaler ECL™ Affe-Anti-Hase-Meerrettich-Peroxidase-gekoppelter Antikörper (Amersham)	IgG (schwere und leichte Kette)	1:2000

AS = Aminosäure; kDa = kilo Dalton

2.4 DNA-Klonierungen

2.4.1 Klonierungstechniken

Die Klonierung der kodierenden Sequenz von *ESP1/CRP2* in einen Klonierungsvektor wurde wie folgt erzielt: Die kodierende Sequenz wurde mit einer proofreading DNA Polymerase (PfuUltra®DNA Polymerase, Stratagene) amplifiziert, da diese durch eine 3'-5'-Exonukleaseaktivität den Einbau von nicht komplementären Nukleotiden in die neusynthetisierte DNA korrigiert, daher eine sehr hohe Kopiergenauigkeit der Matrizen-DNA aufweist und glatte DNA-Enden generiert. Die Taq-DNA Polymerase (RedTaq™ DNA Polymerase, Sigma) fügt in einem weiteren Schritt dem PCR-Produkt 3'-Überhänge an, die vorzugsweise Adenosine enthalten. Die Ligation des PCR-Produkts in den linearisierten TOPO-TA®-Vektor mit einem 3'-überstehenden Thymidin wurde mit Hilfe der TOPO-TA cloning®-Methode der Firma Invitrogen erreicht. Die Umklonierung der kodierenden Sequenz für *ESP1/CRP2* in einen EGFP-Expressionsvektor wurde mit Restriktionsendonukleasen der Firma New England Biolab (NEB) und nach NEB-Standardprotokollen erzielt. Dephosphorylierung der restringierten DNA-Vektoren durch alkalische Phosphatase (SHRIMP phosphatase alkaline, Roche) verhinderte die Religation des Vektors. Das Auffüllen von 5'-überstehenden DNA-Enden des DNA-Fragments wurde durch den End Conversion Mix (ECM, Firma Novagen) erzielt. Die Ligation von DNA-Fragment und Vektor wurde mit einer T4-DNA-Ligase von Novagen nach Protokoll durchgeführt.

Die Klonierung der kodierenden Sequenz von *ESP1/CRP2* in den bakteriellen Expressionsvektor pCR®T7/CT-TOPO® wurde durch die Amplifikation der *ESP1/CRP2*-DNA durch die PfuUltra®DNA Polymerase, anschließend Anfügen eines 3'-überhängenden Adenosin-Nukleotids durch die RedTaq™ DNA Polymerase und die TOPO-TA cloning®-Methode erreicht.

Die PCR-Produkte der RACE-PCR zur Identifizierung von Spleißvarianten von *IRAG* und *ESP1/CRP2* wurden mit der RedTaq™ DNA Polymerase generiert und in den pCR®II-TOPO®-Vektor mit Hilfe der TOPO-TA cloning®-Methode kloniert.

Die kodierende Sequenz von *IRAG* und den *IRAG*-Spleißvarianten wurde mit der PfuUltra®DNA Polymerase generiert und in den Donorvektor pENTR™/D-TOPO® mit dem pENTR™ Directional TOPO® Cloning Kit kloniert. Der pENTR™ Directional TOPO® Cloning Kit gewährleistet die gerichtete Subklonierung von DNA mit glatten Enden in den pENTR™/D-TOPO®-Vektor, der als Klonierungs- und Ausgangsvektor für das Gateway® System (Invitrogen) dient. Mittels „site specific recombination“, also gezielter Rekombination, die mit Hilfe einer Rekombinase des Bakteriophagen lambda (Invitrogen) erfolgt, wurde die DNA-Insertion aus dem Ausgangsvektor in den Empfängervektor pcDNA3.1/nV5-DEST umkloniert. In Tabelle 3 sind die verwendeten Vektoren aufgeführt.

Die Durchführung einer PCR zur Gewinnung von DNA-Sequenzen, das Anfügen von überhängenden Adenosin-Nukleotiden und die RACE-PCR sind in Kapitel 2.5 beschrieben.

Tab. 3: Verwendete Vektoren

Verwendung	Vektor	Herkunft
Klonierung des Gens <i>ESP1/CRP2</i> und den IRAG Spleißvarianten; Standard für Echt-Zeit-RT-PCR	pCR®II-TOPO®	Invitrogen
Bakterielle Expression des rekombinanten Proteins <i>ESP1/CRP2</i>	pCR®T7/CT-TOPO®	Invitrogen
Klonierungs- und Donorvektor des Gateway® Systems	pENTR_D_TOPO_verA	Invitrogen
Transiente Expression der rekombinanten Proteine IRAG und der IRAG Spleißvarianten	pcDNA3./1nV5-DEST	Invitrogen
Transiente Expression des rekombinanten Proteins <i>ESP1/CRP2</i> als C-terminales Fusionsprotein mit dem enhanced green fluorescence protein (EGFP)	pEGFP-C1	BD Biosciences Clontech
transiente Expression des rekombinanten Proteins <i>ESP1/CRP2</i> als N-terminales Fusionsprotein mit dem enhanced green fluorescence protein (EGFP)	pEGFP-N1	BD Biosciences Clontech

2.4.2 Agarosegelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA erfolgte mit Gelen aus Agarose (PeqGold Universal Agarose, PeqLab), deren Konzentration je nach Größe der aufzutrennenden DNA-Moleküle variierte (0,7-3% Agarose). Nach dem Aufkochen der Agarose in 1x TAE-Puffer (40 mM Tris-Azetat, 1 mM EDTA, 0,35% Eisessig) und Erstarren des Gels wurde die DNA in diesem elektrophoretisch aufgetrennt (80-100 V, Sunrise™, Gibco BRL). Ethidiumbromid im Puffer interkaliert in die DNA und ermöglichte nach einer elektrophoretischen Auftrennung die Visualisierung der DNA unter UV-Licht (302 nm). Für präparative Gele, aus denen die DNA für die Subklonierung isoliert und mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten wurde, wurde der Farbstoff GelStar Nucleic Acid Gel Stain (BioWhittaker Molecular Applications) verwendet, der bei einer Wellenlänge von 420 nm anregbar ist (Flu-O-Blu, Biozym). In diesem Anregungsbereich treten im Gegensatz zum UV-Bereich keine DNA Doppelstrangbrüche, bzw. Basenmodifikationen auf.

Zur Bestimmung der Größe der DNA wurden DNA-Marker mit einer Größe von 100-10.000 bp (DNA-Leiter Mix, PeqLab) und 50-1.031 bp (50 bp DNA-Leiter, PeqLab) verwendet.

2.4.3 Transformation von kompetenten Bakterien

Zur Propagation von Plasmid-DNA wurde 0,1-1 µg Plasmid-DNA oder 3 µl eines 10 µl-Ligationsansatzes vorsichtig zu kompetenten Bakterien (*E.coli* TOP10, Invitrogen), die auf Eis aufgetaut worden waren, zupipettiert. Nach einer 30-minütigen Inkubation auf Eis wurden die Bakterien für 30 sek bei 42°C inkubiert und sofort auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 250 µl SOC-Medium (2% Trypton, 0,5% Hefe Extrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM Glukose) wurden die Bakterien zur Ausbildung der Antibiotikumresistenz für eine Stunde bei 37°C geschüttelt. Empirische Mengen des Transformationsansatzes wurden auf Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die Bakterienkolonien wurden mittels PCR auf das gewünschte Insert hin untersucht.

2.5 Polymerasekettenreaktion (PCR)

2.5.1 PCR zur Generierung von spezifischen DNA-Fragmenten

Die Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) ist eine schnelle *in vitro* Methode zur Generierung von spezifischen DNA-Fragmenten, bei der strang (sense)- und gegenstrang (antisense)- spezifische Oligonukleotid-Primer (Tab. 4) die DNA-Synthese durch eine hitzestabile Polymerase gezielt starten.

Die Anzahl der Zyklen betrug bei der DNA-Klonierung in Abhängigkeit der Amplifikationseffizienz 30-40. Die Bedingungen einer PCR waren:

1.	Initiale Denaturierung der DNA	94°C	3 min	
2.	Denaturierung	94°C	30 sek	
	Anlagerung der Primer	X°C	30 sek	30 - 40 x
	Elongation durch die Polymerase	72°C	X sek	
3.	Terminale Elongation	72°C	7 min	

Als Ausgangsmenge für eine PCR wurden 100 ng cDNA oder 10 ng Plasmid-DNA eingesetzt. Die Anlagerungstemperatur der Primer (X°C) wurde mittels Software Primer Express™ (PE Applied Biosystems) errechnet. Die Elongationszeit durch die Polymerase wurde nach folgender Formel festgelegt: 1.000 bp zu amplifizierende DNA ≈ 1 min Elongation. Die Oligonukleotidprimer wurden von der Firma MWG Biotech AG, Ebersberg, synthetisiert und mit einer Endkonzentration von 200 nM eingesetzt (Tab. 4). Ebenso die vier Desoxynukleosidtriphosphate dATP, dTTP, dGTP und dCTP (Promega). Nach Notwendigkeit wurden unterschiedliche Polymerasen verwendet: Die proofreading DNA

Polymerase PfuUltra®DNA Polymerase (Stratagene) mit sehr hoher Lese- und Kopiergenauigkeit aufgrund der oben beschriebenen 3'-5'-Exonukleaseaktivität wurde zur Amplifikation der kodierenden Sequenzen von *IRAG* und *ESPI/CRP2* verwendet. Die Taq DNA-Polymerase RedTaq™ (Sigma) wurde für die RACE-PCR verwendet, für PCRs eingesetzt, die zur Überprüfung der Größe und Orientierung der Insertionen in den Plasmiden dienten oder zum Anfügen von 3'-überhängenden Nukleotiden.

Tab. 4: Verwendete PCR Primer

Primername	Sequenz
IRAG-Exon 1a-s	5'-TCTCAGAGGAGGCGTGCGGCC-3'
IRAG-Exon 1b-s	5'-CCTAGAATAACCTGCCTCTTCGG-3'
IRAG-Exon 1c-s	5'-GGGTTCAAGCAATTCTCATGC-3'
IRAG-Exon 1d-s	5'-CCAGGCCTCTTGGAGCATC-3'
IRAG-Exon 4-s	5'-CAAGTTGGTGAGTGAGCGATTC-3'
IRAG-Exon 5-s	5'-CTCCTACATCCTCTCGGAGCAA-3'
IRAG-Exon 5-as	5'-TGCTTCGAGAGGATGTAGGAGAA-3'
IRAG-Exon 5a-as	5'-GCCACTGCACACATCCAAAC-3'
IRAG-Exon 6-as	5'-AGGCTCGCCAGGGTGAG-3'
IRAG-Exon 8a-as	5'-CCAGCAAATGTTTCCTTTTTC-3'
IRAG-Exon 11-s	5'-CGTGTGGTGCAACTGTCCTTGGCC-3'
IRAG-Exon 11-as	5'-CTGAAAGGGAACGCAACCTGAC-3'
IRAG-Exon 14-s	5'-CACGGCACGGTCCATGT-3'
IRAG-Exon 15-as	5'-CTGGTAAGGAGGGAATGGATGA-3'
IRAG-Exon 20-as	5'-AGCAGAGATGTCAGACTTCAGAGGC-3'
pENTR-IRAG α -s	5'-CACCATGGGAATGGATTTGACTTGTCC-3'
pENTR-IRAG α -as	5'-GTGACTTCTTCATCCACTGGATGC-3'
pENTR-IRAG β -as	5'-GTGGTGACAGCAGATTAGTAAGCAAG-3'
pENTR-IRAG γ -as	5'-GGCTCGACATACTCATGCAGG-3'
pENTR-IRAG δ -as	5'-GCCAGTGATACACAAATCCAGCA-3'
ESPI/CRP2-ATG-s	5'-cgaccatggcctccaatg-3'
ESPI/CRP2-TAG-as	5'-GGGCTGGACCTTGCCCTTC-3'
M13 (-20) forward	5'-GTAAAACGACGGCCAG-3'
M13 reverse	5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'
V5-s	5'-ACCGAGGAGAGGGTTAGGGAT-3'

s = sense, as = antisense

2.5.2 Anhängen 3'-überhängender Adenosine

Zum Anhängen von 3'-überhängenden Enden wurden 9 μ l DNA (100-300 ng) mit 0,5 μ l dNTPs (200 nM Endkonzentration je Nukleotid) und 0,5 μ l RedTaq™ DNA Polymerase (Sigma) für 5 min, 95°C und 10 min, 72°C inkubiert. Hierbei werden bevorzugt Adenosine angehängt, so dass die PCR-Produkte mit Hilfe der TOPO-TA cloning®-Methode einkloniert werden konnten.

2.5.3 PCR-Analyse von Transformantenklonen

Die Analyse transformierter Bakterien auf das Vorhandensein des Plasmids mit der gewünschten Insertion wurde mit einer PCR ausgeführt. Hierfür wurde mit einer sterilen Pipettenspitze eine einzelne Kolonie von einer Agarplatte gepickt, auf eine frische Agarplatte zur späteren Anzucht in Flüssigmedium überimpft und in einem sterilem PCR-Reaktionsgefäß ausgestrichen. Mit vektor- und/oder insertspezifischen Primern wurde eine PCR mit einer initialen Denaturierung von 10 min durchgeführt, die zum Aufschluss der Bakterienmembran führt.

2.6 RACE-PCR

Die 5' und 3' RACE-PCR (rapid amplification of cDNA ends) wurde zur Amplifikation und Identifizierung von 5' und 3' mRNA Enden eingesetzt. Gesamt-RNA aus den humanen Zelllinien SW480 und HeLa, sowie aus verschiedenen Geweben des humanen Gastrointestinaltrakts wurden als Matrize für eine 5' und eine 3' RACE-PCR verwendet.

2.6.1 5' RACE-PCR

Die 5' RACE wurde mit den Reagenzien der Firma Ambion und dem First Choice™ RLM-RACE Protokoll nach folgender Methode ausgeführt: Nach Calf Intestinal Phosphatase (CIP)-Behandlung der Gesamt-RNA zur Entfernung von freien 5' Phosphaten von z.B. ribosomaler RNA, degradiertes mRNA, tRNA und kontaminierender genomischer DNA wurde durch Tobacco Acid Pyrophosphatase (TAP)-Behandlung die 5' Schutzkappe der mRNA entfernt, so dass ein Adapterlinker an das phosphorylierte 5' Ende der mRNA ligiert werden konnte. Die Reverse Transkriptase (RT) Reaktion wurde mit dNTPs, RNase Inhibitor und der Thermoscript™ RTase der Firma Thermoscript nach dem „EndoFree“ Protokoll der Firma Ambion durchgeführt. Die Temperatur für die RT-Reaktion betrug 50°C. In der RT-Reaktion, bei der mRNA in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben wird, wurden genspezifische antisense Primer für die IRAG cGKI-Bindungsstelle (5'-IRAG-B1-as), die cGKI Phosphorylierungsstelle (5'-IRAG-P1-as) oder für Exon 8 von ESP1/CRP2 (5'-ESP1/CRP2-1-as) verwendet. Anschließend wurde eine erste Nested-PCR mit einem adapterspezifischen sense und genspezifischen antisense Primer durchgeführt. In einer Nested-PCR werden das PCR-Produkt der zuvor durchgeführten PCR und Primer, die innerhalb dieses PCR-Produkts binden, eingesetzt. Dadurch erhöht sich die Spezifität der zu amplifizierenden DNA. Der adapterspezifische sense Primer („Outer Primer“) bindet die 5' Region des Adapterlinkers, die genspezifischen antisense Primer binden in der Region der IRAG cGKI-Bindungsstelle (5'-IRAG-B2-as), der cGKI Phosphorylierungsstelle (5'-IRAG-

P2-as) oder in Exon 8 von ESP1/CRP2 (5'-ESP1/CRP2-2-as). Eine zweite Nested-PCR wurde mit einem adapterspezifischen sense Primer („Inner Primer“) durchgeführt, der den 3' Bereich des Adapterlinkers bindet, und mit genspezifischen antisense Primern für die IRAG cGKI-Bindungsstelle (5'-IRAG-B3-as), die cGKI Phosphorylierungsstelle (5'-IRAG-P3-as) und Exon 8 von ESP1/CRP2 (5'-ESP1/CRP2-3-as) (Tab. 5).

Die Produkte der zweiten PCR wurden in den Klonierungsvektor pCR®II-TOPO® kloniert und zur vollständigen Sequenzierung an die Firma GATC Biotech, Konstanz, geschickt. Die erhaltenen Daten wurden mit der Online-Software NCBI BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) ausgewertet.

Tab. 5: Adapterlinker, Reverse Transkriptase Primer, 5' RACE-PCR Primer

Reaktion	Name	Sequenz
Ligation Adapterlinker	5' RACE Adapterlinker	5' -GCUGAUGGCGAUGAAUGAACACUGCGUUUGCUG GCUUUGAUGAAA-3'
Reverse Transkriptase	5'-IRAG-B1-as	5' -TGTAAGTGAGTTGCTTCGAGAGGA-3'
	5'-IRAG-P1-as	5' -TTAGGAACCACAGCAACGCTG-3'
	5' ESP1/CRP2-1-as	5' -TCACCCACGAAGGGAGCA-3'
erste Nested-PCR	Outer Primer	5' -GCTGATGGCGATGAATGAACACTG-3'
	5'-IRAG-B2-as	5' -TGCTTCGAGAGGATGTAGGAGAA-3'
	5'-IRAG-P2-as	5' -GGAACCACAGCAACGCTGAC-3'
	5' ESP1/CRP2-2-as	5' -TGAGCCCACATCATGAGAGC-3'
zweite Nested-PCR	Inner Primer	5' -GAGGACTCGAGCTCAAGC-3'
	5'-IRAG-B3-as	5' -GAATCGCTCACTCACCACACTTG-3'
	5'-IRAG-P3-as	5' -GCTCCGCATGGTCCTTCTC-3'
	5'-ESP1/CRP2-3-as	5' -GAGAGCCGCTGTAGCCTAGG-3'

as = antisense; B = Bindungsregion der cGKI; P = cGKI Phosphorylierungsstelle

2.6.2 3' RACE-PCR

Die 3' RACE-PCR wurde wie folgt durchgeführt: Gesamt-RNA wurde in Gegenwart des 3'-Adapter-Poly-dT-Primers Qt, dNTPs, RNase Inhibitor und der Thermoscript™ RTase nach dem EndoFree Protokoll der Firma Thermoscript bei 50°C in cDNA umgeschrieben.

Zwei folgende Nested-PCRs mit adapterspezifischen antisense und genspezifischen sense Primern (Tab. 6) wurden nach dem First Choice™ RLM-RACE Protokoll der Firma Ambion ausgeführt. In der ersten Nested-PCR wurden spezifische sense Primer für die IRAG cGKI Bindungsstelle (3'-IRAG-B1-s), die IRAG Phosphorylierungsstelle (3'-IRAG-P1-s) und für Exon 8 der mRNA von ESP1/CRP2 (3'-ESP1/CRP2-1-s) gewählt. In der zweiten Nested-PCR wurden die sense Primer 3'-IRAG-B2-s, für die IRAG cGKI Bindungsstelle, 3'-IRAG-P2-s, für die IRAG Phosphorylierungsstelle, und 3'-ESP1/CRP2-2-s für Exon 8 der mRNA von ESP1/CRP2 gewählt. Der Primer Q0 wurde in der ersten Nested-PCR, der Primer Q1 in der zweiten Nested-PCR als antisense Primer eingesetzt. Die in der zweiten Nested-PCR

amplifizierten DNA-Sequenzen wurden kloniert, in voller Länge sequenziert und gegen die cDNA- und genomische Datenbank verglichen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

Tab. 6: Verwendete 3' RACE-PCR Primer

Reaktion	Primernamen	Sequenz
Ligation Adapterlinker Reverse Transkriptase	Qt	5'-CCAGTGAGCAGAGTGACGAGGACTCGAGCTCAAGC TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTVN-3'
erste Nested-PCR	Q0	5'-CCAGTGAGCAGAGTGACG-3'
	3'-IRAG-B1-s	5'-CAAGTTGGTGAGTGAGCGATTC-3'
	3'-IRAG-P1-s	5'-ATCAGAATTCAAGCCGCAGCT-3'
	3' ESP1/CRP2-1-s	5'-CTGTCCGCTCTCCCTCTCCT-3'
zweite Nested-PCR	Q1	5'-GAGGACTCGAGCTCAAGC-3'
	3'-IRAG-B2-s	5'-TCCTCTCGAAGCAACTCACTTACA-3'
	3'-IRAG-P2-s	5'-AGAATATGCCTCGCCGGA-3'
	3' ESP1/CRP2-2-s	5'-CCACCTGCCAGTGTTATTTATGC-3'

s = sense; B = Bindungsregion der cGKI; P = cGKI Phosphorylierungsstelle

2.7 Echt-Zeit-RT-PCR

Gesamtzell-RNA wurde durch die Reagenzien des TaqMan® Reverse Transcription Reagent, (Applied Biosystems) bei 25°C für 10 min, 50°C für 1 Stunde, 95°C für 5 min in cDNA umgeschrieben. Zur relativen Quantifizierung einer spezifischen mRNA wurden jeweils 5 µl eingesetzter cDNA (entsprechen 100 ng umgeschriebener RNA) mittels Echt-Zeit-RT-PCR und eines Echt-Zeit-RT-PCR-Gerätes (ABI PRISM 7700 detection system, PE Applied Biosystems) amplifiziert und auf die parallel amplifizierte Menge von GAPDH (Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase) normalisiert.

Für humanes ESP1/CRP2 und IRAG wurde mit einer 5'-Fluoreszenzfarbstoff (6-carboxy-fluorescein, FAM)-markierten Sonde gearbeitet (Tab. 7), die 3' der beiden Primer (Tab. 8) komplementär an die Ziel-DNA bindet. Ein sogenanntes Quencher-Molekül (6-carboxy-tetramethylrhodamin, TAMRA) am 3'-Ende unterdrückt die Fluoreszenz der Sonde. Die Elongation der DNA durch eine Taq-DNA Polymerase im „PCR Universal Master Mix“ der Firma Applied Biosystems führt zum Abbau der Sonde durch die 3'-5'-Exonukleaseaktivität der Taq-DNA Polymerase und damit zur Entfernung von Quencher-Molekül und Fluorophor, so dass Fluoreszenz detektiert werden kann. Die Intensität der Fluoreszenz wird während der gesamten Echt-Zeit-RT-PCR bestimmt. Zwei Bereiche im humanen *IRAG* Gen wurden untersucht, die für die Region um die Phosphorylierungsstellen an den Serinen der Aminosäuren (AS) 664 und 677 und die Bindungsstelle der cGKI an IRAG (AS 152-184) kodieren.

Intronüberspannende Primerpaare und die entsprechende Sonde wurden mit der Software Primer Express™ (PE Applied Biosystems) ausgewählt und von der Firma MWG Biotech

AG, Ebersberg, synthetisiert. Die Primer IRAG-B-s, IRAG-B-as und die IRAG-B-Sonde wurden zur Quantifizierung für die IRAG cGKI Bindungsstelle kodierenden mRNA eingesetzt. Die flankierende Sequenz der Phosphorylierungsstellen an den Serinen 664 und 677 wurde mit den Primern IRAG-P-s, IRAG-P-as und der IRAG-P-Sonde quantifiziert. ESP1/CRP2 wurde mit den Primern ESP1/CRP2-s, ESP1/CRP2-as und der ESP1/CRP2-Sonde quantifiziert (Tab.7, Tab.8).

Zur Bestimmung der quantitativen Expression der mRNA wurden für ESP1/CRP2 und IRAG spezifische Plasmidverdünnungsreihen hergestellt und in jeder Echt-Zeit-RT-PCR mitgeführt. Das Plasmid für ESP1/CRP2 beinhaltet die mit den Echt-Zeit-RT-PCR Primern gewonnene DNA-Sequenz, für IRAG wurden die beiden amplifizierten Bereiche der cDNA in einen einzigen Vektor kloniert. Hierdurch ist es möglich, die Kopienzahlen von beiden mRNA Regionen unabhängig von der Effizienz der beiden Echt-Zeit-RT-PCRs exakt zu bestimmen. Sechs 1:5-Verdünnungen wurden für ESP1/CRP2 und IRAG gewählt, so dass pro Reaktionsansatz 5×10^5 , 1×10^5 , 2×10^4 , 4×10^3 , 8×10^2 , und $1,6 \times 10^2$ Moleküle enthalten waren. Eine GAPDH-Verdünnungsreihe wurde mit folgenden Kopienzahlen eingesetzt: 2×10^6 , 4×10^5 , 8×10^4 , $1,6 \times 10^4$, $3,2 \times 10^3$, und $6,4 \times 10^2$ (Dr. Saur).

Tab.7: Verwendete TaqMan Sonden

Sondenname	Sequenz
IRAG-B-Sonde	5´-FAM-CCGGAGACTCCCCATCAGCTGTTTC-TAMRA-3´
IRAG-P-Sonde	5´-FAM-AGGGTCAGCGTTGCTGTGGTTCCTAA-TAMRA-3´
ESP1/CRP2-Sonde	5´-FAM-CTGCCACCCACCTGCCAGTGTTA-TAMRA-3´

FAM: 6-carboxy-fluorescein; TAMRA: 6-carboxy-tetramethylrhodamin

Tab. 8: Verwendete TaqMan Primer

Primername	Sequenz
IRAG-B-Exon 4-s	5´-CAAGTTGGTGAGTGAGCGATTC-3´
IRAG-B-Exon 5-as	5´-TGCTTCGAGAGGATGTAGGAGAA-3´
IRAG-P-Exon 14-s	5´-CACGGCACGGTCCATGT-3´
IRAG-P-Exon 15-as	5´-CTGGTAAGGAGGGAATGGATGA-3´
ESP1/CRP2-Exon 8-s	5´-CTGTCCGCTCTCCCTCTCCT-3´
ESP1/CRP2-Exon 8-as	5´-TCACCCACGAAGGGAGCA-3´

s = sense, as = antisense

2.8 Plasmidvervielfältigung

Zur Propagation von Plasmid-DNA wurde LB-Medium (Fluka) nach Zugabe von Ampicillin (100 µg/ml) oder Kanamycin (25 µg/ml) mit dem plasmidtragenden Klon angeimpft und für ungefähr 16 Stunden bei 37°C im Bakterienschüttler bei 200 rpm geschüttelt. Flüssigmedium wurde entweder mit einem von einer Agarplatte gepickten Klon oder mit einer dauerhaft

angelegten Glycerinkultur (400 µl Glycerin, 500 µl Bakteriensuspension; Lagerung -80°C) angeimpft.

2.9 Isolierung von DNA und RNA

2.9.1 DNA-Isolierung

DNA wurde aus 5 ml (Mini Prep) oder 50 ml Bakteriensuspension (Midi Prep) nach Anleitung und Kit (QIAprep® Spin Miniprep Kit, HISpeed® Plasmid Midi Kit) der Firma Qiagen isoliert. Die Isolierung der DNA aus Agarosegelen erfolgte mit dem QIAquick® Gel Extraction Kit nach der Anleitung der Firma Qiagen.

2.9.2 RNA-Isolierung

RNA wurde aus Gewebe und kultivierten Zelllinien mit PeqGold RNAPure (PeqLab) und nach Protokoll der Firma PeqLab isoliert. Gewebepreparate wurden gemäß Protokoll in PeqGold RNAPure™ (PeqLab) homogenisiert. Bei kultivierten Zelllinien wurde das Medium abgenommen und die Zellen in erforderlicher Menge PeqGold RNAPure™ lysiert. Die Phasentrennung erfolgte in PhaseLock Gel™ Heavy Reaktionsgefäßen (Eppendorf).

2.9.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde photometrisch im Spektralphotometer GeneQuant *pro* (Amersham pharmacia biotech) bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Die Reinheit der Nukleinsäuren wurde aus dem Verhältnis $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ bestimmt. Dieser Quotient muss über 1,6 liegen.

2.10 Expression und Reinigung von Proteinen

2.10.1 Bakterielle Proteinexpression

Für die bakterielle Expression von ESP1/CRP2 wurden chemisch kompetente *E.coli* BL21-Bakterien (Invitrogen) ebenfalls mittels Hitzeschockmethode transformiert, die unter 2.4.3 beschrieben wurde. Das zu transformierende Plasmid trägt die kodierende Sequenz von ESP1/CRP2, das durch vollständige Sequenzierung der Firma GATC, Konstanz, auf

Korrektheit überprüft wurde. Nach Inkubation über Nacht im Brutschrank bei 37°C auf Agarplatten (Ampicillin 100 µg/ml) wurden die Klone mit einer PCR auf das gewünschte Plasmid hin untersucht. Positive Klone wurden zur DNA-Isolierung angeimpft und die isolierte DNA mittels Restriktionsverdau ein weiteres Mal auf Richtigkeit hin überprüft. Zur Proteinexpression in großen Maßstab wurden 800 ml LB-Medium (Ampicillin 100 µg/ml) mit einer Einzelkolonie angeimpft und bei 37°C geschüttelt, bis eine OD₆₀₀ von 0,5-0,8 erreicht war. Anschließend erfolgte die Induktion der Proteinexpression durch Isopropyl-Thio-β-D-Galactopyranosid (IPTG). Nach vierstündigem Schütteln wurden die Bakterien bei 16.000 x g für 20 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Bakterienpellet in BugBuster™-Lyse Puffer (Novagen) für die Proteinaufreinigung über eine Nickel-Säule aufgenommen.

2.10.2 Proteinaufreinigung

5 mg Bakterienpellet wurden in 50 ml BugBuster™-Lyse Puffer (Novagen) aufgenommen. Nach Inkubation auf einem langsam rotierenden Schüttler für 10 min wurde das Lysat bei 16.000 x g, 4°C für 20 min abzentrifugiert. Der proteinenthaltende Überstand wurde im Kühlraum (4°C) über eine geladene Nickelsäule (Novagen) aufgereinigt. Die Eluatfraktionen wurden bei -80°C aufbewahrt und mittels Western Blot überprüft.

2.11 Funktionelle Studien

2.11.1 Kultivierung von Zelllinien

Glatte Muskelzellen des humanen Kolons (colon smooth muscle cells, CoSMC) der Firma Cambrex sind isolierte Zellen eines Spenders, die in Kultur gebracht und nach zweimaligem Umsetzen kryokonserviert wurden. Nach Protokoll der Firma wurden diese Zellen in SmGM- (smooth muscle growth medium) Medium ausgesät und kultiviert. Diesem Medium wurde von der Firma mitgeliefertes FCS (5%), Insulin (5 mg/l), humaner Fibroblasten Wachstumsfaktor-B (hFGF-B, 0,5 µg/l), Gentamicin (50 mg/l), Amphotericin-B (50 µg/l) und humaner epidermaler Wachstumsfaktor (hEGF, 0,5 µg/l) zugegeben. Zum Umsetzen dieser Zellen bei einer Zelldichte von 80% wurden die Zellen mit HEPES-gepufferter Kochsalzlösung (HBSS) gewaschen und mit Trypsin/EDTA für circa eine Minute inkubiert, bis sich die adhärenen Zellen vollständig vom Boden der Kulturflasche lösten. Anschließend erfolgte die Inaktivierung mit einer trypsinneutralisierenden Lösung (TNS). Nach Zentrifugation bei 220 x g für 5 min wurde der Überstand abgenommen, die Zellen in SmGM-Medium resuspendiert, 1:5 verdünnt und ausgesät. HBSS, Trypsin/EDTA und TNS

wurden von der Firma Cambrex bezogen. Um eine Entdifferenzierung dieser Zellen zu vermeiden, wurden alle Versuche lediglich bis zur zehnten Passage durchgeführt.

COS-7-Zellen wurden in DMEM (Gibco), mit 10% FCS (Gibco) und Penicillin/Streptomycin (50 µg/ml) kultiviert. Bei einer Zelldichte von ca. 80% wurden die Zellen mit Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (PBS, Invitrogen) gewaschen, mit Trypsin/EDTA inkubiert, zur Zentrifugation bei 1.100 rpm für 5 min in DMEM-Medium aufgenommen und 1:10 umgesetzt. SW480-Zellen wurden analog zu COS-7-Zellen kultiviert, jedoch wurde RPMI-1640 als Kulturmedium verwendet.

2.11.2 Transiente Transfektion kultivierter Zelllinien

Die transiente Expression rekombinanter Proteine erfolgte durch Transfektion der Zelllinien CoSMC und COS-7 mit entsprechenden Expressionsplasmiden.

Für die transiente Expression der IRAG Isoformen wurden 5×10^3 CoSMC pro Loch einer 96-Loch Platte (µclear 96-Loch Platte, Greiner) ausgesät, so dass nach 24-stündiger Inkubation im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ die Konfluenz der Zellen bei etwa 60% lag. Die Transfektion wurde mit dem Transfektionsreagenz FuGENE6 (Roche) durchgeführt. Das Transfektionsreagenz:DNA-Verhältnis zur Erzielung der optimalen Transfektionseffizienz war bei diesen Zellen mit 0,3 µl:50 ng erreicht. Die Bestimmung der intrazellulären Kalziumkonzentration *in vivo* erfolgte 48 Stunden nach Aussaat der Zellen. Für den Nachweis der transienten Expression von ESP1/CRP2-EGFP wurden 6×10^4 CoSMC pro Loch einer 6-Loch Platte (Greiner) ausgesät. Die Lyse der Zellen erfolgte 48 Stunden nach Aussaat der Zellen. Für den Nachweis von IRAG Protein in CoSMC und Cos-7-Zellen im Western Blot wurden 24 Stunden vor der Transfektion 2×10^6 CoSMC oder 1×10^6 COS-7-Zellen in 10 cm²-Schalen (Greiner) ausgesät. Zur Transfektion von CoSMC wurden 24 µl FuGENE6 und 4 µg DNA, zur Transfektion von COS-7-Zellen wurden 12 µl FuGENE6 und 4 µg DNA eingesetzt. Die Lyse der Zellen für die Proteinextraktion erfolgte 48 Stunden nach Aussaat der Zellen.

Die Durchführung der Transfektionen erfolgte nach Anleitung des Herstellers.

2.11.3 Luziferase-Assay

Optimale Transfektionsbedingungen mit dem Transfektionsreagenz FuGENE6 wurden mit Hilfe der gleichzeitigen Transfektion zweier Plasmide mit den Reportergenen kodierend für die Firefly und Renilla Luziferase mit dem Dual-Luciferase® Reporter Assay System (Promega) ermittelt. Generelles Prinzip der Luziferasen ist die Oxidation eines Substrats, wodurch Photonen emittiert werden, die im Luminometer gemessen werden können. Unterschiedliche Substrate der Luziferasen ermöglichen den Nachweis der beiden

Enzymaktivitäten innerhalb eines Versuchsansatzes. Nach transienter Transfektion der Zelllinien mit unterschiedlichen Verhältnissen von Transfektionsreagenz zur eingesetzten Menge DNA wurden diese nach 24 h Inkubation (37°C, 5% CO₂) geerntet. Nach vollständigem Entfernen des Mediums wurden die Zellen auf der Platte in Lysepuffer (1 x Passive Lysis Buffer, Promega) auf einem Schwenker für 20 min inkubiert. Die Lysate wurden in Reaktionsgefäße überführt und 30 sek bei 14.000 rpm zentrifugiert. Zur Analyse der Expression der Firefly-Luziferase wurden 20 µl des Lysatüberstandes in ein Luminometer-Röhrchen überführt und die Aktivität im LB 9507-Luminometer (EG&G Berthold) nach Injektion von 100 µl Luziferase Assay Reagent II (Promega) bestimmt. Die Injektion einer zweiten Substratlösung aktiviert die Renilla-Luziferase und unterdrückt gleichzeitig die Firefly-Aktivität. Bei der höchsten Expression der Firefly- und Renilla-Luziferase war das optimale Transfektionsreagenz:DNA Verhältnis ermittelt.

2.11.4 Kalzium Messungen

Der Kalziumeinstrom aus intrazellulären Speichern in die Zelle kann mit der Wellenlängenänderung eines kalziumchelatierenden Fluorophors gemessen werden.

1x10⁴ CoSMC (5x10³ Zellen für die transiente Transfektion) wurden pro Loch einer 96-Lochplatte mit klarsichtigem Boden (µclear 96-Loch Platte, Greiner) ausgesät. Nach 24 h Inkubation im Brutschrank (37°C, 5% CO₂) wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen. 100 µl SmGM Medium (FCS (5%), Insulin (5 mg/l), hFGF-B (0,5 µg/l), Gentamicin (50 mg/l), Amphotericin-B (50 µg/l), hEGF (0,5 µg/l)) und 100 µl des Fluorophorreagenz mit einem kalziumsensitiven Fluoreszenzfarbstoff (Fluo-3-AM, FLIPR® Calcium assay kit, Molecular Devices) wurde auf die Zellen gegeben und diese für eine Stunde im Brutschrank inkubiert. Die Messung erfolgte im Fluoreszenzmessgerät FLUOstar Optima (BMG Labtechnologies) mit einem Exzitationsfilter mit 485 nm und einem Emissionsfilter mit 520 nm, wobei die Fluoreszenzänderung von der Unterseite der Platte detektiert wurde.

5 Minuten vor der Messung einer Zellpopulation wurde zu den Zellen 50 µl einer in bidestilliertem Wasser gelösten Substanz oder eine Wasserkontrolle zugegeben. 20 Sekunden nach Beginn der Messung ermöglichten gerätinterne Injektoren die Injektion von den zu untersuchenden Substanzen. Diese Substanzen wurden ebenfalls in bidestilliertem Wasser gelöst. Nach einer Messung von insgesamt 120 Sekunden konnten die erhaltenen Messdaten ausgewertet werden. Da diese Methode an unserem Labor etabliert wurde, wird die Auswertung der Messdaten im Kapitel *Ergebnisse* unter Punkt 3.1.10 beschrieben.

2.12 Fluoreszenzmikroskopie

Um die intrazelluläre Lokalisation von ESP1/CRP2 nachzuweisen, wurden EGFP-ESP1/CRP2 Fusionsproteine generiert. Das Gen kodierend für EGFP wurde zum einen 5' *in frame* (im Leserahmen) mit der ESP1/CRP2 kodierenden Sequenz ohne ATG-Startkodon kloniert. Nach heterologer Expression wird ESP1/CRP2 als N-terminal fusioniertes Protein exprimiert. Zum anderen wurde das Gen kodierend für EGFP 3' *in frame* mit der ESP1/CRP2 kodierenden Sequenz ohne Stopkodon kloniert. Hierdurch wird ein C-terminal fusioniertes ESP1/CRP2 Protein exprimiert. $1,5 \times 10^5$ glatte Muskelzellen des Kolons wurden auf Glasplättchen in einer 6-Loch Zellkulturplatte ausgesät. Nach 24 h Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ wurden die auf den Plättchen angewachsenen Zellen für eine transiente Expression mit den EGFP-Expressionsplasmiden transfiziert. Bei 37°C und 5% CO₂ wurden die Zellen für 24 h inkubiert, das Medium abgenommen und einmal mit PBS gewaschen. Nach Zugabe von frischem Medium auf die Zellen folgte eine weitere Inkubation im Brutschrank für 10 min bei 37°C und 5% CO₂. Das Medium wurde abgenommen und auf die Zellen wurde eine Permeabilisierungslösung (0,2% Saponin in PBS) mit dem Farbstoff TOPRO™-3-Jodid (Endkonzentration 10 nM, Exzitation 633 nm, Emmission 650-770 nm; Firma Vectorlabs) zur Anfärbung der Zellkerne gegeben und 30 min lichtgeschützt bei Raumtemperatur inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Glasplättchen vorsichtig aus den 6-Loch Platten genommen und getrocknet. Die Plättchen wurden anschließend auf Objektträger gelegt und mit VectaShield (Vectorlabs) luftdicht versiegelt, um am Fluoreszenzmikroskop untersucht werden zu können.

3 ERGEBNISSE

3.1 IRAG

Schwerpunkt des ersten Teils dieser Arbeit war die funktionelle Charakterisierung des cGKI-Effektorproteins IRAG im humanen Gastrointestinaltrakt.

3.1.1 Identifizierung von humanen IRAG 5' und 3' mRNA Varianten

Das humane *IRAG* Gen umspannt eine Länge von annähernd 120.000 Nukleotiden (nt) mit 19 kodierenden Exons und 18 nichtkodierenden Intronsequenzen. Es wurde für humanes und bovines *IRAG* beschrieben, dass zwei alternative erste Exons zur Expression zweier verschiedener IRAG Proteinisoformen führen (Shaughnessy *et al.*, 1999, Schlossmann *et al.*, 2000).

Interessant war nun die Fragestellung, ob es weitere mRNA Varianten von IRAG gibt, die mittels 5' und 3' RACE-PCR Methode geklärt werden sollte.

Als Vorlage für die RACE-PCR diente RNA, die aus humanem Muskelgewebe des Magen, Pylorus und Sigma, sowie aus der Kolonkarzinomzelllinie SW480 und der Zervixkarzinomzelllinie HeLa isoliert wurde und mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben wurde. Es wurden die Bindungsstellen der Primer so gewählt, dass die RACE-PCR entweder von der cGKI Interaktionsstelle (B) oder der cGKI Phosphorylierungsstelle (P) an den Serinen 664 und 677 ausging (Abb. 2).

```

1 cctctgactt tgtaacaaa gccagagagc cggaggaaat gaaattccaa atgccctctc
61 ctagcctggt ttgacctccg gtggtgatgc aaactcaagc cggctctcac tgtggcttgt
121 ggctccgga a[atg]gaacc agcttgggac agggaatgga tttgacttgt ccttttggcg
181 tctccccagc ctgtggagcc caggcctctt ggagcatctt tggggctgac gcagcggagg
241 ttccggggcac acgtggccac tcccagcagg aggctgcc[at g]ccccacatt cccgaggagc
301 aggagcccc cggagagcca caggcagccc agagccctgc cggccaaacag ggtcctccta
361 ccgcaggagt atcttgagc ccaactccca cgattgtc[ct g]actggggat gccacttcac
421 cagaaggaga aaccgacaaa aacctggcca acagagttca cagtccccac aagaggcttt
481 ctcaccgaca cttgaagggtg tccactgctt ccttgacatc tgtggacccc gcggggcaca
541 tcattgacct ggtgaatgac cagctgccag acatcagcat ctcagaggag gacaagaaga

1. 3'-IRAG-B1
.....▶
3. 5'-IRAG-B3
◀.....
601 aaaacctggc gctgctggaa gaagccaagt tgggtgagtga gcgattcctg accgcctgtg
661 ggaggaagtc caggagcagc cccggagact ccccatcagc tgtttccccg aacctcagcc

```

2. 3'-IRAG-B2
▶

2. 5'-IRAG-B2 1. 5'-IRAG-B1
 ◀──────────────────▶

721 ccagcgcttc tcctacatcc tctcggagca actcacttac agtccccacc cggccagaag
 781 gggatgaggc cgacgtctct tcacctcacc ctggcgagcc taacgtcccc aaagggctag
 841 ctgacaggaa gcagaatgac cagaggaaag tgtctcaggg caggctggct cctcgtcctc
 901 ctccagttga gaagtccaaa gagattgcaa tagaacaaaa ggaaaacttc gatcccctcc
 961 agtaccocga gaccacacc aaaggcctag ctctgttac aaacagcagt gggaaaatgg
 1021 ccctgaacag ccctcagcct gggcccgtgg agagcgagct ggggaagcag ctcttgaaaa
 1081 cgggtgga gggcagccct ctgccgagaa gtccaacca ggatgaggca ggagtgggtc
 1141 ccccgacctc ccaggggaga ggcccagctg gagagccgat ggggcccag gctggtcca
 1201 aagctgagct tccaccact gtgtcccggc ccccgtgct gcgagggtc tcctgggaca
 1261 gtggccctga agaactggc ccccggtgc agaaagtgt tgccaagtgc cactggcag
 1321 aggaagaaaa gcgttttgca ggcaaggccg gcggcaagct ggccaaggcc cctggtctca
 1381 aagactttca gatacaagt cagcccgtgc ggatgcagaa actgaccaag ctccgagagg
 1441 agcacatcct gatgagaaat cagaacttag tggggctcaa gcttcagac cttagtgaag
 1501 cagctgagca ggaaaaagg cttcctctgc aactctccc agctattgag gaagaagagt
 1561 caaagagtgg cttagatgac atgcctaata tttctgatgt gctgctgctc aaactgctgg
 1621 tccacaggag tctccctgga agtgcccctc cactcactga aaaggaagt gagaacgtgt
 1681 ttgtgcaact gtccctggc tttagaaatg acagctacac tctggaatct agaattaacc
 1741 aggctgaaag ggaacgcaac ctgacagagg agaactga gaaagaactg gaaaacttca
 1801 aagcttccat tacgtcctca gcttactct ggcaccactg tgagcaccgg gaaacctacc
 1861 agaagttgct ggaggacatc gctgtcctgc accgctggc tgcccgcctc tccagccgag
 1921 ctgaggtggt agggccctc cgccaggaaa agcgcagtgc gaaagcaacg gaagtgatga

3. 5'-IRAG-P3
 ◀──────────────────▶

1981 tgcaagtatg ggagaatcta aagaggacgt atgagaagga ccatgaggag ctcatggagt

1. 3'-IRAG-P1
▶

2041 ttaaaaagct tgcaaatcag aattcaagcc gcagctgtgg cccctctgaa gatggggctc

2. 3'-IRAG-P2
▶

2101 ctgcacggc acggtccatg tccctcacgc tgggaaagaa tatgcctcgc cggagggtca

2. 5'-IRAG-P2
 ◀──────────────────▶

1. 5'-IRAG-P3
 ◀──────────────────▶

2161 gcgttgctgt ggttcctaag tttaatgcc tgaatctgcc tggccaaact ccagctcat
 2221 catccattcc ctccctacca gccttgcgg aatcaccaa tgggaaaggc agcctacctg
 2281 tcaactcagc actgcctgca cttttgaaa atggaaagac aaatggggac ccagattgtg
 2341 aagcctctgc tcctgcgctg accctgagct gcctggagga gcttagtcag gagaccaagg
 2401 ccaggatgga ggaagaagcc tacagcaagg gattccaaga aggtctaaag aagaccaaaag
 2461 aacttcaaga cctgaaggag gaggaggaag aacagaagag tgagagtccct gaggaacctg
 2521 aagaggtaga agaaactgag gaagaggaag agggcccaag aagcagcaaa cttgaagaat


```

2581 tggccattt cttacaagtc atgtatccca aactgtgtca gcactggcaa gtgatctgga
2641 tgatggctgc agtgatgctg gtcttgactg ttgtgctggg gctctacaat tcctataact
2701 cttgtgcaga gcaggctgat gggccccttg gaagatccac ttgctcggca gccagaggg
2761 actcctggtg gagctcagga ctccagcatg agcagcctac agagcagtag gaaacctcac
2821 acctagccag tgcctgctc tgagacactc agactaccac ctttcccca agtataacgt
2881 caggcccaag tgtggacaca ctgccgcca tcccatcagg tcatgaggaa gggttctttt
2941 aacactcggc acttctgtgg gagctattca tacacagtga cttgatgttc ttggaggatc
3001 aacaaaactg ccctgggaaa gcatccagtg gatgaagaag tcaccttcac caaggaactc
3061 tattggaagg gaaggtctcc tgcccctagc tcaggtggct ggggagaact aaaacacctt
3121 cactggtggt tgggggtaag gagcggggca cgggggagga ggaggtaggg ggcagtaaaa
3181 aacttactct ctttttctc ctctgtaatt gggtatcagg aagaatttgc ttaatgacta
3241 acaccctaag catcagacct ggaatttga gttgcaaagt gactatcttc ccatttccca
3301 tctcattttc aataacttca gcctcccatt ctttccttg gaatgagagt ttctttttac
3361 agaagtagga aaggcttctc agaaaaaaaa aaaaaa

```

Abb. 2: Humane mRNA Sequenz für die IRAG Variante 1 mit den Bindungsstellen für die RACE-PCR-Primer. Dargestellt ist die komplette mRNA für humanes IRAG, Variante 1 (Accession Nummer NM_006069). Eingerahmt dargestellt sind der Translationsstart ATG an Nukleotid 132 (grün), das alternative ATG Translationsstartkodon an Nukleotid 279 (grün) und das Translationsstopkodon TAG an Nukleotid 2808 (rot). Das CTG an nt 399 ist das Translationsinitiationskodon in Exon 2 der Variante 2 und ist blau markiert (Accession Nummer NM_130385). Die Exons werden durch alternierend fett oder normal gedruckte Nukleotide voneinander abgesetzt. Die Bindungsstellen der genspezifischen Primer für die RACE-PCR sind mit Pfeilen hervorgehoben. Durchgehende Pfeile stehen für die 5' RACE-PCR Primer, gestrichelte Pfeile für die 3' RACE-PCR Primer. 5' und 3' Primer binden um die Region der cGKI Bindungsstelle (B, rot, unterstrichen) oder um die cGKI Phosphorylierungsstellen am Serin⁶⁶⁴ und Serin⁶⁷⁷ (A, rot, unterstrichen).

Die Amplifikate der RACE-PCR wurden in einem präparativen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt, isoliert, kloniert und sequenziert. Dabei konnten drei neue IRAG 5' mRNA Varianten identifiziert werden, deren Sequenzen im Anhang „IRAG 5' mRNA Varianten“ angefügt sind. Diese mRNA Varianten werden durch neu identifizierte erste Exons generiert. Die genomische Lokalisation dieser neu identifizierten ersten Exons liegt zwischen den bereits bekannten Exons 1a und 1b (Abb. 3). Dies war der Grund für eine Änderung der bestehenden Nomenklatur. Exon 1a behält seinen Namen und hat eine genomische Länge von 461 Nukleotiden. In enger genomischer Nachbarschaft, wenige Nukleotide 3' von Exon 1a liegt ein neu identifiziertes Exon mit einer Länge von 52 nt, das den Namen Exon 1b erhält. Das zweite neu entdeckte, circa 4.000 Nukleotide von Exon 1a entfernte Exon erhält den Namen 1c und ist 105 nt lang. Das ehemalige Exon 1b, das ungefähr 40.000 Nukleotide von Exon 1a entfernt und 356 nt lang ist, wird in Exon 1d umbenannt (Abb. 3). Die neu charakterisierten Exonsequenzen und die veränderte Nomenklatur wurden in die NCBI-Datenbank mit der Accession Nummer AM000024 eingegeben und sind ab Juni 2006 frei zugänglich (www.ncbi.nlm.nih.gov).

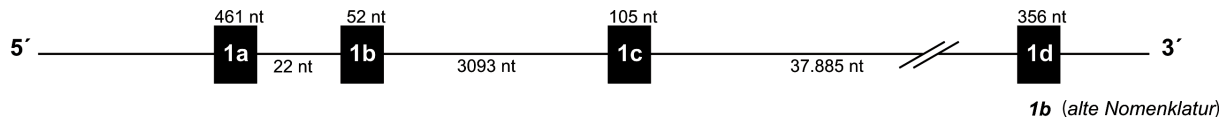


Abb. 3: Genomische Lage der ersten Exons des IRAG Gens. Dargestellt ist die genomische Verteilung der ersten Exons 1a, 1b, 1c und 1d des *IRAG* Gens. Exon 1a mit einer genomischen Länge von 461 Nukleotiden (nt) ist 22 nt vom neu identifiziertem Exon 1b, das 52 nt lang ist, entfernt. 3093 Nukleotide 3'abwärts gelegen ist das ebenfalls neu identifizierte Exon 1c mit einer Gesamtlänge von 105 nt. Die nicht maßstabsgetreue Entfernung von 37.855 nt von Exon 1c zu Exon 1d, das 356 nt lang ist, wurde mit Schrägbalken symbolisiert. Unter dem abgebildeten Exon 1d ist die alte Nomenklatur angegeben. Die Sequenzen der vier ersten Exons sind mit der Accession Nummer AM000024 in die NCBI-Datenbank eingegeben und ab Juni 2006 frei zugänglich (www.ncbi.nlm.nih.gov).

Alternative Promotoren, alternatives Spleißen von Exons und alternative Spleißdonor- und akzeptorstellen in der pre-mRNA führen zur Expression neun verschiedener IRAG mRNA Varianten (Abb. 4), wovon sechs bereits bekannt sind (Abb. 4A, 4B):

Die IRAG mRNA namens Variante 1a wird durch den Gebrauch des alternativen Promotors (P'') 5' aufwärts von Exon 1d generiert. (Abb. 4A). Eine alternative Spleißakzeptorstelle im 5' Bereich des Exon 2 führt zur Deletion einer 75 bp langen Sequenz und daher zur Expression der IRAG Variante 1b (= Exon 2').

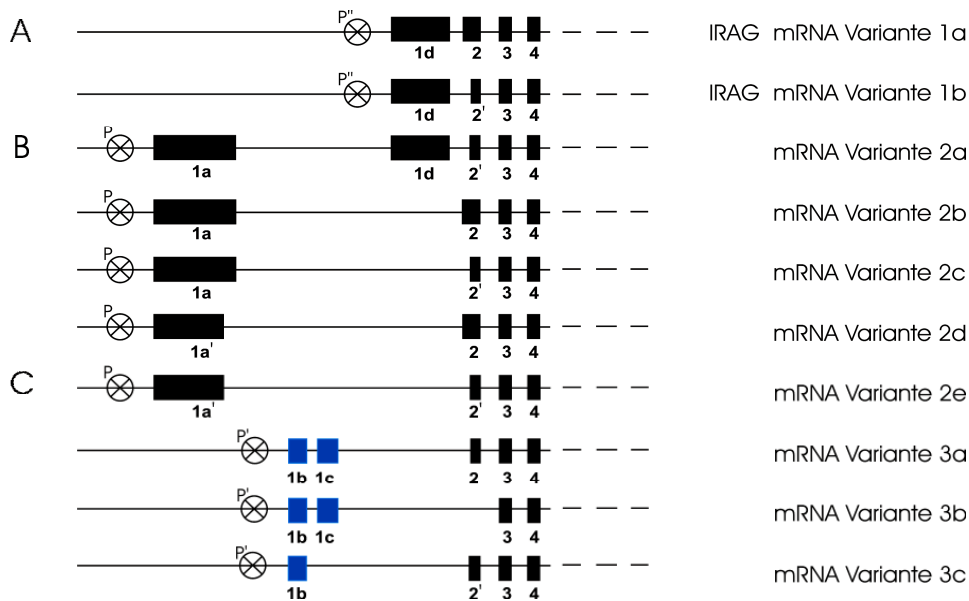


Abb. 4: IRAG 5' mRNA Varianten. **A.** Ein alternativer Promotor (P'') 5' *upstream* des Exon 1d führt zur Transkription der IRAG mRNA Variante 1 mit dem ersten Exon 1d. Exon 2 liegt – durch alternative Spleißstellen – in dieser Variante als verkürztes Exon 2' vor. **B.** Ein alternativer Promotor (P) führt zur Transkription der IRAG mRNA Variante 2. Alternatives Spleißen von Exon 1b, 1c und 1d sowie alternative Spleißdonor- und akzeptorstellen in Exon 1a (Deletion von 84 nt im 3' Bereich = Exon 1a'), 1d und 2 1a (Deletion von 75 nt im 5' Bereich = Exon 2a') führen zu den fünf mRNA Varianten 2a-e. **C.** IRAG mRNA Varianten 3 werden generiert durch den Gebrauch des alternativen Promotors P'. Alternatives Spleißen des Exons 1d und alternatives Spleißen der 75 nt langen Sequenz in Exon 2 führen zur Expression der IRAG mRNA Variante 3a. Deletieren der Exons 1d und 2 generiert die mRNA Variante 3a, Spleißen der Exons 1c und 1d und alternatives Spleißen der 75 nt langen Sequenz von Exon 2 aus der pre-mRNA führt zur Variante 3c. Exon 1b ist 52 nt, Exon 1c 105 nt lang. Die Exons sind in schwarz (bereits bekannte) und in blau (neu identifizierte) abgebildet.

Die Transkription der IRAG mRNA Variante namens Variante 2 wird von einem alternativen Promotor (P) 5' aufwärts von Exon 1a gestartet. Alternatives Spleißen sowie alternative Spleißdonor- und akzeptorstellen der pre-mRNA Variante 2 führen zur Expression von fünf unterschiedlichen mRNA Varianten: Alternatives Deletieren von Exon 1b und 1c führt zur IRAG mRNA Variante 2a. Alternatives Deletieren von Exon 1b und 1c sowie eine alternative Spleißakzeptorstelle im 5' Bereich des Exon 1a, die zum Deletieren einer 84 nt langen Sequenz führt (= Exon 1'), generiert die IRAG mRNA Variante 2b. Alternatives Deletieren von Exon 1b, Exon 1c, der 116 nt langen Sequenz von Exon 1a und der 75 nt langen Sequenz von Exon 2 führt zur IRAG mRNA Variante 2c. Die IRAG mRNA Variante 2d wird durch die Deletion der Exons 1b, 1c und 1d generiert. Die IRAG mRNA Variante 2e wird durch die Deletion der Exons 1b, 1c und 1d, sowie durch alternatives Spleißen der 84 nt langen Sequenz des Exon 1a und der 75 nt langen Sequenz des Exon 2 generiert (Abb. 4B).

Im Rahmen dieser Arbeit konnten in der 5' RACE-PCR-Methode drei weitere mRNA Varianten neu identifiziert werden: Diese erhalten den Namen IRAG mRNA Variante 3a, 3b und 3c, da deren gemeinsames erstes Exon das neu identifizierte Exon 1b ist, das weder in der IRAG mRNA Variante 1 noch in den IRAG mRNA Varianten 2 enthalten ist und eine genomische Gesamtlänge von 52 Nukleotiden hat. Die Transkription dieser Varianten 3 startet vermutlich von einem weiteren alternativen Promotor (P') 5' aufwärts von Exon 1b. Das zweite, neu identifizierte Exon 1c ist ebenfalls nicht in den mRNA Varianten 1 und 2 vorhanden. Dieses Exon hat eine genomische Länge von 105 Nukleotiden und ist in den mRNA Varianten 3a und 3b enthalten. Aus der mRNA Variante 3c wurde dieses Exon sowie Exon 2 durch alternatives Spleißen deletiert (Abb. 4C).

In der 3' RACE-PCR konnten vier alternativ gespleißte interne IRAG Varianten identifiziert werden, die durch alternatives Inserieren und Deletieren von Exons generiert und IRAG α , β , γ und δ benannt werden. IRAG α enthält ein neu identifiziertes Exon, das zwischen Exon 5 und Exon 6 der bisher bekannten IRAG Varianten gelegen ist, daher Exon 5a genannt wird und eine Nukleotidlänge von 53 hat (Abb. 5B). Dieses Exon 5a wurde in allen untersuchten mRNA Sequenzen nachgewiesen. Vergleichende Analysen dieses Exons gegen eine EST-Datenbank (expressed sequence tag) bestätigt die Existenz dieses Exons innerhalb der kodierenden Sequenz für humanes IRAG: Eine Sequenz mit der Accession Nummer AK127209.1 beinhaltet die Exons 5, 5a, 6 und 7. Humanes IRAG wird demnach unter anderem kodiert von einer mRNA Sequenz, die Exon 5a inseriert hat (Abb. 5B).

Die zweite mRNA Variante, die den Namen IRAG β erhält, stellt eine trunkierte mRNA Variante von IRAG dar und besteht von 5' nach 3' aus den Exons 5, dem neu identifizierten Exon 5a, Exon 8 und einem ebenfalls neu identifizierten Exon, das aufgrund seiner Lokalisation in den bisher bekannten mRNA Varianten zwischen Exon 8 und Exon 9 den Namen Exon 8a bekommt. Die mRNA Variante endet mit diesem Exon, das eine Gesamtlänge von 667 nt hat (Abb. 5C). Dieses Exon ist in keiner EST-Datenbank vorhanden.

Die dritte mRNA Variante erhält den Namen IRAG γ und besteht von 5' nach 3' aus Exon 5, 5a, 6, 7, 8 und dem letzten Exon 8a (Abb. 5D). Die vierte mRNA Variante, die den Namen IRAG δ bekommt, wird definiert durch die Exons 5, 5a, 6, sowie einem 3' verkürztem Exon 7 (= Exon 7'), das durch eine alternative Spleißdonorsequenz generiert wird. Hierdurch kommt es zur Deletion von 520 nt von Exon 7. Das verkürzte Exon 7' wird an ein neu identifiziertes, 614 nt langes Exon gespleißt. Dieses Exon erhält wegen seiner am weitesten 3' gelegenen genomischen Lage die Nummer 20 (Abb. 5E). Dieses Exon konnte ebenfalls in einigen EST-Sequenzen gefunden werden und die EST-Sequenz mit der Accession Nummer AA669696.1 enthält dieses Exon mit einem 3' gelegenes Polyadenylierungssignal.

Die Sequenzen der Varianten IRAG α , IRAG β , IRAG γ und IRAG δ sind im Anhang „IRAG 3' mRNA Varianten“ zu finden und ab Juni 2006 unter der Accession Nummer AM000024 online verfügbar (www.ncbi.nlm.nih.gov).

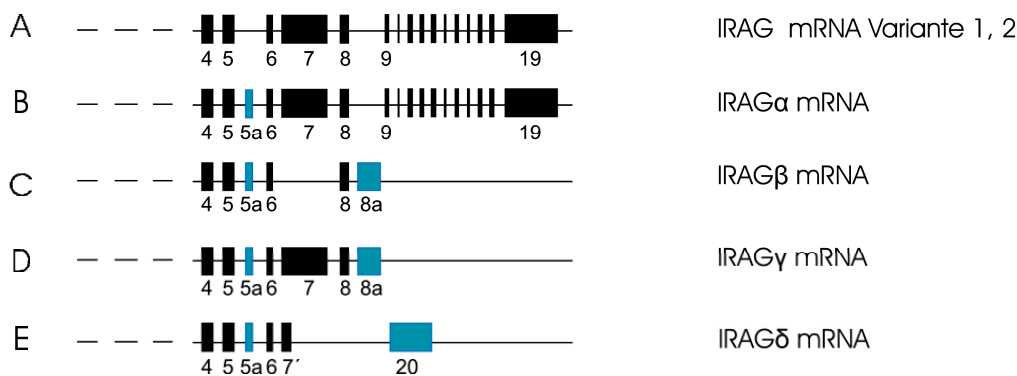


Abb. 5: IRAG 3' mRNA Varianten. **A.** IRAG mRNA der Varianten 1 und 2 von Exon 4 bis einschließlich dem letzten Exon 19. **B.** IRAG α mRNA: Exon 5a ist zwischen Exon 5 und Exon 6 in die bisher bekannte mRNA der Varianten 1 und 2 inseriert. **C.** IRAG β mit der neu identifizierten alternativ gespleißten Exonabfolge 4, 5, 5a, 6, 8, 8a. **D.** Variante IRAG γ mit den Exons 4, 5, 5a, 6, 7, 8, 8a. **E.** IRAG δ mRNA: Diese Variante wird durch die Exons 4, 5, 5a, 6, 7', 20 festgelegt. Exon 7' ist um 520 nt deletiert und 98 nt lang. Exon 5a ist 53 nt, Exon 8a 667 nt und Exon 20 ist 614 nt lang. Schwarz stellen die bekannten Exons, blau die neu identifizierten Exons dar. Die Sequenzen sind unter der Accession Nummer AM000024 ab Juni 2006 verfügbar (www.ncbi.nlm.nih.gov).

Zusammenfassend ist in Abbildung 6 die genomische Organisation von humanem IRAG graphisch dargestellt. Das Gen hat eine Größe von 120.906 Nukleotiden, besteht aus 25 kodierenden Exonsequenzen und 23 nichtkodierenden Intronsequenzen und befindet sich auf dem kurzen Arm von Chromosom 11 (11p15). Exon 1d und Exon 19 kodieren für eine Transmembrandomäne (TMD), Exon 4 für die cGKI Bindungsstelle (B) und Exon 14 für die cGKI Phosphorylierungsstelle (P). Eine coiled coil Domäne wird von den Exons 10 bis 13 kodiert, die die Interaktion mit dem IP₃R vermittelt. Die in der RACE-PCR identifizierten Exons erhielten die Namen 1b, 1c, 5a, 8a und 20 und sind in der Abbildung blau hervorgehoben. Konservierte Spleißdonor- und akzeptorstellen mit der Konsensussequenz GT/AG der bekannten und neu identifizierten Exons sind im Anhang „Genorganisation IRAG“ in der Sequenz markiert.

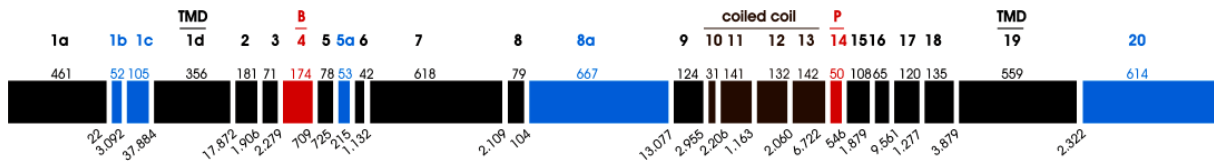


Abb. 6: Genorganisation von humanem IRAG. Die Darstellung zeigt die genomische Exonverteilung auf dem kurzen Arm von Chromosom 11 (Chr. 11p15). Schwarz ausgefüllte Exonstrukturen sind die bereits bekannten, die blauen stellen die neu identifizierten Exons 1b, 1c, 5a, 8a und 20 dar. Zwei Transmembrandomänen (TMD) werden kodiert von den Exons 1d und 19. Exon 4 (rot) kodiert für die cGKI Interaktionsstelle (B) und Exon 14 (rot) für die cGKI Phosphorylierungsregion (P) von IRAG. Eine coiled coil Domäne, die die Interaktion mit dem IP₃R vermittelt, wird durch die Exons 10, 11, 12 und 13 kodiert. Die genomische Gesamtlänge beträgt 120.906 nt. Die Länge der Exonsequenzen sind überhalb, die Länge der Introns unterhalb der dargestellten Exons angegeben. Die Längen der Exons und Introns sind in Nukleotiden (nt) angegeben.

3.1.2 5' IRAG mRNA Varianten kodieren für aminoternale Isoformen

Die neun bekannten 5' mRNA Varianten werden durch den unterschiedlichen Gebrauch von verschiedenen Promotoren und alternativem Spleißen generiert. Die Translation der mRNA Varianten 1a und 1b führt zur Expression zweier IRAG Isoformen, Isoform 1a und 1b: Ein ATG Translationsstartkodon an Nukleotid 132 startet die Translation der Isoform 1a, ein alternatives ATG Translationsstartkodon an Nukleotid 279 dagegen die Translation der Isoform 1b. In der Aminosäuresequenz der 130 kDa Isoform 1a befindet sich eine konservierte Transmembrandomänenstruktur (TMD), die nicht mehr in der Sequenz der 125 kDa Isoform 1b enthalten ist. In beiden Proteinen vorhanden ist die durch Exon 4 kodierte Bindungsstelle (B) bzw. Interaktionsstelle für die cGKI, eine coiled coil Domäne kodiert durch die Exons 10–13, die Phosphorylierungsstelle (P) für die cGKI an Serin 664 und 677 kodiert durch Exon 14 und eine carboxyterminale TMD kodiert durch Exon 19 (Abb. 7A). Die Berechnung des Molekulargewichts für die Isoform 1a ergab ein errechnetes Gewicht von 96,93 kDa, für die Isoform 1b wurde ein Gewicht von 92,03 kDa errechnet. Der Unterschied zwischen dem tatsächlichen Molekulargewicht der IRAG Isoformen 1a und 1b und dem errechnetem Molekulargewicht könnte durch posttranslationelle Modifikationen, wie beispielsweise Glykosilierungen, verursacht werden.

Die mRNA Varianten 2a–e führen zur Translation eines einzigen IRAG Proteins namens Isoform 2a. Da ein CTG Translationsstartkodon in Exon 2 aller mRNA Varianten 2a–e lokalisiert ist, betrifft alternatives Spleißen ausschließlich die 5' UTR und nicht den offenen Leserahmen der Varianten. Diese Proteinisoform besitzt die cGKI Interaktionsstelle, die cGKI Phosphorylierungsstelle, die coiled coil Domäne und die C-terminale TMD (Abb. 7B). Mit Hilfe der Online-Software auf der Internetseite www.bioinformatics.org wurde ein Molekulargewicht von 88,05 kDa errechnet.

Die Proteinisoformen IRAG 3a, 3b und 3c, die durch die neu identifizierten mRNA Varianten 3a, 3b und 3c kodiert werden, sind in Abbildung 7C dargestellt. Diese IRAG mRNA Varianten wurden mittels computergestützter Analyse auf den offenen Leserahmen

hin untersucht (www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html). Diese Analyse ergab, dass verschiedene Translationsstartkodons zur Initiation der Translation verwendet werden können: Die IRAG mRNA Variante 3a enthält ein CTG Translationsinitiationskodon in Exon 1c an Nukleotid 146 (s. Anhang „IRAG 5′ mRNA Varianten“) und ein *in frame* (im Leserahmen) lokalisiertes TAG Translationsstopkodon in Exon 19 an Nukleotid 2663. Die Aminosäuresequenz der translatierten Proteinisoform 3a setzt sich aus vier Aminosäuren kodiert durch Exon 1c und der Aminosäuresequenz kodiert durch Exon 2 bis Exon 19 zusammen. Das Molekulargewicht wurde mit der Online-Software (www.bioinformatics.org) errechnet und die Auswertung ergab ein Gewicht von 89,91 kDa. (Abb. 7C).

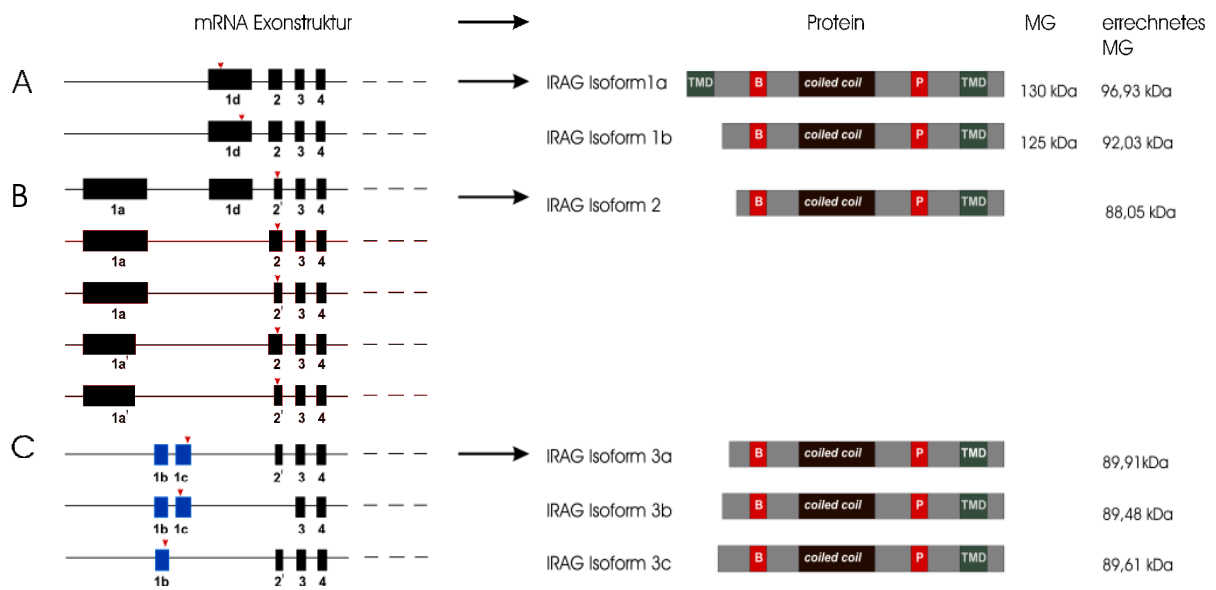


Abb. 7: IRAG 5′mRNA Varianten kodieren für diverse N-terminale Proteinprodukte. **A.** Exon 1d kodiert durch alternative Translationsinitiationskodons für die aminoterminalen IRAG Isoformen 1a und 1b mit einem tatsächlichen Molekulargewicht von 130 kDa für die Isoform 1a und 125 kDa für die Isoform 1b. **B.** Alternatives Spleißen der mRNA kodierend für Isoform 2 findet ausschließlich in der 5′UTR des Gens statt. Das CTG in Exon 2 führt daher zur Translation eines einzigen Proteinprodukts Isoform 2 mit einem errechneten Molekulargewicht von 88,05 kDa (www.bioinformatics.org). **C.** Durch die 5′ RACE-PCR neu charakterisierte 5′ mRNA Varianten IRAG 3a, 3b und 3c. Kombiniert mit dem 3′ Bereich der Variante 1a sind nach computergestützter Aminosäuretranslation die denkbaren Proteinisofomen 3a, 3b und 3c erarbeitet worden. Mit Hilfe einer Online-Software (www.bioinformatics.org) wurden die Molekulargewichte 89,91 kDa, 89,48 kDa und 89,61 kDa errechnet. Für die IRAG Isoformen 1a und 1b errechneten sich mit dieser Software die Molekulargewichte von 96,93 kDa und 92,03 kDa. Unterschiede zwischen tatsächlichem und errechnetem Molekulargewicht werden möglicherweise durch posttranslationelle Modifikationen verursacht. Die Translationsstartkodons sind mit roten Pfeilen über den Exons dargestellt, schwarze Exons sind bereits bekannte, blau dargestellte Exons sind neu identifizierte.

In der mRNA Variante 3b ist ein CTG Translationsstartkodon ebenfalls in Exon 1c, jedoch weiter 5′ gelegen an Nukleotid 66. Das TAG Translationsstopkodon ist an Nukleotid 2559. Exon 1c kodiert 31 Aminosäuren gefolgt von den Aminosäuren, die durch die Exons 3 bis 19 kodiert werden. Das berechnete Molekulargewicht dieser IRAG Isoform ist 89,48 kDa (Abb. 7C). Die dritte, neu charakterisierte mRNA Variante enthält ein CTG Translationsstartkodon in Exon 1b. Der offene Leserahmen hat bei dieser Variante eine Länge von 2584 nt und das errechnete Molekulargewicht beträgt 89,61 kDa (Abb. 7C). Keine der putativen

Proteinisoformen hat eine Transmembrandomäne in ihrem N-Terminus, die durch Exon 1d kodiert wird. Die ausgearbeiteten Aminosäuresequenzen auf Grundlage der neu identifizierten 5' mRNA Sequenzen sind im Anhang zu finden („IRAG 5' mRNA Varianten“).

3.1.3 Nachweis der 5' IRAG mRNA Varianten im humanen Gastrointestinaltrakt

cDNA des Oesophagus, Magen, Pylorus, Duodenum, Kolon, Sigma und Rektum, der humanen glatten Kolonmuskelzelllinie CoSMC und der Kolonkarzinomzelllinie SW480 wurde mit strangspezifischen Primern für Exon 1a, 1b, 1c, 1d und einem gemeinsamen gegenstrangspezifischen Primer für Exon 5a mittels PCR amplifiziert, um die Expression der 5' mRNA Varianten im den Abschnitten des GIT nachzuweisen (Abb. 8).

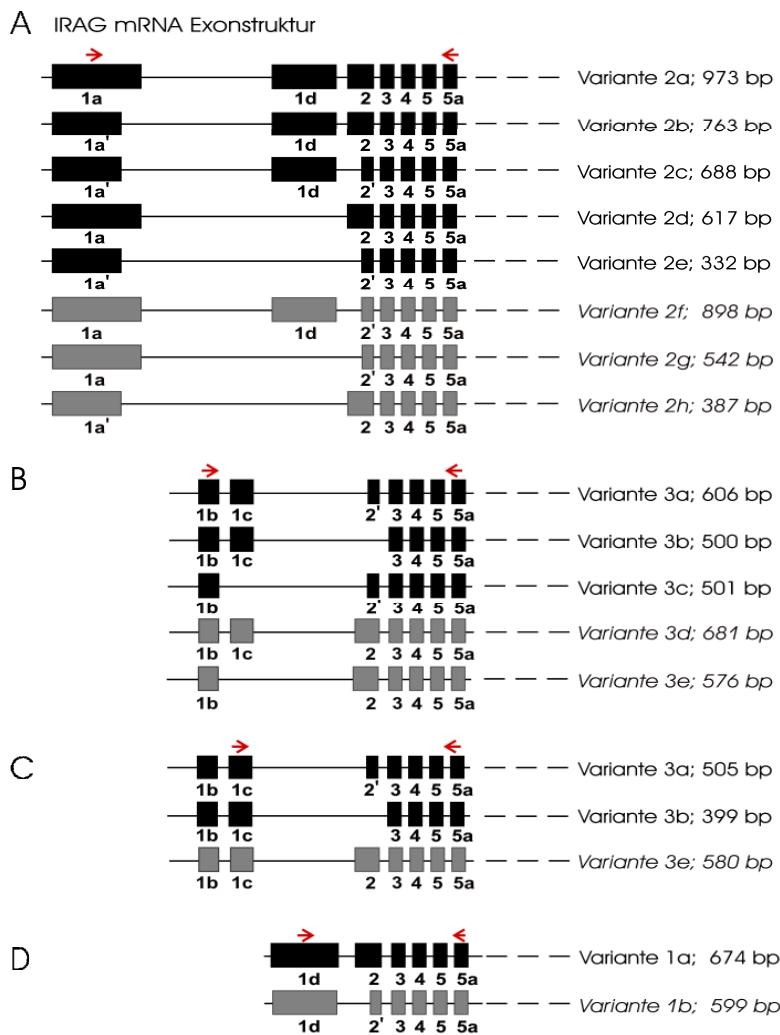


Abb. 8: Primerbindungsstellen in den identifizierten (schwarz) und möglichen (grau) IRAG 5' mRNA Varianten mit in der PCR erwarteten Amplifikatlängen. A. Exon 1a-Strang- und Exon 5a-Gegenstrangbindung der Primer in den 5' mRNA Varianten 2. Die erwarteten Größen der PCR-Produkte sind 973 bp für die mRNA Variante 2a, 736 bp für 2b, 688 bp für 2c, 617 bp für 2d und 332 bp für 2e. Die möglichen mRNA Varianten 2f, 2g, 2h würden in der PCR mit einer Länge von 898 bp, 542 bp und 387 bp amplifiziert. **B.** Exon 1b- und Exon 5a-Primerbindung in den Varianten 3a-c. Ist die mRNA Variante 3a vorhanden, wird ein PCR-Produkt von 606bp Länge amplifiziert. Variante 3b kann mit 500 bp, Variante 3c mit 501 bp nachgewiesen werden. Die möglichen Varianten 3d und 3e würden mit 681 bp und 576 bp amplifiziert. **C.** Exon 1c- und Exon 5a-Primerbindung in den Varianten 3a und 3b. Die Expression von mRNA mit inseriertem Exon 1c in der Variante 3a kann mit einem PCR-Produkt von 505 bp, in der Variante 3b mit einem PCR-

Produkt von 399 bp nachgewiesen werden. Die denkbare mRNA Variante 3e würde mit diesem Primerpaar mit einer Amplifikatlänge von 580 bp nachgewiesen werden können. **D.** Exon 1d- und Exon 5a-Primerbindung in der Variante 1a. Die Amplifikatlänge beträgt 674 bp. Die mögliche Variante 1b würde mit 599 bp amplifiziert. Die Primer sind in rot dargestellt und zeigen die Bindung innerhalb der Exons an die Strang-cDNA (Pfeil nach rechts) und die Bindung an die Gegenstrang-cDNA (Pfeil nach links).

Folgende PCR-Produkte wurden detektiert und sind in Abbildung 9 gezeigt: **1.) Exon 1a-Exon 5a PCR:** a.) Die IRAG mRNA Variante 2a konnte mit einer Länge von 973 bp nur in Kolongewebe nachgewiesen werden. b.) Die IRAG Variante 2b konnte mit einer Amplifikatlänge von 763 bp in Pylorus, Kolon, Rektum, CoSMC und SW480-Zellen nachgewiesen werden. c.) Die mRNA Variante 2c ist mit einer Länge von 688 bp in allen untersuchten Geweben und Zelllinien außer in Duodenum enthalten. d.) Ein PCR-Produkt mit einer Länge von 617 bp, das der mRNA Variante 2d entspricht, konnte in Oesophagus, Magen und CoSMC nachgewiesen werden. e.) In Sigma und SW480-Zellen konnte eine schwache Expression der Variante 2e mit einer PCR-Produktlänge von 332 bp gezeigt werden. f.) Die denkbare Expression von Variante 2f konnte in Magen, Pylorus, Kolon, Sigma und CoSMC und SW480-Zellen mit einer Amplifikatlänge von 332 bp verifiziert werden. g.) Ebenfalls konnte die Expression der möglichen Variante 2g mit 542 bp in allen untersuchten Geweben und Zelllinien außer in Duodenum detektiert werden. h.) Auch die denkbare mRNA Variante 2h konnte in Pylorusgewebe, in Kolongewebe und in SW480-Zellen mit 387 bp Amplifikatlänge nachgewiesen werden. **2.) Exon 1b-Exon 5a PCR:** a.) Ein 606 bp-langes PCR-Produkt, das der Variante 3a entspricht, wurde in Oesophagus, Magen, Pylorus, Kolon und CoSMC detektiert. b.) Ein PCR-Produkt einer Größe von etwa 500 bp konnte in allen untersuchten Gewebsabschnitten sowie CoSMC und SW480-Zellen nachgewiesen werden. Hier kann es sich sowohl um die mRNA Variante 3b mit 500 bp erwarteter Fragmentlänge als auch um c.) die Variante 3c mit einer erwarteten Länge von 501 bp handeln. d.) Die denkbare Variante 3d kann mit 681 bp in Oesophagus, Magen, Pylorus, Kolon und SW480-Zellen nachgewiesen werden. e.) Auch die Expression der vermuteten Variante 3e konnte in der PCR mit einem Produkt von 576 bp gezeigt werden. Diese Variante wird in Oesophagus, Magen, Pylorus, Kolon sowie in CoSCM exprimiert. **3.)** Da keine mRNA Varianten in der RACE-PCR identifiziert wurden, die ausschließlich Exon 1c enthalten, sollte eine PCR spezifisch für Exon 1c die Existenz dieses Exons validieren: a.) Ein PCR-Produkt von 505 bp, das Variante 3a entspricht, wird in allen untersuchten cDNAs amplifiziert. b.) Auch die Expression der Variante 3b konnte in der PCR mit einer Länge von 399 bp in allen Gewebsabschnitten und Zelllinien mit dem Primer spezifisch für Exon 1c nachgewiesen werden. c.) Die schon in der PCR mit dem Strangprimer spezifisch für Exon 1b nachgewiesene Variante 3e wurde ebenso mit dem Exon 1c-Strangprimer in den Geweben Oesophagus, Magen, Pylorus, Kolon und der Zelllinie CoSMC nachgewiesen. **4.)** Die mRNA Variante 1a wurden in allen Geweben und Zelllinien mit einer Amplifikatlänge von 674 bp nachgewiesen. Interessanterweise ist ein etwa 400 bp-langes PCR-Produkt im Kolon zu detektieren. Hier kann es sich allerdings nicht um die denkbare Variante 1b handeln, da bei dieser eine errechnete Amplifikatlänge von 599 bp zu erwarten ist. Daher könnte es sich bei der 400 bp-langen DNA und auch bei den unbekanntem DNA-Banden in den Exon 1a-, 1b- und 1c-PCRs um weitere mRNA Varianten mit intern deletierten und / oder inserierten Exons handeln.

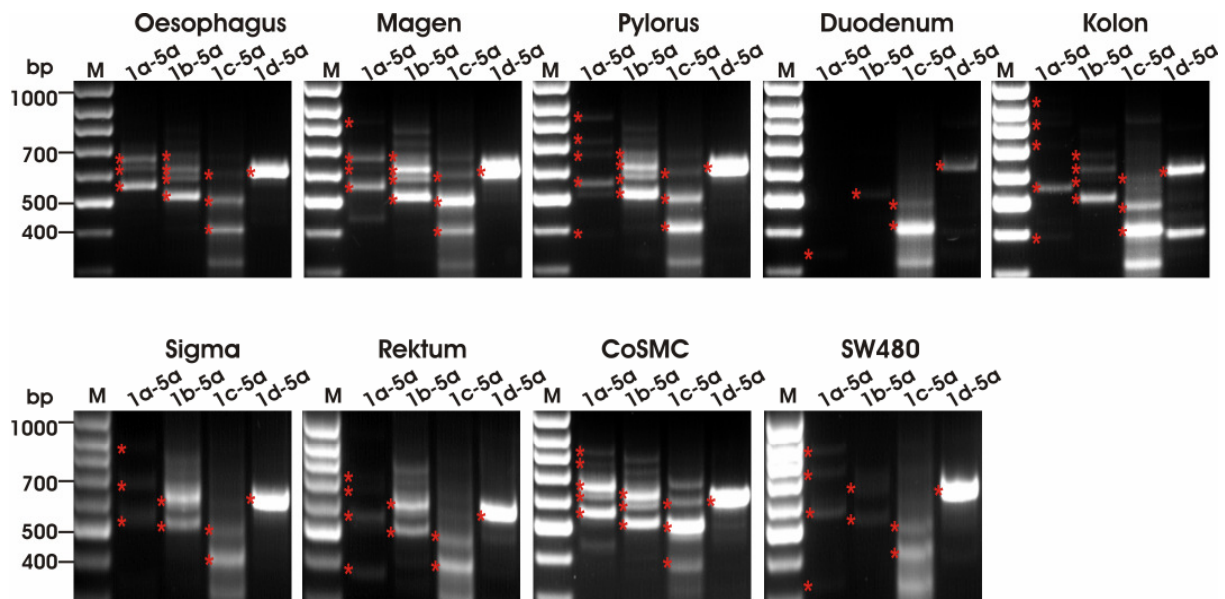


Abb 9: PCR zum Nachweis der IRAG 5' mRNA Varianten in Muskelgewebe des humanen Gastrointestinaltrakts, in glatten Muskelzellen des Kolons (CoSMC) und in der Kolonkarzinomzelllinie SW480. Muskelgewebe ohne Mukosa von diversen Abschnitten des Gastrointestinaltrakts, CoSMC und SW480-Zellen wurden mittels PCR auf die Expression der 5' mRNA Varianten hin untersucht. Die Abbildungen zeigen jeweils in der ersten Spur den DNA-Marker (M). **Spur 2:** Exon 1a-Exon 5a-spezifische PCR. Erwartete Fragmentlängen der bereits bekannten Varianten 2a-e: 973 bp, 763 bp, 688 bp, 617 bp und 332 bp. Die Amplifikatlänge der möglichen Varianten 2f, 2g, 2h ist: 898 bp, 542 bp und 387 bp. **Spur 3:** Exon 1b-Exon 5a-spezifische PCR. Erwartete Fragmentlängen der bereits identifizierten Varianten 3a, 3b, 3c: 608 bp, 500 bp, 501 bp. Erwartete fragmentlänge der möglichen Varianten 3d und 3e: 505 bp und 756 bp. **Spur 4:** Exon 1c-Exon 5a-spezifische PCR zur Validierung der Expression des Exon 1c. Erwartete Fragmentlängen der bisher bekannten Varianten 3a und 3b mit inseriertem Exon 1c: 505 bp, 399 bp. Fragmentlänge der denkbaren Variante 3e: 580 bp. **Spur 5:** Exon 1d-Exon 5a-spezifische PCR. Erwartete Fragmentlänge der bereits bekannten Variante 1a: 674 bp. Fragmentlänge der möglichen Variante 1b: 599 bp. Die DNA-Banden der bekannten als auch denkbaren Varianten sind mit einem roten Stern markiert.

3.1.4 3' IRAG mRNA Varianten kodieren für carboxyterminale Proteinisoformen

Mittels 3' RACE-PCR wurden die 3' mRNA Varianten IRAG α , IRAG β , IRAG γ und IRAG δ in SW480-Zellen identifiziert.

Die putativen Proteinisoformen wurden mittels computergestützter Sequenzanalyse erarbeitet und sind in Abbildung 10 dargestellt. Hierfür wurde den 3' mRNA Sequenzen der RACE-PCR der 5' mRNA Bereich der Variante 1 angehängt und die Sequenzen auf den offenen Leserahmen hin untersucht (www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html). In Exon 8a und Exon 20 konnten Translationsstopkodons identifiziert werden. Die Ergebnisse der Aminosäuresequenzbestimmung sind im Anhang dieser Arbeit zu finden („IRAG 3' mRNA Varianten“). In der Proteinisoform IRAG α enthalten sind die aminoternale Transmembrandomäne kodiert durch Exon 1d, die durch das Exon 4 kodierte Bindungsstelle für die cGKI (B), die coiled coil Domäne kodiert durch die Exons 10-13, die Phosphorylierungsstelle für die cGKI (P) an den Serinen 664 und 677 kodiert durch Exon 14

und eine carboxyterminale TMD kodiert durch Exon 19. Das alternativ inserierte Exon 5a kodiert für eine Aminosäurestruktur, die die Interaktionsstelle für die cGKI flankiert. Das errechnete Molekulargewicht von IRAG α beträgt 99,36 kDa (www.bioinformatics.org) (Abb.10A).

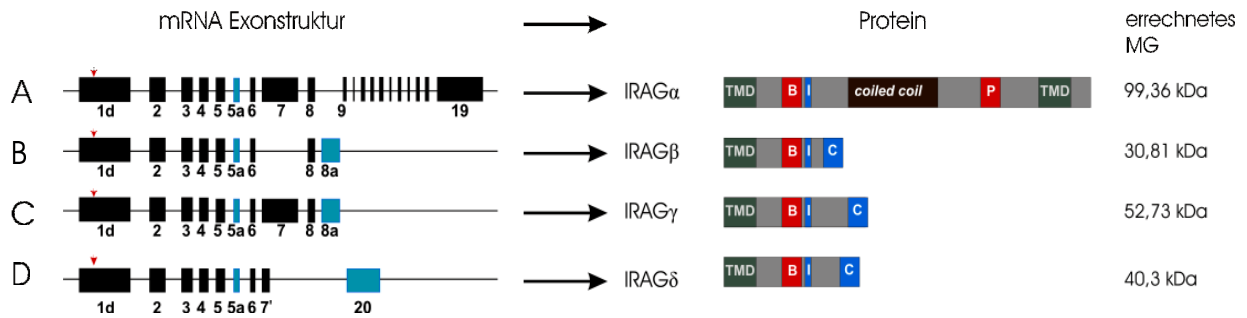


Abb. 10: IRAG 3'mRNA Varianten kodieren für vier carboxyterminale Proteinprodukte. Das inserierte Exon 5a ist in allen vier mRNA Varianten enthalten. In der Proteinstruktur kodiert Exon 5a für einen inserierten Bereich (I), der die durch das Exon 4 kodierte Domäne (B) flankiert, die die Bindung mit der cGKI vermittelt. A-D. Die mRNA Sequenzen kodieren für die putativen Proteinprodukte IRAG α , IRAG β , IRAG γ und IRAG δ . IRAG α hat ein errechnetes Molekulargewicht von 99,36 kDa. Eine N- und C-terminale Transmembrandomäne, die cGKI Interaktionsstelle, die IP₃R Interaktionsstelle innerhalb der coiled coil Domäne, sowie die cGKI Phosphorylierungsstelle (P) sind in der Proteinstruktur enthalten. Die berechneten Molekulargewichte für die Isoformen IRAG β , γ und δ sind 30,81 kDa, 52,73 kDa und 40,3 kDa. Diesen Isoformen fehlen die durch das Exon 14 kodierte Phosphorylierungsstelle für die cGKI (P), die durch Exon 10-13 kodierte Interaktionsstelle mit dem IP₃Rezeptor und die C-terminale Transmembrandomäne (TMD). Die neu identifizierten Exons 8a und 20 bilden den C-Terminus (C) dieser Isoformen.

Das putative Proteinprodukt der mRNA von IRAG β kodiert für ein Protein, dem sowohl IP₃Rezeptorinteraktionsstelle, die Phosphorylierungsstelle für die cGKI und die carboxyterminale Transmembrandomäne fehlen. Das errechnete Molekulargewicht ist 30.81 kDa (Abb. 10B). IRAG γ führt nach Computerauswertung zu einem Proteinprodukt mit einem errechneten Molekulargewicht von 52.73 kDa (Abb. 10C), die Sequenz von IRAG δ kodiert für ein 40.3 kDa großes Protein (Abb. 10D) (www.bioinformatics.org). Auch diesen Proteinen fehlen die IP₃Rezeptorinteraktionsstelle, die cGKI Phosphorylierungsstelle und die carboxyterminale Transmembrandomäne. Das errechnete Molekulargewicht stimmt bei allen Varianten nicht mit dem tatsächlichen Molekulargewicht von IRAG α , β , γ und δ überein. In transienten Expressionsversuchen zeigte sich ein Molekulargewicht von 125 kDa, 50 kDa, 75 kDa und 55 kDa für IRAG β , γ und δ (siehe Abschnitt 3.1.8). Der Unterschied zwischen errechnetem und tatsächlichem Molekulargewicht könnte durch posttranslationelle Modifikationen, wie beispielsweise Glykosilierungen, verursacht werden.

3.1.5 Nachweis der 3' IRAG mRNA Varianten im humanen Gastrointestinaltrakt

Die Untersuchung der Expression der 3' mRNA Varianten mittels PCR an cDNA der gastrointestinalen muskulären Gewebsabschnitte wurde mit unterschiedlichen Primerkombinationen durchgeführt, deren Bindungsstellen in der mRNA der IRAG Varianten in Abbildung 11 dargestellt sind.

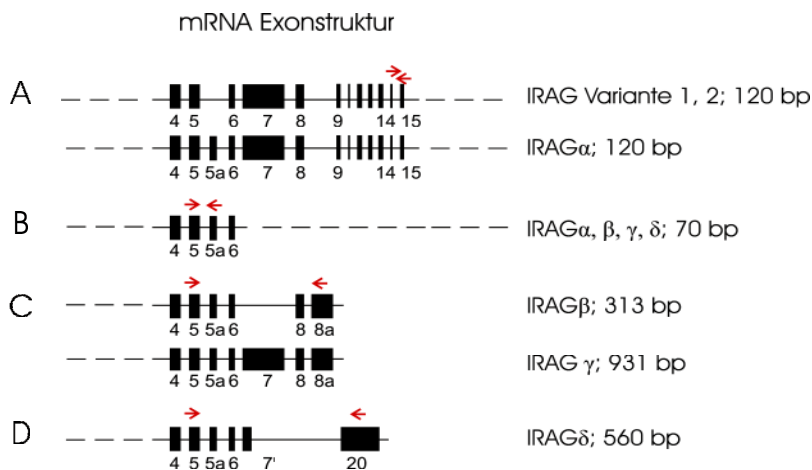


Abb. 11: Primerbindungsstellen in den IRAG mRNA Varianten mit in der PCR erwarteten Amplifikatlängen. **A.** Exon 14- und Exon 15-Primerbindung in den IRAG mRNA Varianten 1, 2 und IRAG α . Die erwartete Fragmentlänge des PCR-Produkts ist 120 bp. **B.** Primerbindung im Exon 5 und Exon 5a, das in IRAG α , β , γ und δ identifiziert wurde. Eine Sequenz von 70 bp wird mit diesen Primern amplifiziert. **C.** Die mRNA von IRAG β und IRAG γ wird mit einer PCR mit Exon 5- und Exon 8a-spezifischen Primern amplifiziert und ein 313 bp langes PCR-Produkt ist zu erwarten, wenn die Primer IRAG β mRNA amplifizieren. 931 bp werden ausgehend von IRAG γ mRNA amplifiziert. **D.** Eine PCR mit spezifischen Primern für Exon 5 und Exon 20 amplifiziert die IRAG δ mRNA mit einer Länge von 560 bp. Die Primer sind rot dargestellt und zeigen die Bindung innerhalb der Exons an die Strang-cDNA (Pfeil nach rechts) und die Bindung an die Gegenstrang-cDNA (Pfeil nach links).

Die PCR lieferte folgende Ergebnisse, die in Abbildung 12 gezeigt sind: Die mRNA, die für die bereits bekannten IRAG Varianten 1 und 2 als auch für die IRAG α Variante kodieren, wurde zur Kontrolle mit Primern gegen Exon 14 und Exon 15 in den verschiedenen Gewebsabschnitten, CoSMC und SW480 amplifiziert (Abb. 12; Exon 14-15 PCR). In allen untersuchten Proben konnte ein PCR-Produkt nachgewiesen werden.

Ein Primer strangspezifisch für Exon 5 und ein Primer gegenstrangspezifisch für Exon 5a amplifizierten in allen Abschnitten des GIT eine DNA-Sequenz mit einer Größe von 70 bp (Abb. 12; Exon 5-5a PCR). Primer, die die Sequenz von Exon 5 bis einschließlich dem neu identifizierten Exon 8a umspannen, amplifizierten drei unterschiedlich große DNA Fragmente: Ein 313 bp, ein 931 bp und ein etwa 1.000 bp langes DNA Fragment. Das 313 bp Fragment entspricht der mRNA für IRAG β und ist in Oesophagusmuskelgewebe, in der Kolonmuskellinie CoSMC und der Kolonkarzinomzelllinie SW480 zu detektieren. Ein etwas größeres PCR-Produkt mit 931 bp ist das Amplifikat der mRNA für IRAG γ und wird in Oesophagus, Magen, Pylorus, Kolon, CoSMC und SW480-Zellen und zu einem geringeren Anteil in Rektum amplifiziert.

In Duodenum sowie in Sigma ist kein Signal auf dieser Höhe zu beobachten. Die etwas höher im Agarosegel laufende, circa 1.000 bp große DNA-Bande in Magen, Pylorus, Kolon und Sigma könnte ein weiteres inseriertes ca. 70 bp langes Exon darstellen und wird in zukünftigen Versuchen untersucht werden (Abb. 12; Exon 5-8a).

Die δ -Isoform wurde mit spezifischen Primern nachgewiesen, die die Region von Exon 5 bis Exon 20 umspannen. Das erwartete 560 bp-Produkt wird in allen Geweben und Zelllinien, bis auf Magen, Kolon und Rektum, mit unterschiedlicher Stärke amplifiziert. Mit Exon 14-Exon 15 spezifischen Primern als Kontrolle wurde eine Sequenz amplifiziert, die in allen Geweben und Zellen vorkommt. Um die Ergebnisse von John Shaugnessy von 1999 zu validieren, die

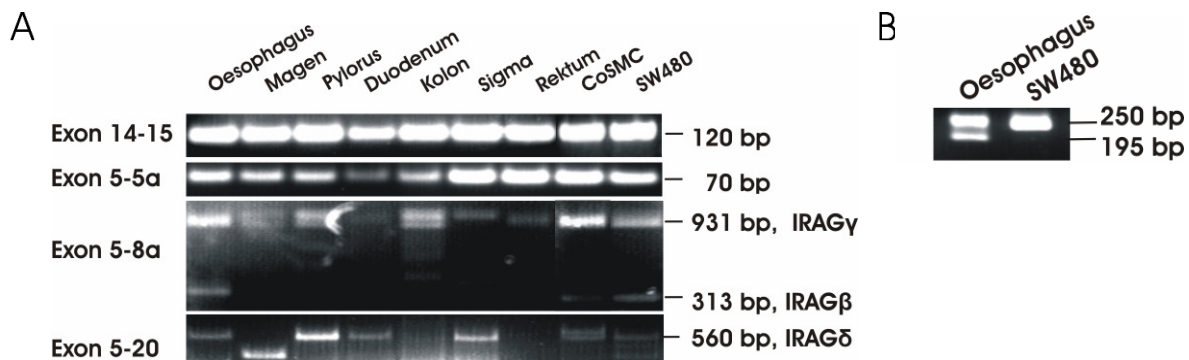


Abb. 12: PCR zum Nachweis der IRAG 3' mRNA Varianten im Muskelgewebe des humanen Gastrointestinaltrakts. **A.** Die IRAG mRNA Varianten 1, 2 und IRAG α wurden in einer Exon 14-Exon 15 spezifischen PCR mit einer Amplifikatlänge von 120 bp (Exon 14-15) nachgewiesen. Das Exon 5-Exon 5a Amplifikat mit 70 bp ist in allen Geweben vorhanden und validiert die Existenz von Exon 5a (Exon 5-5a). IRAG β (313 bp) und IRAG γ (931 bp) mRNA wurde mit spezifischen Primern für Exon 5 und Exon 8a (5-8a) nachgewiesen. In der unten abgebildeten PCR (Exon 5-20) wurde mit für die Exons 5 und 20 spezifischen Primern die mRNA für IRAG δ mit einer Amplifikatlänge von 560 bp nachgewiesen. **B.** Eine PCR mit Primern spezifisch für Exon 4 und Exon 6 amplifizieren eine DNA mit einer Länge von 195 bp und 250 bp. Im 195 bp PCR-Produkt, das ausschließlich in Oesophagus nachgewiesen werden kann, ist Exon 5a nicht enthalten. Im 250 bp Amplifikat dagegen ist Exon 5a inseriert und konnte in Oesophagus und SW480-Zellen nachgewiesen werden.

die mRNA Sequenz kodierend für Mrvi1a und Mrvi1b ohne inseriertem Exon 5a publizierten, wurde in einer PCR untersucht, ob diese mRNA auch in gastrointestinalem Gewebe exprimiert wird. Dazu wurde eine PCR mit Exon 4-strang- und Exon 6-gegenstrangspezifischen Primern an cDNA von Muskelgewebe aus Oesophagus und SW480-Zellen durchgeführt. In Oesophagus wird neben einer Bande von 250 bp, die der Exon 5a inserierten Sequenz entspricht, eine Bande bei 195 bp detektiert, die der Exon 5a deletierten Sequenz entspricht. In SW480-Zellen wird ausschließlich mRNA exprimiert, die inseriertes Exon 5a enthält (Abb. 12B).

3.1.6 Organ- und gewebsspezifische IRAG mRNA-Expression

Mittels Echt-Zeit-RT-PCR wurde die Expression von IRAG mRNA in diversen humanen Geweben quantifiziert. Die eingesetzten Primer mit strangspezifischer Bindung in Exon 4 und

gegenstrangspezifischer Bindung in Exon 5 umspannen ein Intron und die Sequenz, die für die Interaktionsstelle von IRAG mit der cGKI kodiert. Da Exon 4 und Exon 5 in allen detektierten IRAG mRNA Varianten vorkommt, kann mit Hilfe dieser PCR die IRAG Gesamt-RNA Expression quantifiziert werden. Zur Quantifizierung wurde eine Plasmidverdünnungsreihe generiert. Das Plasmid, das zur Verdünnung eingesetzt wurde, enthält sowohl das Exon 4-Exon 5 Amplifikat, als auch ein Exon 14-Exon 15-Amplifikat als Insertion und kann daher zur Quantifizierung von Exon 4/5 und Exon 14/15 eingesetzt werden. Ein direkter Vergleich der Expressionsniveaus von Exon 4/5 und Exon 14/15 ist dadurch möglich.

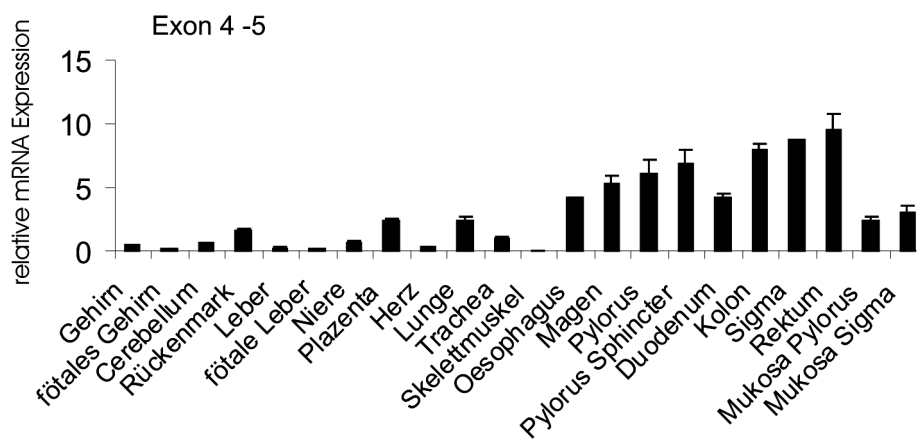


Abb. 13: Relative IRAG-Exon 4-Exon 5 mRNA Expression in humanen Geweben. Aus humanen Geweben isolierte mRNA wurde nach cDNA Synthese für die Echt-Zeit-RT-PCR mit IRAG-spezifischen Primern und einer spezifischen Sonde eingesetzt. Die Bindungssequenzen der Primer liegen in Exon 4 und Exon 5. Da Exon 4 und Exon 5 in allen bisher bekannten mRNA Varianten vorkommt, kann hierdurch die IRAG Gesamt mRNA Expression quantifiziert werden. Normalisiert wurden die gewonnenen Daten der quantitativen Expression von IRAG auf die quantitative Expression von GAPDH (Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase). Die Daten stellen Mittelwerte und Standardabweichungen aus Triplikaten aus zwei unabhängigen Experimenten dar.

Die Berechnung der vorhandenen Menge IRAG mRNA erfolgte durch die Software Sequence Detection System Version 1.9.1. Normalisiert wurden die Daten gegen die quantitative Expression des Haushaltsgens Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH), dessen Expression ebenfalls mit Hilfe einer Plasmidverdünnungsreihe ermittelt wurde. Verglichen mit den nichtgastrointestinalen Geweben, wie Gehirn, Leber, Niere, Plazenta wird im muskulären Anteil des Gastrointestinaltrakts IRAG mRNA um das circa 5-fache höher exprimiert. Die untersuchte Mukosa von Pylorus und Sigma zeigt, wie erwartet, eine geringere Expression der mRNA als im muskulären Anteil. Wie schon in den PCR-Ergebnissen mit Primern gegen die Exon 5-Exon 5a-umspannende Region ist die Expression in Duodenum die geringste verglichen mit den restlichen Abschnitten des GIT (Abb. 13).

Eine quantitative Echt-Zeit-RT-PCR an denselben Geweben wurde mit einem Primerpaar gegen Exon 14 und Exon 15 ausgeführt. Zur Quantifizierung wurde dieselbe Plasmidverdünnungsreihe eingesetzt wie für die Quantifizierung von Exon 4-5. Mit den Exon 14-15 spezifischen Primern werden nur cDNAs amplifiziert, die für die Varianten IRAG 1,

IRAG 2 und IRAG α kodieren, dagegen werden die trunkierten 3' mRNA Varianten IRAG β , IRAG γ und IRAG δ , die in ihrer mRNA Exon 14 und Exon 15 nicht enthalten, nicht detektiert (Abb. 14).

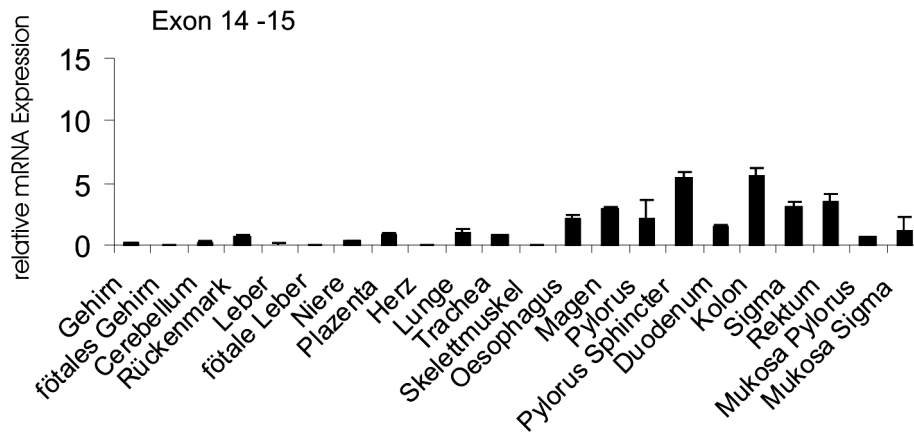


Abb. 14: Relative IRAG-Exon 14-Exon 15 mRNA Expression in humanen Geweben. Exon 14 und Exon 15 cDNA-bindende Primer wurden in der Echt-Zeit-RT-PCR zur Quantifizierung der IRAG mRNA Varianten 1, 2 und IRAG α eingesetzt. Normalisiert wurden die gewonnenen Daten der quantitativen Expression von IRAG auf die quantitative Expression von GAPDH (Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase). Die Daten stellen Mittelwerte und Standardabweichungen aus Triplikaten aus zwei unabhängigen Experimenten dar.

Der relative Anteil von IRAG Varianten mit voller Länge (IRAG 1, 2 und IRAG α) an der IRAG Gesamt mRNA Expression kann bestimmt werden, indem die mRNA Expression von Exon 14-15 durch die Gesamt mRNA Expression (Exon 4-5) dividiert wird. Hierbei zeigt sich, dass IRAG volle Länge mRNA Varianten je nach Gewebe 20-80% der Gesamtexpression ausmachen (Abb. 15).

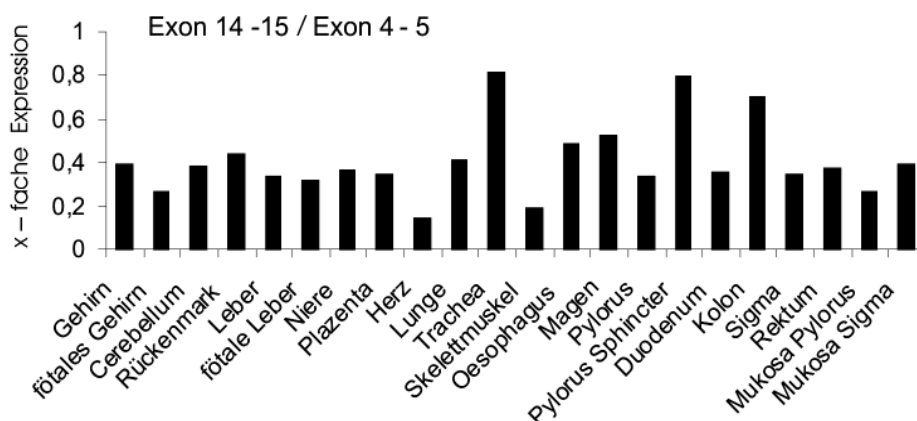


Abb. 15. Anteil der IRAG mRNA Varianten mit voller Länge (1, 2 und IRAG α) an der IRAG Gesamt mRNA Expression. Die quantitative Expression von Exon 14-15 wurde durch die Expression von Exon 4-5 dividiert. Exon 14-15 kommt nur in IRAG Varianten mit voller Länge (IRAG 1, 2 und α) vor und kodiert für die Phosphorylierungsstelle der cGKI. Die quantitative Expression von Exon 4-5 dagegen entspricht der IRAG mRNA Gesamtexpression, da Exon 4-5 in allen bekannten mRNA Varianten vorkommt.

3.1.7 Klonierung von IRAG mRNA Varianten in eukaryotische Expressionsplasmide

Die offenen Leserahmen für IRAG α , β , γ und δ wurden folgendermaßen generiert: 1.) IRAG α : Die gesamtkodierende Sequenz für IRAG α konnte nicht mit einer PCR-Reaktion amplifiziert werden. Daher wurden zwei unabhängige PCRs mit Überlappung in Exon 11, in dem eine *Xba*I-Restriktionsschnittstelle vorhanden ist, durchgeführt. Die erhaltenen Amplifikate wurden mit *Xba*I geschnitten, ligiert und in den Klonierungsvektor pENTR_D_TOPO_verA subkloniert. Die gesamte IRAG α mRNA beginnt mit dem Startkodon in Exon 1d und endet mit dem Stopkodon in Exon 19. Eine in der PCR angefügte Kozak Konsensussequenz G/ANNATGG flankiert das ATG Startkodon. 2.) IRAG β -, γ - und δ wurden mittels PCR anhand der Plasmide der RACE-PCR generiert. Der Strangprimer wurde für alle drei mRNA Varianten spezifisch für Exon 5 gewählt, die Gegenstrangprimer binden um die Sequenz, in denen die Stopkodons der jeweiligen Varianten enthalten sind. Die Amplifikate wurden in den pENTR_D_TOPO_verA subkloniert. Eine *Aat*II-Schnittstelle in Exon 6 und eine Schnittstelle in der 3' multiplen Klonierungsstelle des Vektors wurden gewählt, um die 3' Sequenz von IRAG β -, γ - und δ an die 5' der *Aat*II-Restriktionsschnittstelle gelegenen Sequenz von IRAG α zu ligieren. Mittels einer Rekombinasereaktion wurden die kodierenden Sequenzen der vier Varianten in den eukaryotischen Expressionsvektor pcDNA3.1/V5-DEST als N-terminales V5-Fusionsprotein kloniert. Die V5-Fusion an die Proteinisoformen diente zum Detektieren mit einem V5-Epitop-spezifischen Antikörper. Das Molekulargewicht der Varianten wird durch das V5-Epitop um etwa 5 kDa erhöht.

3.1.8 Immunologischer Nachweis von rekombinanten IRAG Varianten in CoSMC und COS-7-Zellen

Nach transients Transfektion der Expressionsplasmide in CoSMC und COS-7-Zellen wurde die Expression der einzelnen Proteinisoformen immunologisch im Western Blot mit einem polyklonalen, im Hasen gewonnenen Antikörper gegen das gesamte IRAG Protein untersucht. Der Antikörper wurde freundlicherweise von Dr. Jens Schlossmann vom Institut für Pharmakologie und Toxikologie, TUM, zur Verfügung gestellt (Abb. 16A).

50 μ g Gesamtprotein der transient transfizierten Zellen CoSMC, nicht transfizierter CoSMC und COS-7-Zellen, sowie glatte Kolonmuskulatur als Positivkontrolle wurden untersucht. COS-7-Zellen, die endogen kein IRAG exprimieren, dienten als Negativkontrolle. In Kolonmuskelgewebe und CoSMC ist IRAG auf Höhe von 125 kDa zu detektieren. Rekombinantes IRAG α läuft ebenfalls bei etwa 125 kDa. Die trunkierten Proteinisoformen haben im SDS-PAGE-Gel ein Molekulargewicht von etwa 55 kDa (IRAG β) von 80 kDa (IRAG γ) und von 60 kDa (IRAG δ). Nach Abzug des Molekulargewichts des fusionierten V5-Epitops von ungefähr 5 kDa sind die rekombinanten Isoformen etwa 50 kDa, 75 kDa und 55 kDa groß. Die errechneten Molekulargewichte für diese Varianten α , β , γ und δ sind mit 99,36

kDa, 30,81 kDa, 52,73 kDa und 40,3 kDa deutlich geringer, als das Laufverhalten der Proteine im SDS-PAGE-Gel. Posttranslationelle Modifikationen, z.B. N-Glykosilierungen, könnten diesen Größenunterschied erklären.

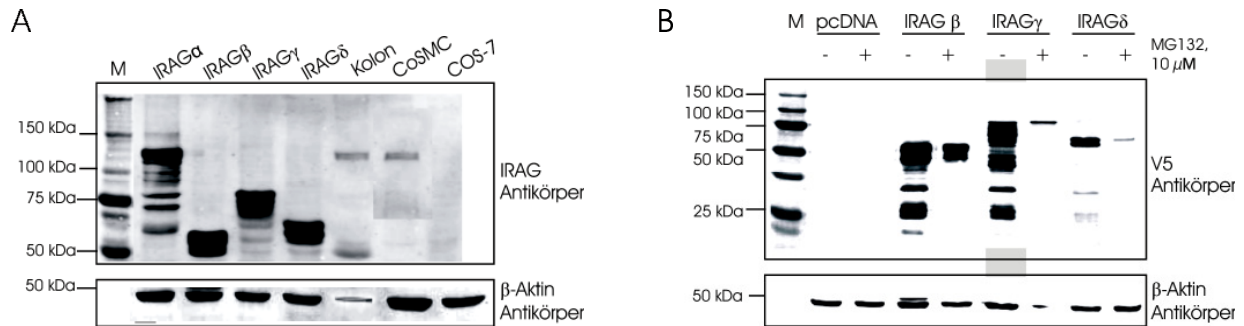


Abb. 16. Immunologischer Nachweis rekombinanter IRAG Isoformen. A. Transient, in CoSMC exprimierte IRAG-Isoformen α , β , γ und δ wurden mit einem polyklonalen, IRAG-spezifischem Antikörper detektiert. 50 μ g Gesamtprotein wurde pro Spur aufgetragen. Als Ladekontrolle diente β -Aktin. B. Der Abbau der Proteine IRAG β , γ und δ kann in COS-7 transfizierten Zellen durch den Proteasomeninhibitor MG132 (10 μ M) inhibiert werden. 25 μ g Gesamtprotein wurde pro Spur aufgetragen. Detektiert wurde mit einem V5-Epitop-spezifischen Antikörper. Molekulargewicht: V5-Epitop: 5 kDa; β -Aktin: 48 kDa.

In Kolongewebe ist ebenfalls eine Bande bei 50 kDa detektierbar. Diese Bande läuft auf der gleichen Höhe wie rekombinantes IRAG β und entspricht daher der endogenen IRAG β Isoform.

Die in Abb. 16 abgebildeten zahlreichen kleineren Banden in CoSMC und COS-7-Zellen sind vermutlich proteasomal abgebaute IRAG Proteine, da der Abbau durch Inkubation von COS-7-Zellen mit dem Proteasomeninhibitor MG132 inhibiert werden konnte (Abb. 16B).

3.1.9 Immunologischer Nachweis von IRAG

Der immunologische Nachweis von endogenem IRAG erfolgte im Western Blot mit einem polyklonalen IRAG-spezifischen Antikörper. Humane gastrointestinale, mukosafreie Muskelgewebe des Oesophagus, Magen, Kolon und Sigma wurden homogenisiert und mittels Western Blot analysiert. SW480-Zellen und CoSMC dienen als Positivkontrolle und COS-7-Zellen, die endogen kein IRAG exprimieren, als Negativkontrolle (Abb. 17).

In Magen, Kolon und Sigma ist eine Bande auf Höhe von etwa 125 kDa detektierbar, die den volle Länge IRAG Varianten IRAG 1b und IRAG α entsprechen. Schwach exprimiert wird diese IRAG Proteinisoform in SW480-Zellen und CoSMC, obwohl das Gel jeweils mit der gleichen Menge Gesamtprotein (200 μ g) beladen wurde. Ein Signal auf Höhe von ungefähr 80 kDa ist in Sigmagewebe zu detektieren. In diesem Gewebe ist eine sehr schwache etwas tiefer laufende Bande auf circa 75 kDa nachzuweisen, hierbei handelt es sich um IRAG γ , das bei Expression in CoSMC und COS-7-Zellen bei 80 kDa läuft. In allen Geweben konnte mit

sehr hoher Expression ein etwa 55 kDa großes Protein detektiert werden, das IRAG δ entspricht. Nach Überexpression in CoSMC und COS-7-Zellen wurde dieses Protein bei 60 kDa im PAGE-Gel nachgewiesen. In Oesophagus, Magen, Kolon und Sigma ist schwach eine etwas kleinere Bande bei ungefähr 50 kDa zu detektieren. Diese entspricht IRAG β , das nach Überexpression als V5-fusioniertes Protein in CoSMC und COS-7-Zellen bei circa 55 kDa läuft.

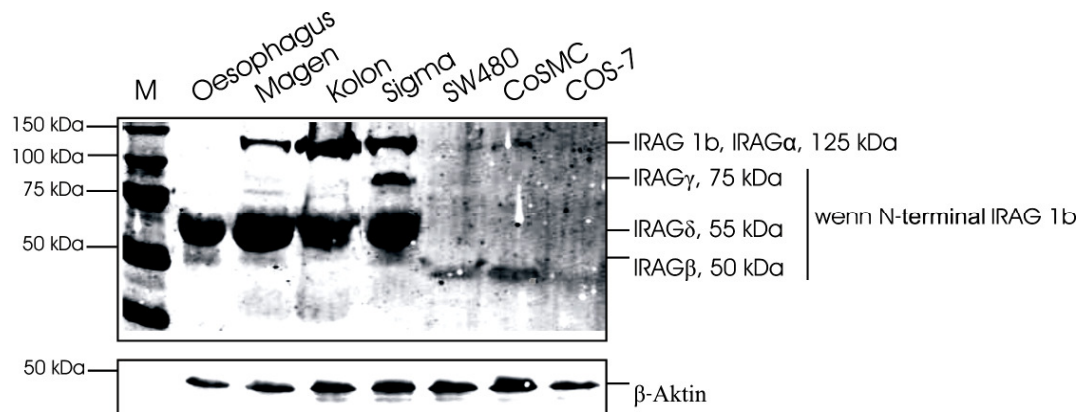


Abb. 17. Endogener Nachweis von IRAG. IRAG aus 200 μ g Gesamtprotein des muskulären Anteils von Oesophagus, Magen, Kolon und Sigma, sowie der Zelllinien SW480, CoSMC und COS-7 wurde im Western Blot mit einem IRAG-spezifischen Antikörper nachgewiesen. IRAG 1b und IRAG α haben ein Molekulargewicht von 125 kDa. IRAG β hat ein Molekulargewicht von 50 kDa, IRAG γ 75 kDa und IRAG δ 55 kDa, wenn diese Isoformen den N-terminalen Bereich der IRAG Isoform 1b enthalten. Molekulargewicht β -Aktin: 48 kDa.

3.1.10 Einfluss der C-terminalen IRAG Isoformen auf die Kalziumregulation

In den folgenden Experimenten sollte der Einfluss der C-terminalen IRAG Proteinisoformen auf hormoninduzierte Kalziumtransienten in glatten Muskelzellen des Kolons untersucht werden. Eine denkbare Funktion dieser Isoformen könnte ein dominant negativer Effekt auf die Funktionalität der volle Länge IRAG Proteine sein.

In dieser Arbeit wurde eine Methode zur Bestimmung der intrazellulären Kalziumkonzentration von CoSMC etabliert. Hierbei handelt es sich um die Detektion eines intrazellulären kalziumsensitiven Fluoreszenzfarbstoffs (Fluo-3-AM) in einer gesamten Zellpopulation. Die Detektion erfolgt mit einem Fluorometer (FLUOstar Optima, BMG Labtechnologies) (Abb. 18). Proportional zu einer steigenden intrazellulären Kalziumkonzentration erhöht sich die Fluoreszenzintensität, die am Fluorometer gemessen werden kann. Das Fluorometer verfügt über einen intern gelegenen Raum für eine 96-Loch Zellkulturplatte mit einer konstanten Temperatur von 37°C, so dass unter physiologischen Bedingungen gearbeitet werden kann. Das Gerät enthält zwei gerätinterne Injektoren, die die zeitlich definierte Injektion von zwei verschiedenen Substanzen während der Messung gewährleistet. Während der gesamten Dauer einer Messung (120 sek) detektiert eine an der

Unterseite der Zellkulturplatte gelegene Optik die Änderungen der Fluoreszenzintensität einer Zellpopulation. Die gemessenen Daten werden anschließend an einen mit dem Fluorometer verbundenen Computer übermittelt und können dann ausgewertet werden.

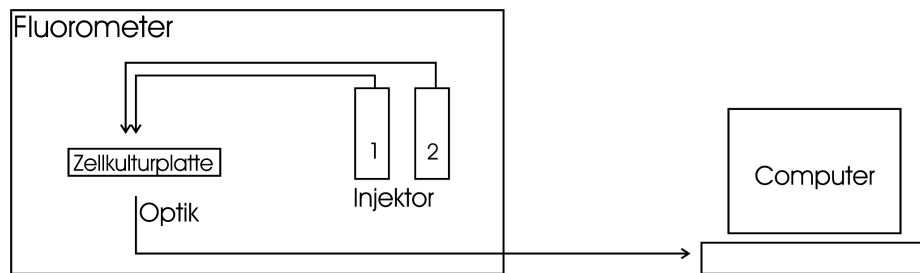


Abb. 18. Fluorometer zur Detektion eines kalziumsensitiven Fluorophors (Fluo-3-AM). Das Fluorometer FLUOstar Optima der Firma BMG Labtechnologies verfügt über zwei integrierte Injektoren (1, 2), eine Optik, einen Raum für eine 96-Loch Zellkulturplatte, sowie eine Verbindung zu einem Computer zur Übertragung der erhaltenen Messdaten. Der Raum für die Zellkulturplatte bietet mit einer konstanten Temperatur von 37°C physiologische Bedingungen. Während einer Messung erfolgt die in der dazugehörigen Software zeitlich definierte Injektion von zu untersuchenden Substanzen mit Hilfe der gerätinternen Injektoren. Ein intrazellulärer, kalziumsensitiver Fluoreszenzfarbstoff (Fluo-3-AM) dient zur Bestimmung der intrazellulären Kalziumkonzentration. Die Änderungen der Fluoreszenzintensität einer Zellpopulation werden von einer Optik gemessen, die sich auf der Unterseite der Zellkulturplatte befindet. Die gemessenen Daten werden an einen mit dem Fluorometer verbundenen Computer übertragen.

Die Auswertung der erhaltenen Messdaten soll hier an einem Beispiel gezeigt werden: Die Daten wurden anhand von Messungen der Fluoreszenzintensität von drei CoSMC Zellpopulationen gewonnen. Eine Messung dauerte 120 Sekunden und 20 Sekunden nach Beginn der Messung wurde auf die Zellen entweder in Wasser gelöstes Bradykinin (500 nM Endkonzentration) oder Wasser (H₂O) als Kontrolle injiziert. Die durchschnittlichen Fluoreszenzwerte aus drei Messungen mit bradykinin-stimulierten CoSMC ergeben einen Kurvenverlauf, der aus Basislinie vor dem Zeitpunkt der Injektion, signifikant ansteigender und anschließend langsam abfallender Kurve, die nach 120 sek das Niveau der Basislinie erreicht hat, besteht (Abb. 19A): Die Stimulation 20 Sekunden nach Beginn der Messung mit Bradykinin, ein Ligand für den G-Protein-gekoppelten B1/B2-Rezeptor, führt zum raschen IP₃-abhängigen Anstieg von intrazellulärem Kalzium mit einem maximalen Fluoreszenzwert bereits 3 Sekunden nach Injektion dieses Hormons. In der langsam sinkenden Fluoreszenzintensität spiegelt sich die aktive Wiederaufnahme des intrazellulären Kalziums in intrazelluläre Speicher und der aktive Transport von Kalzium aus der Zelle wieder.

Die Injektion von Wasser führt zu einem langsamen Anstieg in der Fluoreszenzintensität, deren Maximum 34 Sekunden nach Injektion erreicht ist. Die in der Abbildung dargestellte Kurve wurde ebenfalls nach Berechnung des Mittelwertes dreier Messungen erarbeitet (Abb. 19A). Die Berechnung der relativen Fluoreszenzintensität, also des hormoninduzierten Anstiegs der intrazellulären Kalziumkonzentration, wurde wie folgt durchgeführt: Der durchschnittliche Fluoreszenzwert der Basislinie von Bradykinin (11856) wurde von dem Maximalwert der Fluoreszenzintensität (14941) subtrahiert und man erhält den relativen Fluoreszenzintensitätswert von 3085. Für die Wasserkontrolle ergibt sich nach dieser

Berechnung (12165-11465) ein Anstieg in der Fluoreszenz von 700. Der relative Anstieg der Fluoreszenz Bradykinin-stimulierter CoSMC beträgt nach Abzug der Wasserkontrolle 2385 (Abb. 19B).

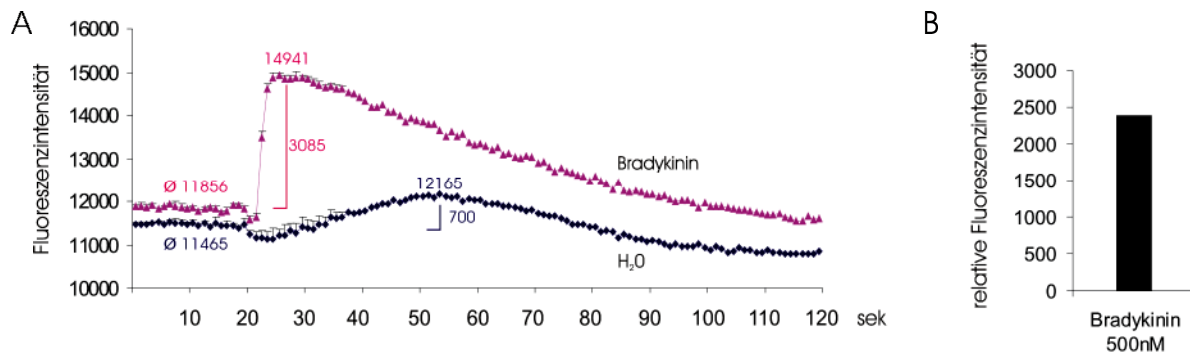


Abb. 19. Berechnungsbeispiel für den Anstieg der Fluoreszenzintensität bradykininstimulierter CoSMC. **A.** Je drei CoSMC Zellpopulationen einer 96-Loch Zellkulturplatte wurden mit Bradykinin (in Wasser verdünnt; 500 nM Endkonzentration) oder Wasser (H₂O) 20 sek nach Beginn der Messung stimuliert. Die durchschnittlichen Messdaten ergeben für bradykininstimulierte CoSMC einen Kurvenverlauf (rosa), der aus der Basislinie vor der Messung, einer signifikant ansteigenden Kurve, mit einem Maximalwert von 14941 bereits drei Sekunden nach Injektion, und anschließend langsamer fallender Kurve besteht. Die Kontrollkurve (H₂O-stimulierte CoSMC, blau), zeigt einen deutlich langsameren Anstieg der Fluoreszenzintensität nach Injektion. Nach Substraktion der durchschnittlichen Fluoreszenzintensität vor der Injektion vom maximal erreichten Intensitätswert nach Injektion errechnet sich für bradykininstimulierte Zellen ein Anstieg von 3085 und für Wasser ein Anstieg von 700. **B.** Der relative Fluoreszenzanstieg bradykininstimulierter CoSMC von 2386 wurde nach Abzug der Wasserkontrolle errechnet.

Um eine denkbare dominant negative Funktion der IRAG Isoformen auf die Funktionalität der volle Länge IRAG Proteine zu untersuchen, wurde in Vorversuchen die effektivste Wirkung von unterschiedlichen Substanzen auf die intrazelluläre Freisetzung von Kalziumionen in CoSMC untersucht. Es wurden Bradykinin, Noradrenalin, der Agonist für den G-Protein-gekoppelten β -Adenorezeptor und Carbachol, ein Ligand für nikotinische, muskarinische ACh-Rezeptoren verwendet. Alle drei Substanzen führen zu einem Anstieg von intrazellulärem Kalzium. Eine weitere Substanz, Koffein, wurde untersucht, die einen direkten IP₃Rezeptor- und Ryanodinrezeptor-vermittelten Einstrom von im sarkoplasmatischen Retikulum gespeichertem Kalzium in das Zytoplasma bewirkt.

Unterschiedliche Verdünnungsreihen dieser Substanzen wurden an CoSMC in einem Fluorometer getestet. Steigende Konzentrationen von Bradykinin (Abb. 20A), Koffein (Abb. 20C) und Carbachol (Abb. 20D) führen zu steigenden Kalziumfreisetzungen aus intrazellulären Speichern in CoSMC. Steigende Konzentrationen von Noradrenalin bewirken keinen dosisabhängigen Anstieg in der Fluoreszenzintensität. Die effektivste Wirkung konnte mit Carbachol (1 mM Endkonzentration) nachgewiesen werden. Das Maximum der Fluoreszenzintensität wurde allerdings erst 14 Sekunden nach Injektion erreicht (nicht gezeigt). Bradykinin (500 nM) führt nach Injektion zu einem maximal erreichten Fluoreszenzwert von 2338, der bereits drei Sekunden nach Injektion erreicht ist. Da in Vorarbeiten gezeigt wurde, dass die Stimulation von CoSMC mit Bradykinin zu IP₃Rezeptor-abhängigen Kalziumtransienten führt, der cGKI- bzw IRAG- abhängig hemmbar ist (Fritsch

et al., 2004), wurde in allen weiteren Versuchen Bradykinin mit einer Endkonzentration von 500 nM verwendet.

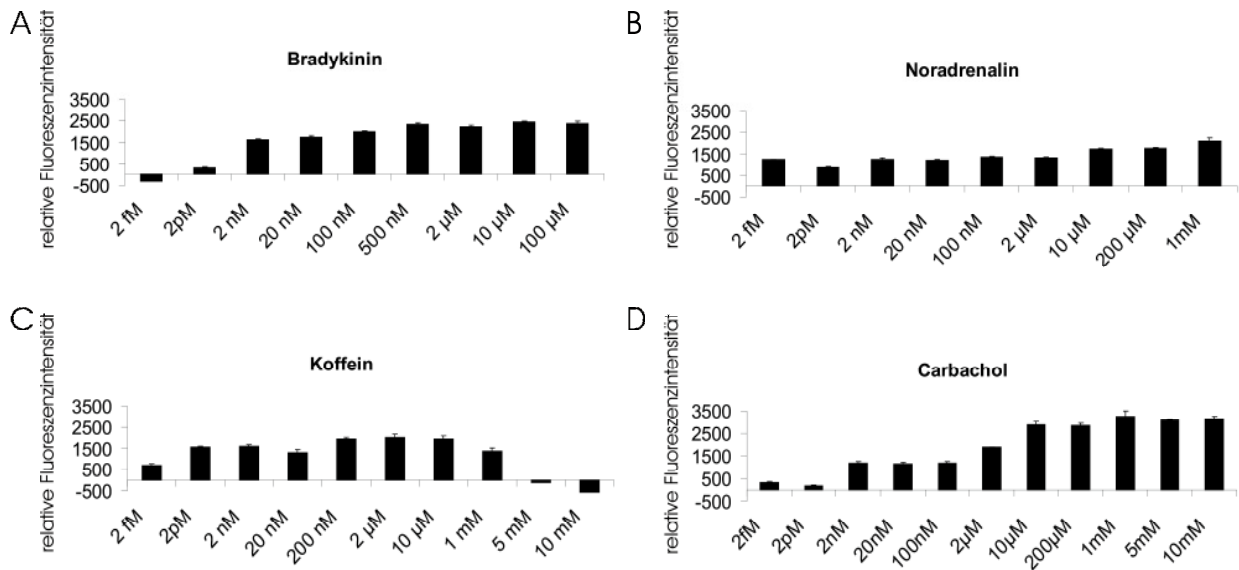


Abb. 20. Veränderungen der intrazellulären Kalziumkonzentration von CoSMC wurden in einem Fluorometer mit einem kalziumsensitiven Fluoreszenzfarbstoff (Fluo-3-AM) gemessen. Ein Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration führt dabei zu einem proportionalen Anstieg der Fluoreszenzintensität. Nach Zugabe von **A.** Bradykinin, **C.** Koffein und **D.** Carbachol kommt es zu einer konzentrationsabhängigen Zunahme der intrazellulären Kalziumkonzentration. **B.** Eine Steigerung der Konzentration von Noradrenalin führt zu keiner gesteigerten intrazellulären Kalziumkonzentration. Der maximale Anstieg der relativen Fluoreszenzintensität in CoSMC nach Stimulation wurde bezogen auf die Basisfluoreszenz der Zellen und Subtraktion der relativen maximalen Fluoreszenzintensität der Wasserkontrolle. Die Daten stellen Triplikate dreier unabhängiger Versuche dar.

Im folgenden Versuch sollte die mögliche dominant negative Funktion der IRAG Proteinisoformen β , γ und δ auf die Inhibierung bradykinininduzierter Kalziumtransienten durch das volle Länge IRAG Protein in CoSMC untersucht werden: In Kotransfektionsstudien wurden CoSMC mit dem Expressionsplasmid, das für das volle Länge Protein IRAG α kodiert, und den Expressionsplasmiden, die für die IRAG Isoformen β , γ und δ kodieren, transient transfiziert. In EGFP-Transfektionsversuchen wurde die Transfektionseffizienz dieser Zelllinie ermittelt. Die Effizienz ist circa 60% hoch (Abb 21).

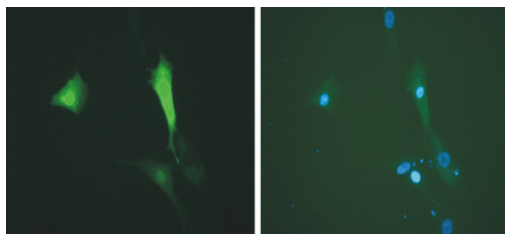


Abb. 21: Transfektionseffizienz von CoSMC. CoSMC wurden transient mit einem EGFP-Expressionsplasmid transfiziert und die Transfektionseffizienz nach Kernfärbung mit dem Farbstoff TOPROTM-3-Jodid mikroskopisch ermittelt. Linke Abbildung: EGFP-exprimierende CoSMC. Rechte Abbildung: TOPROTM-3-Jodid angefärbte Zellkerne. Die Transfektionseffizienz von CoSMC liegt bei etwa 60%.

Eine Inhibierung des bradykinininduzierten Kalziumausstroms aus intrazellulären Speichern in CoSMC durch die cGKI bzw IRAG wurde durch Vorinkubation mit dem cGMP-Analogen 8-Bromo-cGMP (1 mM Endkonzentration) erreicht. 8-Bromo-cGMP wurde mit Hilfe des gerätinternen Injektors fünf Minuten vor Beginn einer jeden Messung injiziert. Die durch 8-

Bromo-cGMP aktivierte cGKI phosphoryliert den IP₃Rezeptor und IRAG, wodurch ein IP₃-induzierter Kalziumstrom aus intrazellulären Speichern in die Zelle gehemmt wird.

Der bradykinininduzierte Anstieg von intrazellulärem Kalzium in kontrolltransfizierten CoSMC, die nicht mit 8-Bromo-cGMP vorinkubiert wurden, wurde auf 100% gesetzt (Abb. 22, Balken links). Die Aktivierung der cGKI durch Vorinkubation mit 8-Bromo-cGMP führt in kontrolltransfizierten CoSMC zu einer etwa 35%-igen Inhibition des bradykinininduzierten Kalziumanstiegs. Eine signifikant stärkere Hemmung der bradykininvermittelten Kalziumtransienten durch 8-Bromo-cGMP wird durch die Überexpression von IRAG α erzielt: Eine etwa 60%ige Inhibition des Kalziumstroms aus intrazellulären Speichern konnte erreicht werden. Diese Funktionalität des volle Länge IRAG α Proteins konnte jedoch durch die Expression der Proteinisofomen IRAG β , γ und δ dominant negativ beeinflusst werden: Die Kotransfektion von IRAG α und IRAG β hebt den inhibierenden Effekt von rekombinantem, als auch von endogenem IRAG auf bradykinininduzierte Kalziumtransienten in CoSMC vollständig auf. Auch IRAG γ hat eine dominant negative Wirkung auf die cGMP/cGKI/IRAG-vermittelte Inhibition bradykinininduzierter Kalziumtransienten. Dagegen führt die Kotransfektion von IRAG α und IRAG δ zu einer 40%-igen Verstärkung von bradykinininduzierten Kalziumtransienten (Abb. 22)

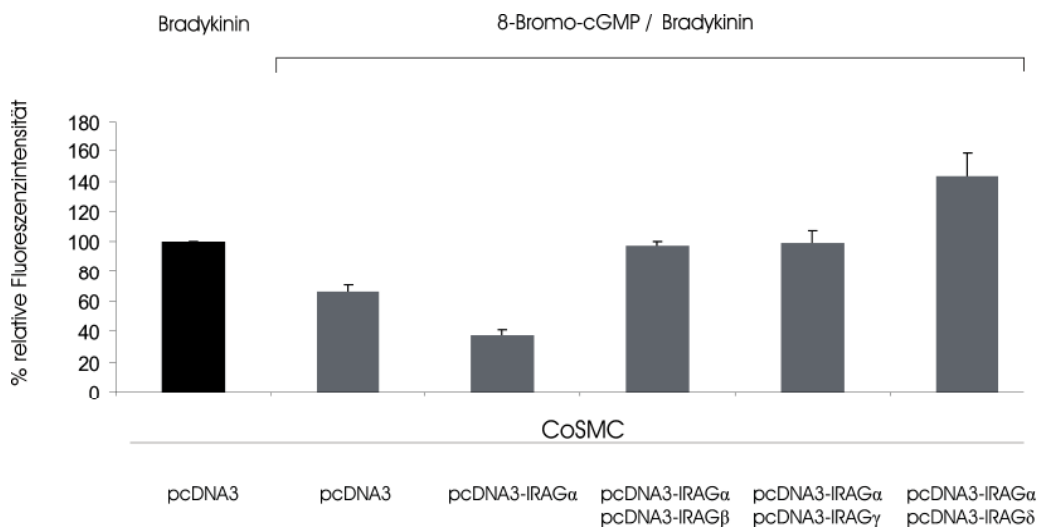


Abb. 22: cGKI-abhängige Kalziumregulation der IRAG Proteinisofomen α , β , γ und δ in bradykinin (500 nM)-stimulierten CoSMC. Im Diagramm prozentual dargestellt ist die 8-Bromo-cGMP (1mM)-abhängige Inhibition bradykinininduzierter CoSMC Kalziumtransienten in Abhängigkeit der Expression verschiedener IRAG Proteinisofomen. Im schwarzen Balken dargestellt ist die Fluoreszenzintensität von CoSMC nach Stimulation mit Bradykinin ohne Vorinkubation von 8-Bromo-cGMP. Die Zellen wurden mit dem Leervektor pcDNA3./1nV5-Dest kontrolltransfiziert. Eine 35%-ige Inhibition des bradykinininduzierten Kalziumanstiegs ist in 8-Bromo-cGMP (1mM)-vorinkubierten, kontrolltransfizierten CoSMC nachzuweisen. Die Vorinkubation von 8-Bromo-cGMP vor einer Messung betrug fünf Minuten. Eine etwa 60%-ige Inhibition des hormoninduzierten Kalziumanstiegs wurde in IRAG α transfizierten CoSMC nachgewiesen. Kotransfektionen von IRAG α mit der β - und γ -Isoform führen zu einer vollständigen Aufhebung der 8-Bromo-cGMP-vermittelten Inhibition von Kalziumtransienten. Dagegen führte die Kotransfektion von IRAG α und IRAG δ zu einem verstärkten Anstieg der bradykininvermittelten Kalziumkonzentration. 5×10^3 Zellen wurden 24 Stunden vor der Transfektion in 96-Loch Platten ausgesät, so dass nach 48 Stunden - am Tag der Messung - eine Zelldichte von etwa 90% erreicht war. 0,3 μ l FuGENE6 und 50 ng Gesamt-DNA wurden für die Transfektion eingesetzt. Die Daten stellen Mittelwerte und Standardabweichungen aus Triplikaten aus drei unabhängigen Experimenten dar.

3.2 ESP1/CRP2

Nachweis und biochemische Charakterisierung von ESP1/CRP2 im humanen Gastrointestinaltrakt

Ziel des zweiten Abschnitts der vorliegenden Arbeit war, die Expression von ESP1/CRP2 im humanen Gastrointestinaltrakt und die funktionelle Rolle in kultivierten glatten Muskelzellen des Kolons zu untersuchen.

3.2.1 Organ- und gewebsspezifische ESP1/CRP2 mRNA Expression

Das Expressionsprofil von ESP1/CRP2 in diversen Geweben und Gewebsabschnitten des humanen Gastrointestinaltrakts wurde mittels quantitativer Echt-Zeit-RT-PCR quantifiziert (Abb. 23). Untersucht wurde cDNA aus humanen Organen und gastrointestinalen Geweben verschiedener Patienten mit ESP1/CRP2 cDNA-spezifischen Oligonukleotidprimern und einer fluoreszenzmarkierten, spezifischen Sonde. Zur Quantifizierung von ESP1/CRP2 wurde eine Standardkurve generiert. Hierzu wurde eine ESP1/CRP2 Sequenz mit den gleichen Oligonukleotidprimern wie für die Echt-Zeit-RT-PCR amplifiziert, die strang- und gegenstrangspezifisch in Exon 8 binden, und in den Klonierungsvektor pCR®II-TOPO® inseriert. Dieses Plasmid wurde mit 5×10^5 , 1×10^5 , 2×10^4 , 4×10^3 , 8×10^2 und $1,6 \times 10^2$ Kopien in die PCR eingesetzt und es konnte eine Standardkurve erstellt werden. Die Berechnung der ESP1/CRP2 mRNA Kopienzahl erfolgte mit Hilfe der Software Sequence Detection System Version 1.9.1. Normalisiert wurden die gewonnenen Daten gegen die Expression von GAPDH. Auch hier wurde eine Plasmidverdünnungsreihe als Standardkurve (2×10^6 , 4×10^5 , 8×10^4 , $1,6 \times 10^4$, $3,2 \times 10^3$ und $6,4 \times 10^2$ Kopien) mitgeführt (Abb. 23).

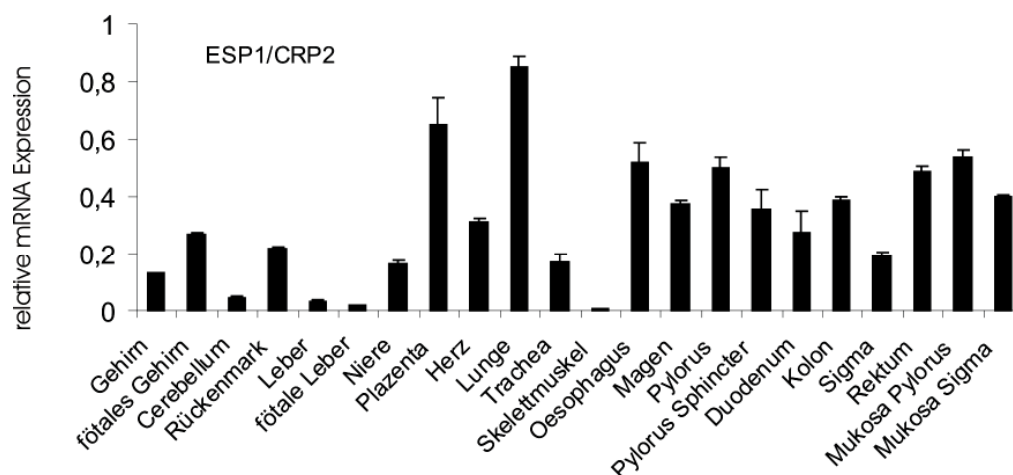


Abb. 23: Relative ESP1/CRP2 mRNA Expression in humanen Organen. Aus humanen Organen isolierte mRNA wurde in cDNA umgeschrieben und in der Echt-Zeit-RT-PCR mit ESP1/CRP2-spezifischen Primern und einer spezifischen Sonde eingesetzt. Die Expression von ESP1/CRP2 wurde auf die Expression der GAPDH (Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase) relativiert. Die Daten stellen Mittelwerte und Standardabweichungen aus Triplikaten aus zwei unabhängigen Experimenten dar.

Die höchste Expression von ESP1/CRP2 in den untersuchten Geweben ist in Lunge und Plazenta nachzuweisen. Eine mittlere Expression ist in den gastrointestinalen Gewebsabschnitten sowohl im muskulären Anteil als auch in der Mukosa und im Herz zu detektieren. Geringer ist die Expression von ESP1/CRP2 in Gehirn, Cerebellum, Rückenmark, Leber, Niere und Trachea (Abb. 23).

3.2.2 5' und 3' RACE-PCR ESP1/CRP2

Um mögliche ESP1/CRP2 mRNA Isoformen zu identifizieren, wurde die 5' und 3' RACE-PCR verwendet. Hierfür wurde RNA aus humanem Muskelgewebe des Magen, Pylorus und Sigma, sowie aus der Kolonkarzinomzelllinie SW480 und der Zervixkarzinomzelllinie HeLa für die 5' und 3' RACE-PCR isoliert. Die Primer wurden, wie in Abb. 24 dargestellt, für die RACE-PCR verwendet. In allen untersuchten Geweben und Zelllinien wurde nur die bereits bekannte ESP1/CRP2 Sequenz gefunden.

```

1 gcgcgggcgcg accggggcgca ccgaccatgg cctccaaatg ccccaagtgc gacaagaccg
61 tgtacttcgc cgagaaggtg agctccctgg ggaaggactg gcacaagttc tgcctcaagt
121 gcgagcgctg cagcaagacg ctgacgcccg gggggccacgc cgagcatgac gggaaagccgt
181 tctgccacaa gccgtgctac gccaccctgt tcggacccaa aggcgtgaac atcgggggcg
241 cgggtccta catctacgag aagccctgg cggaggggccc gcagtcacc ggccccatcg
301 agtccccgc ggcccagca gaggagcggg aggcgagcgg cccccgaag gggcccagca
361 gagcctccag tgtcaccact ttcaccgggg agcccaacac gtgcccgcgc tgcagcaaga
421 aggtgtactt cgctgagaag gtgacgtctc tgggcaagga ttggcaccgg ccctgcctgc
481 gctgcgagcg ctgcccgaag aactgaccc cgggcgggca cgcggagcac gacggccagc
541 cctactgcca caagccctgc tatggaatcc tcttcggacc caagggagtg aacaccggtg
                                     3. 5' ESP1/CRP2-3
601 cggtgggcag ctacatctat gaccgggacc ccgaaggcaa ggtccagccc taggetaca
      2. 5' ESP1/CRP2-2
661 cggtctctcat gatgtgggct cactgcgcc ccagaccctg caggggcccc cctgcttggc
721 tctgctggga gactgctcag ccgccagtc ctgcctgcaa gccagggcg agtattggag
781 gaggggcagc cacgggcaga gcacatgcc catccccgag tctctggtgt gtctgcccc
841 tctggcatcc tctgggcgtc ceatgatccc ttctgtgtct gcgtgtccga atccccgtgt
                                     1. 3' ESP1/CRP2-1
901 gaccctgtcc cagcatttcc ccgcccagcc tgcgtgtccc cgtggcgctg tccctctcc
      2. 3' ESP1/CRP2-2
      1. 5' ESP1/CRP2-1
961 ctctcctgct gccaccacac ctgccagtgt tatttatgct cccttcgtgg gtgatggcca
1021 cgcctcacc atgtccctgg cagaggcctt cctccgggat ccctgcctg gtgcccacac
1081 tgctctgcaa gcctcgcaca cctcacgtg gctcacctgc tgttgagcct tgtgctgtca
1141 ataaacggtt tgaggattgc aaaaaaaaaa a

```

Abb. 24: Humane ESP1/CRP2 mRNA Sequenz mit den Bindungsstellen der RACE-PCR-Primer. Dargestellt ist die komplette mRNA für humanes ESP1/CRP2 (Accession Nummer D42123). Eingerahmt dargestellt sind das Translationsstartkodon ATG (grün) und das Translationsstopcodon TAG (rot). Die kodierenden Exons 1-8 werden durch alternierend fett oder normal gedruckte Nukleotide voneinander abgesetzt. Die Bindungsstellen der genspezifischen Primer sind mit Pfeilen hervorgehoben. Durchgehende Pfeile stehen für die 5' RACE-PCR Primer, gestrichelte Pfeile für die 3' RACE-PCR Primer.

3.2.3 Bakterielle Proteinexpression von ESP1/CRP2

Für den endogenen Proteinnachweis von ESP1/CRP2 im Western Blot wurde rekombinantes ESP1/CRP2 als Positivkontrolle bakteriell exprimiert.

Die kodierende Sequenz für ESP1/CRP2 wurde mittels PCR aus humaner Oesophagus cDNA amplifiziert (Abb. 25). Vor dem Stopkodon wurde in den offenen Leserahmen die kodierende Sequenz für sechs Histidine (6xHIS) *in frame* angefügt, um den Nachweis im Western Blot mit einem Histidin-spezifischen Antikörper zu ermöglichen.

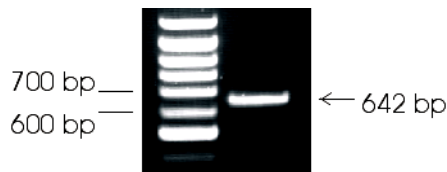


Abb. 25: Die kodierende Sequenz von ESP1/CRP2 wurde mittels PCR amplifiziert. Mit Hilfe der PCR wurde der kodierenden Sequenz von ESP1/CRP2 in den offenen Leserahmen die Sequenz für sechs Histidine *in frame* angefügt. Die Gesamtlänge des Amplifikats beträgt 642 bp und wurde aus dem Agarosegel isoliert, kloniert und sequenziert.

Das 642 bp-lange Amplifikat wurde aus dem Agarosegel isoliert, in den bakteriellen Expressionsvektor pCR®T7/CT-TOPO® kloniert, sequenziert und für die Proteinexpression in Bakterien eingesetzt. Als Positivkontrolle für die Proteinexpression wurde ein green fluorescence protein (GFP) Expressionsplasmid eingesetzt, das für 6xHIS markiertes GFP kodiert (control vector GFP, Roche).

Bei einer optischen Dichte von 0,5 der transformierten BL21-Bakteriensuspension wurden 4 ml davon entnommen (Zeitpunkt 0) und die Induktion der Translation von rekombinantem ESP1/CRP2 mit IPTG (Isopropylthiogalactosid) eingeleitet. Stündlich wurden jeweils 4 ml für den Nachweis im Western Blot entnommen. Die Bakterien von fünf Zeitpunkten (0, 1, 2, 3, 4) sowie GFP-transformierte Bakterien (Zeitpunkt 1) als Positivkontrolle und nicht transformierte BL21 als Negativkontrolle wurden abzentrifugiert und in 20 µl IP-Puffer lysiert. Im Western Blot wurden die Proteine mit einem Poly-Histidin-spezifischen Antikörper detektiert. Rekombinantes ESP1/CRP2-6xHIS Protein mit einem Molekulargewicht von circa 24 kDa wurde bereits vor Induktion mit IPTG (Zeitpunkt 0) translatiert, eine Stunde nach Induktion steigt der exprimierte Proteinanteil um das circa 10-fache an und eine Änderung dieses Anstiegs konnte auch vier Stunden nach Induktion nicht beobachtet werden (Abb. 26).

Für weitere Western Blot Versuche wurde ESP1/CRP2-6xHIS im großen Maßstab hergestellt und über eine geladene Nickelsäule aufgereinigt, um als Positivkontrolle zu dienen.

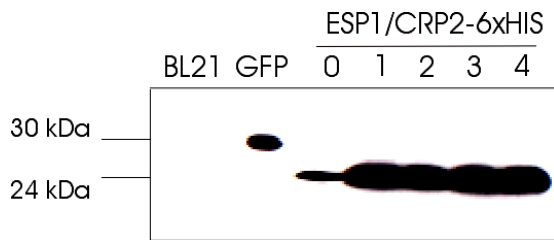


Abb. 26: Bakterielle Expression von rekombinantem humanem ESP1/CRP2. Im Western Blot wurde bakteriell exprimiertes ESP1/CRP2-6xHIS mit einem Poly-Histidin-spezifischem Antikörper nachgewiesen. Molekulargewicht ESP1/CRP2-6xHIS: ~24 kDa. GFP-6xHIS mit einer Größe von 30 kDa wurde als Positivkontrolle eingesetzt; nichttransformierte BL21Bakterien dienten als Negativkontrolle.

3.2.4 Herstellung eines spezifischen Antikörpers gegen humanes ESP1/CRP2

Um ESP1/CRP2 nachzuweisen, wurde ein polyklonaler Antikörper gegen humanes ESP1/CRP2 in Hasen hergestellt. Die in Abbildung 27 dargestellte Graphik zeigt die zweidimensionale Proteinstruktur von humanem ESP1/CRP2.

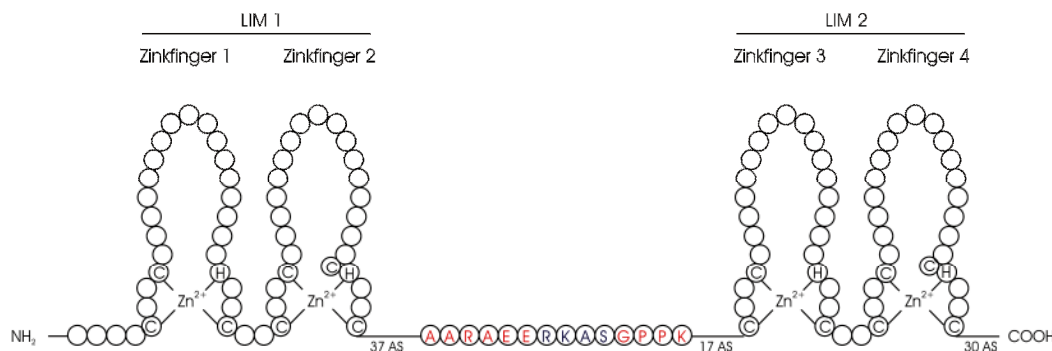


Abb. 27: Proteinstruktur von humanem ESP1/CRP2. Humanes ESP1/CRP2 ist charakterisiert durch zwei LIM-Domänen, beide bestehend aus zwei Zinkfingerstrukturen. Zur Antikörpergewinnung in Hasen wurde von der Firma Sigma ein synthetisches Peptid mit der Aminosäuresequenz CAARAEERKASGPPK generiert. Das nicht in der Originalsequenz vorkommende N-terminale Cystein wurde zur Kopplung an ein Adjuvants N-terminal hinzugefügt. RKAS (blau) ist die Phosphorylierungsstelle für die cGKI.

Zwei Zinkfingerstrukturen der insgesamt vier Zinkfinger bilden jeweils eine LIM-Domäne. Zwischen den beiden LIM-Domänen lokalisiert ist die Aminosäuresequenz RKAS, die die cGKI Phosphorylierungssequenz in ESP1/CRP2 ist. Eine 15 Aminosäuren-lange Sequenz AARAEEERKASGPPK um die Phosphorylierungsstelle RKAS wurde ausgewählt und an den N-Terminus dieses Peptids wurde ein Cystein angehängt, um die Kopplung an ein Adjuvants zu ermöglichen (Abb. 27). Alle weiteren Schritte zur Gewinnung des ESP1/CRP-spezifischen

Antikörpern wurden von der Firma Sigma durchgeführt. Zwei Hasen (#1511, #1512) wurden mit dem Peptid immunisiert und anschließend Serum zu vier Zeitpunkten (#1-4) entnommen. Im Western Blot wurden mit bakteriell hergestellten rekombinanten ESP1/CRP2-6xHIS die Antikörperseren der beiden Hasen auf ihre ESP1/CRP2-Affinität hin untersucht. In keinem der vier gewonnenen Seren von Hase #1511 ist ein ESP1/CRP2 affiner Antikörper enthalten (Abb. 28, Seren 3 und 4 nicht gezeigt), wohingegen mit allen vier Seren des Hasen #1512 rekombinantes ESP1/CRP2-6xHIS nachgewiesen wurde (Abb. 28, Seren 3 und 4 nicht gezeigt). Die optimale Verdünnung, mit der der Antikörper für den Western Blot eingesetzt wurde, war bei 1:100 erreicht. Die Stärke der Affinität der Antikörper # 1512 ist in allen vier Seren eine ähnlich hohe, die in zukünftigen Versuchen zur Detektion von ESP1/CRP2 verwendet werden können.

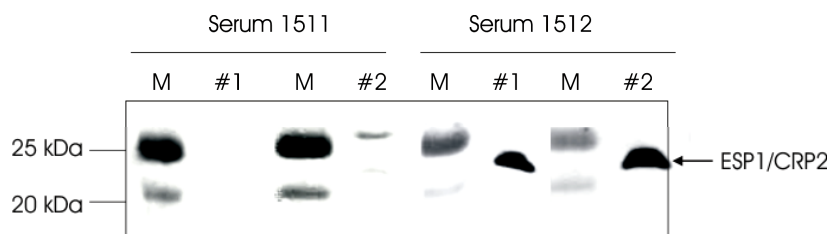


Abb. 28: Affinität der polyklonalen Antikörper in den Seren 1511 und 1512. Die Affinität der Antikörperseren der Hasen #1511 und #1512 wurde an rekombinatem ESP1/CRP2-6xHIS (24 kDa) ausgetestet. In den Seren 1 und 2 des Hasen #1511 sind keine Antikörper mit Affinität für humanes ESP1/CRP2-6xHIS enthalten. Seren 3 und 4 lieferten ebenfalls kein Signal im Western Blot; diese Daten sind nicht gezeigt. Alle vier Seren von Hase #1512 enthalten ESP1/CRP2-spezifische Antikörper (#3 und #4 nicht gezeigt). Proteinmarker (M).

3.2.5 Akuter *Knockdown* von ESP1/CRP2: Funktionelle Untersuchungen

Um die funktionelle Rolle von ESP1/CRP2 zu untersuchen, wurde mittels RNA Interferenz und Antisenseoligonukleotidbehandlung versucht, die Proteinexpression von ESP1/CRP2 herabzuregulieren. Hierzu wurden zwei verschiedene siRNA und zehn verschiedene Antisenseoligonukleotide in die humanen, ESP1/CRP2 exprimierenden Zelllinien SW480 und HeLa transient transfiziert. Dabei zeigte sich, dass keine reproduzierbaren Ergebnisse auf mRNA und Proteinebene erzielt werden konnten. Weder die Transfektion der siRNA, noch die der Antisenseoligonukleotide führte zu einem *knockdown* der mRNA-, die mittels Echt-Zeit-RT-PCR quantifiziert wurde, noch zu einer Inhibierung der Proteinexpression, die im Western Blot untersucht wurde. Vielmehr kam es in den meisten Fällen zu einer Induktion der ESP1/CRP2 mRNA Expression, so dass diese Versuche nicht weitergeführt wurden.

3.2.6 Subzelluläre Lokalisation von ESP1/CRP2 in kultivierten glatten Muskelzellen des Kolons

Um die subzelluläre Lokalisation von ESP1/CRP2 zu untersuchen, wurden Expressionsplasmide generiert, die für ein N- bzw C-terminales ESP1/CRP2-EGFP (enhanced green fluorescence protein) Fusionsprotein kodieren. In der Fluoreszenzmikroskopie wurde EGFP-fusioniertes ESP1/CRP2 in transient transfizierten kultivierten glatten Muskelzellen des Kolons nachgewiesen. Die 40-fache Vergrößerung am Fluoreszenzmikroskop zeigt eine homogene Verteilung von ESP1/CRP2-EGFP im Zytoplasma der Zelle (Abb. 29, Reihe A).

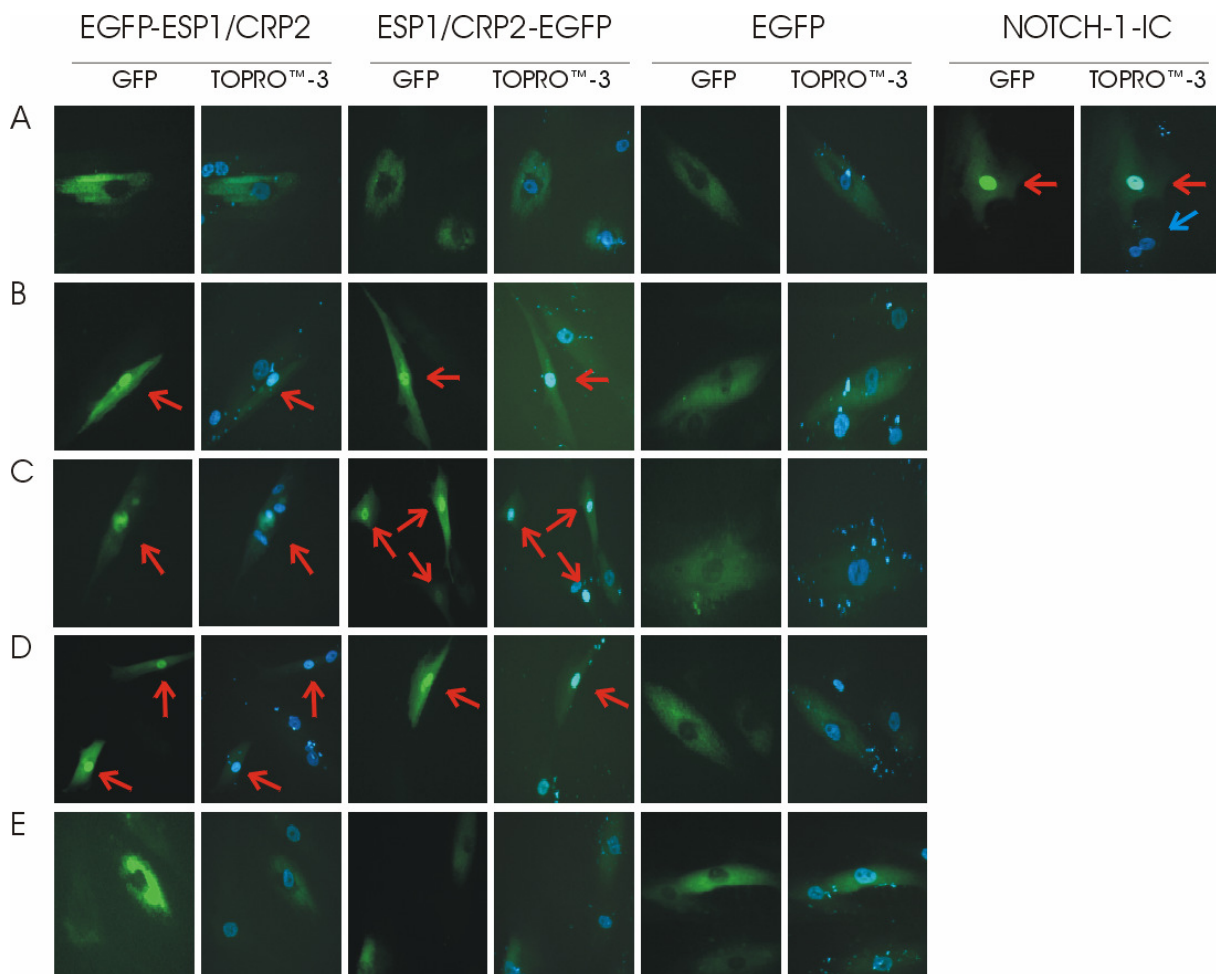


Abb. 29: Intrazelluläre Lokalisation von ESP1/CRP2. Expression von EGFP-ESP1/CRP2, ESP1/CRP2-EGFP, EGFP und NOTCH-1-IC in humanen glatten Muskelzellen des Kolons (CoSMC). Mittels Fluoreszenzmikroskopie wurde EGFP und TOPRO™-3-Jodid (TOPRO™-3) visualisiert. **A.** Unstimulierte CoSMC. Eine nukleäre Lokalisation ist von NOTCH-1-IC-EGFP (NOTCH-1-IC) als Positivkontrolle nachzuweisen (roter Pfeil). Nicht transfizierte NOTCH-1-IC Zellen zeigen in der TOPRO™-3 Färbung eine intensivere Blaufärbung der Zellkerne (blauer Pfeil). **B.** CoSMC wurden für zehn Minuten mit DETA-NONOate (10 µM) stimuliert. EGFP-ESP1/CRP2 und ESP1/CRP2-EGFP liegt zytoplasmatisch und im Zellkern vor. **C.** Nukleärer und zytoplasmatischer Nachweis von EGFP-ESP1/CRP2 und ESP1/CRP2-EGFP in CoSMC nach gleichzeitiger Stimulation durch DETA-NONOate und Inhibition der cGK durch Rp-8-pCPT-cGMPs (10 µM). **D.** Direkte Aktivierung der cGK durch Zugabe von 8-Bromo-cGMP (1 mM) für 10 Minuten führt zur Translokation von ESP1/CRP2 in den Kern. **E.** Gleichzeitige Zugabe von 8-Bromo-cGMP und Rp-8-pCPT-cGMPs inhibiert die Anreicherung von ESP1/CRP2 im Nukleus der Zellen. Vergrößerung: 40-fach.

Im Kern von unstimulierten CoSMC hingegen ist ESP1/CRP2 nicht nachzuweisen, eine TOPROTM-3-Jodid Färbung visualisiert die Nuklei der Zellen durch Blaufärbung. Als Positivkontrolle für die Anreicherung eines EGFP-fusionierten Proteins im Zellkern wurde NOTCH-1-IC gewählt, dem intrazellulären Anteil des Transmembranrezeptorproteins NOTCH, das nach Ligandbindung proteolytisch vom Rezeptor gespalten wird und in den Zellkern transloziert. Notch-1-IC hat ein nukleäres Lokalisationssignal und ist ausschließlich im Kern lokalisiert. In der GFP-Färbung deutlich angefärbt ist der nukleäre Anteil der Zelle, die TOPROTM-3-Jodid Färbung zeigt eine intensive weiß-blaue Färbung des EGFP-NOTCH-1-IC positiven Kerns verglichen zu den NOTCH-1-IC negativen, dunkelblauen Zellkernen auf dem selben Objektträger (Abb. 29, Reihe A). Um auszuschließen, dass die Fusion von ESP1/CRP2 an EGFP eine Translokation von ESP1/CRP2 in den Kern beeinflusst, wurde EGFP zum einen N-terminal an ESP1/CRP2 (EGFP-ESP1/CRP2), zum anderen C-terminal an ESP1/CRP2 (ESP1/CRP2-EGFP) fusioniert. Transient transfizierte CoSMC wurden für zehn Minuten mit dem NO-Donor DETA-NONOate (10 μ M) oder mit dem cGMP-Analogon 8-Bromo-cGMP (1mM) inkubiert. Nach Waschen und Fixieren der Zellen wurde die Fluoreszenz der Zellen bei 40-facher Vergrößerung detektiert. N- und C-terminal fusioniertes EGFP-ESP1/CRP2 transloziert nach Aktivierung des NO-Signalweges durch DETA-NONOate, als auch nach direkter Aktivierung der cGK durch 8-Bromo-cGMP in den Kern. Das Kontrollprotein EGFP ist nicht im Nukleus nachzuweisen (Abb. 29 Reihe B, D). Inhibierung der cGK I α , I β und II durch Rp-8-pCPT-cGMPs (10 μ M) konnte die DETA-NONOate induzierte Translokation von ESP1/CRP2 nicht hemmen (Abb. 29, Reihe C). Dagegen konnte eine Blockade der cGKI α , I β und II durch Rp-8-pCPT-cGMPs die Translokation von ESP1/CRP2 in 8-Bromo-cGMP stimulierten Zellen verhindern (Abb. 29, Reihe E).

Die Ergebnisse der Fluoreszenzmikroskopie zeigen somit, dass ESP1/CRP2 zytoplasmatisch in glatten Muskelzellen des Kolons vorhanden ist und nach Aktivierung des NO- Signalweges in den Zellkern transloziert.

4 DISKUSSION

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die cGKI Effektorproteine IRAG und ESP1/CRP2 im Gastrointestinaltrakt des Menschen untersucht. Hierbei zeigte sich eine transkriptionelle und posttranskriptionelle Regulation des humanen *IRAG* Gens. Der Gebrauch von alternativen ersten Exons, sowie alternatives Spleißen mit Insertionen beziehungsweise Deletionen von internen Exons führt zu diversen IRAG mRNA Varianten. Ferner werden durch alternatives Spleißen 3' mRNA Formen exprimiert, die für C-terminal trunke IRAG Proteinisoformen kodieren. Diverse Isoformen haben eine dominant negative Funktion in glatten Muskelzellen und reduzieren daher die cGMP/cGKI-vermittelte Inhibierung hormoninduzierter Kalziumtransienten. Die funktionelle Rolle von ESP1/CRP2 konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden.

Das enterische Nervensystem innerviert mit Motoneuronen des myenterischen Plexus und submukösen Plexus die longitudinale und zirkuläre Muskulatur, die die Motilität des Gastrointestinaltrakts reguliert. Exzitatorische Neurone führen über diverse Neurotransmitter, wie zum Beispiel Acetylcholin (ACh), Substanz P und Enkephaline, zur Kontraktion der Muskulatur (Lecci *et al.*, 2002; Hansen *et al.*, 2003; Hebeiss *et al.*, 1998). Die Relaxation der Muskulatur wird im wesentlichen durch nicht-adrenerge nicht-cholinerge (NANC) Neurotransmitter vermittelt. Zu diesen NANC-Neurotransmittern, die von inhibitorischen Motoneuronen ausgeschüttet werden, zählen unter anderem das vasoaktive-intestinale Peptid (VIP), Adenosintriphosphat (ATP), PACAP (pituitary adenylylcyclase activating peptide), Kohlenstoffmonoxid (CO) und Stickstoffmonoxid (NO) (Allescher *et al.*, 1996; Grider *et al.*, 1993; Hansen, 2003; Beranano *et al.*, 2001; Porter *et al.*, 1997).

NO stellt im humanen Kolon den Haupttransmitter in der Nerven-Muskel-Interaktion dar (Porter *et al.*, 1997). Bei zahlreichen pathophysiologischen Veränderungen der gastrointestinalen Motilität, wie zum Beispiel der Achalasie, der infantilen hypertrophen Pylorusstenose (IHPS), der intestinalen Pseudoobstruktion, des Morbus Crohn, des Morbus Hirschsprung oder bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen spielt eine veränderte NO-vermittelte Neurotransmission eine große Rolle (Schemann *et al.*, 2004). Der Verlust der neuronalen NO-Synthase (nNOS), die die Synthese von NO über die Oxidation von L-Arginin zu L-Citrullin katalysiert, führt in Mäusen zu schweren gastrointestinalen Defekten, so haben diese Tiere eine Pylorusstenose mit einer verzögerten Magen/Darmpassage (Huang *et al.*, 1995).

Die Stimulation der löslichen Guanylatzyklase durch NO führt zur Synthese des zyklischen Guanosinmonophosphats und Aktivierung der cGMP-abhängigen Proteinkinasen cGK. Die cGKII ist nicht an zellulären Mechanismen beteiligt, die die Motilität des Gastrointestinaltrakts regulieren (Pfeifer *et al.*, 1996), dagegen aktiviert die cGKI einige *downstream* Proteine, die die Relaxation der gastrointestinalen Muskulatur induzieren.

Mäuse, die mit einer Deletion die cGKI nicht exprimieren, haben einen vergleichbaren gastrointestinalen Phänotyp wie die nNOS defiziente Tiere (Pfeifer *et al.*, 1996). Die zellulären Mechanismen, die durch die cGKI vermittelt werden und die zur Relaxation von glatten Muskelzellen führen, sind gut charakterisiert. So moduliert die cGKI die Kalziumsensitivität oder führt zur Reduktion von intrazellulärem Kalzium: Die cGKI führt zur Inhibierung der IP₃-Synthese (Xia *et al.*, 2001) und zur Aktivierung von Ca²⁺-ATPase Pumpen, die die Aufnahme von intrazellulärem Kalzium in intrazelluläre Speicher beschleunigen und den energieabhängigen Transport von Kalzium gegen einen Kalziumgradienten aus der Zelle aktivieren (Cornwell *et al.*, 1991). Zudem hat die cGKI Einfluss auf den Ca²⁺/calmodulin-dependent myosin light chain kinase (MLCK)-Signaltransduktionsweg, der mit zunehmender Kalziumkonzentration aktiviert wird und zur Kontraktion der Zelle führt: Die Dephosphorylierung der myosin light chain durch die cGKI-aktivierte Myosinphosphatase führt zur Hemmung dieses Signalweges (Surks *et al.*, 1999). Ein weiterer cGKI-induzierter Signalweg, der zur Relaxation von glatten Muskelzellen führt, ist die Aktivierung des maxi-K⁺-Kanals (BK_{ca}), wodurch es zur Hyperpolarisierung der Zellmembran und Reduktion des einströmenden Kalziums über spannungsabhängige Kalziumkanäle kommt (Yamakage *et al.*, 1996). BK_{ca} *knockout* Tiere haben jedoch keine Abnormalitäten in der gastrointestinalen Motilität und eine normale Relaxation glatter gastrointestinaler Muskelzellen (persönliche Mitteilung von Prof. Ruth, Universität Tübingen). Dieser Signalweg spielt vermutlich keine wesentliche Rolle im Rahmen der inhibitorischen Neurotransmission im Gastrointestinaltrakt. Der wahrscheinlich wichtigste Mechanismus zur Relaxation glatter gastrointestinaler Muskelzellen ist die cGKI-abhängige Phosphorylierung von IRAG mit resultierender Hemmung des IP₃-induzierten Kalziumeinstroms aus intrazellulären Speichern (Pfeifer *et al.*, 1998). Vor kurzem konnte gezeigt werden, dass IRAG spezifisch von der cGKI phosphoryliert wird und hormoninduzierte Kalziumtransienten, die IP₃-abhängig sind, hemmt (Schlossmann *et al.*, 2000). Eine Herabregulation der IRAG Expression in glatten Muskelzellen des Kolons durch Antisenseoligonukleotide blockierte die cGMP/cGKI-vermittelte Hemmung der Kalziumtransienten (Fritsch *et al.*, 2004). Eine Deletion der IP₃R-Interaktionsstelle des IRAG Proteins in Mäusen verhindert ebenfalls diese Hemmung und die cGMP-abhängige Relaxation von gastrointestinalen Muskelzellen. Diese Mäuse haben einen dilatierten Gastrointestinaltrakt (GIT) und eine gestörte gastrointestinale Motilität mit einer stark herabgesetzten Magen/Darmpassage (Geiselhöringer *et al.*, 2004) und weisen damit ähnliche Störungen auf wie nNOS und cGKI defiziente Mäuse. Das cGKI Effektorprotein IRAG spielt demnach eine entscheidende Rolle in der Aufrechterhaltung der gastrointestinalen Motilität. Die funktionelle Charakterisierung des humanen IRAG ist Ziel dieser Arbeit gewesen und dient zur näheren Aufklärung der Schlüsselfunktion dieses Proteins in der Physiologie des humanen GIT.

In der vorliegenden Arbeit konnte die Expression von IRAG im humanen GIT nachgewiesen werden. Es kommt zur Expression von diversen mRNA Varianten, die für N-terminale und C-terminal trunkeerte Proteine kodieren. Neun alternative erste Exon-mRNA Varianten werden generiert, wovon bisher sechs murine mRNA Varianten und vier im Rind identifiziert wurden (Shaugnessy *et al.*, 1999; Schlossmann *et al.*, 2000). Eine mRNA Variante, IRAG α , mit einem intern inseriertem Exon, und drei trunkeerte mRNA Varianten, IRAG β , IRAG γ und IRAG δ , wurden in der vorliegenden Arbeit identifiziert.

Die IRAG Isoformen werden im humanen GIT exprimiert. Die endogenen und auch heterolog exprimierten Proteinisoformen haben ein Molekulargewicht von 125 kDa (IRAG α), 50 kDa (IRAG β), 75 kDa (IRAG γ) und 55 kDa (IRAG δ). Die errechneten Molekulargewichte für IRAG α , IRAG β , IRAG γ und IRAG δ sind 99,36 kDa, 30,81 kDa, 52,73 kDa und 40,3 kDa. Posttranslationelle Modifikationen, wie zum Beispiel Glykosilierungen, könnten zu dem Unterschied zwischen errechnetem und tatsächlichem Molekulargewicht führen. Neben der komplexen transkriptionellen und posttranskriptionellen Regulation wird die Expression des IRAG Gens auch auf Proteinebene reguliert: Die drei Proteinvarianten werden in CoSMC und COS-7-Zellen abgebaut. Der Abbau wurde durch Zugabe des Proteasomeninhibitors MG132 inhibiert. Die Halbwertszeit eines Proteins wird bestimmt durch einen makromolekularen Komplex, dem Proteasom. Ubiquitin, ein kleines Molekül, das in allen eukaryotischen Zellen vorhanden ist, spielt eine wichtige Rolle bei der Markierung von Proteinen für deren Zerstörung. Ubiquitin wird kovalent mit Lysinresten der zum Abbau bestimmten Proteine verbunden. Drei Enzyme, E1, E2 und E3, sind an der Konjugation des Ubiquitins beteiligt. Gewöhnlich werden mehrere Ubiquitinmoleküle an das Zielprotein konjugiert und schließlich von einem Proteasom verdaut (Stryer, 1999). Die Halbwertszeit von zytosolischen Proteinen ist abhängig von der Art ihrer aminoterminalen Reste, so sind stabilisierende Aminosäuren Alanin, Cystein, Glyzin, Methionin, Prolin, Serin, Threonin und Valin. Stark destabilisierend wirken Reste wie Arginin und Leucin und begünstigen eine schnelle Ubiquitinierung. Die restlichen Aminosäuren wirken weniger stark, aber dennoch destabilisierend (Varshavsky, 1996).

Die mRNA Varianten werden durch den Gebrauch von alternativen Promotoren, durch alternatives Spleißen und alternative Polyadenylierung generiert. Der Gebrauch von drei alternativen Promotoren reguliert die Expression der neun 5' IRAG mRNA Varianten, die sich zum Teil in ihrer 5' untranslatierten Region (UTR) unterscheiden. In den muskulären Abschnitten des humanen Gastrointestinaltrakt, in der kultivierten glatten Muskelzelllinie des Kolons CoSMC und der Adenokarzinomzelllinie SW480 werden diese mRNA Varianten exprimiert. Alternative Polyadenylierung führt zur Expression der trunkeerten mRNA Varianten mit unterschiedlichen 3' untranslatierten Regionen. Die unterschiedlichen UTRs in den IRAG mRNA Varianten können diverse Effekte hervorrufen: Untranslatierte Regionen spielen eine entscheidende Rolle in der posttranskriptionellen Regulation der Genexpression.

5' und 3' UTRs haben Einfluss auf die Expression, indem die Stabilität, die Lokalisation der mRNA sowie die Translationseffizienz nach Anfügen ein 5' Schutzkappe und eines 3' gelegenen Polyadenylatschwanzes reguliert wird: 1.) Die mRNA Degradation kann durch das Entfernen der 5' Schutzkappe und/oder durch das Verkürzen des Poly(A)-Schwanzes induziert werden. Dies wird meist durch bestimmte Elemente in der 3' UTR der mRNA vermittelt, wie die AU-reichen Elemente (ARE), die als Pentanukleotide (AUUUA) auftreten. Nukleäre Transkriptionsfaktoren, wie c-Fos und c-Myc, und Zytokine enthalten diese ARE Sequenzen, eine posttranskriptionelle Regulation der Expression dieser Gene wird dadurch gewährleistet. c-Jun mRNA enthält keine AREs, aber eine U-reiche Region, die ebenfalls zur Degradation der mRNA führt (Mignone *et al.*, 2002). Iron-responsive element (IRE)-Sequenzen in der 3' UTR führen ebenfalls zur Degradation der mRNA durch Endonukleotidspaltung in der 3' UTR. Die Erkennung der IRE-Sequenzen wird durch eisenabhängige Proteine reguliert, die an die mRNA binden und zur Degradation führen (Mignone *et al.*, 2002). 2.) Die zielgerichtete Lokalisation von mRNA an spezifische subzelluläre Orte vermittelt durch UTRs führt zur Expression des Proteins an seinem Bestimmungsort. Dieser Mechanismus kann sehr effizient sein, da die mRNA Matrize für mehrere Translationsrunden sein kann. Die mRNA des myelin basic proteins beispielsweise transloziert zum Myelin in Oligodendrozyten des zentralen Nervensystems. Elemente in der 3' UTR, aber auch in der 5'UTR sind für diesen Transport und die Lokalisation notwendig (Ainger *et al.*, 1997). 3.) Weitere Möglichkeiten zur Regulation der Genexpression stellen die 5' UTRs dar, wodurch die Translationseffizienz positiv oder negativ moduliert wird. Gene, die für Protoonkogene, Wachstumsfaktoren oder Transkriptionsfaktoren kodieren, und daher sorgfältig reguliert werden müssen, haben meist 5' UTRs, die länger als der Durchschnitt sind (Kozaak, 1987). Die Translation der mRNA startet normalerweise beim ersten ATG Startkodon, das im offenen Leserahmen mit dem Stopkodon der mRNA ist. Eine konservierte Sequenz flankiert das Startkodon und eine resultierende bessere Identifizierung durch die 40S ribosomale Untereinheit der Ribosomen erhöht die Translationseffizienz. Doch in einigen Fällen wird dieses erste *in frame* Startkodon, eventuell wegen einer weniger effektiven Konsensussequenz, überlesen und ein zweites Startkodon initiiert die Translation. Die Translation der mRNA beginnend vom ersten ATG ist dadurch herabgesetzt (Xiong *et al.*, 2001). Möglicherweise spielt bei diesem Mechanismus ebenfalls die Länge der 5' UTR eine Rolle (Mignone *et al.*, 2002). Ebenso führen Sekundärstrukturen der mRNA zu einer reduzierten Translationseffizienz durch eine reduzierte Bindung der mRNA an die Ribosomen (Svitkin *et al.*, 2001). IRE-Sequenzen in der 5' UTR modulieren die Translationseffizienz durch eine verringerte Bindung von RNA-bindenden Proteinen an die mRNA.

Der Einfluss der 5' und 3' UTRs der IRAG mRNA Varianten ist nicht geklärt. Die IRAG Genexpression wird durch die 5' und 3' UTR posttranskriptionell reguliert und Unterschiede in der Expression von IRAG mRNA und Protein könnten mit diesen genannten Mechanismen erklärt werden. Es ist auch unklar, welchen Einfluss die mRNA Varianten auf

pathophysiologische Prozesse haben. So werden beispielsweise vom *nNOS* Gen zwölf verschiedene erste Exon-Transkripte im humanen Gastrointestinaltrakt exprimiert, die sich im Bereich der 5' UTR unterscheiden (Xie *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 1999; Saur *et al.*, 2000, 2002; Newton *et al.*, 2003). Eine pathophysiologische Rolle könnte die veränderte Expression der Exon 1c-mRNA Variante der nNOS bei IHPS Patienten einnehmen: Eine verringerte Expression dieser mRNA ist im Pylorus von IHPS Patienten verglichen mit Kontrollgewebe gesunder Patienten detektierbar (Saur *et al.*, 2004). Es wäre daher interessant, die Rolle der UTRs der IRAG mRNA Varianten zu klären und das Expressionsniveau in gastrointestinalen, pathophysiologisch veränderten Geweben zu untersuchen, um die physiologische und pathophysiologische Bedeutung der Varianten zu charakterisieren.

Neben dem Gebrauch von alternativen ersten und alternativen letzten Exons, die zu diversen 5' und 3' UTRs führen, wird die Diversität der IRAG mRNA durch alternatives Spleißen von internen Exons erhöht, wodurch sich die Varianten in ihrer kodierenden Sequenz unterscheiden. Das Spleißen von pre-mRNA wird von Spleißosomen ausgeführt, die aus kleinen Ribonukleoproteinen bestehen. Beim alternativen Spleißen werden Intronsequenzen und Exonsequenzen präzise aus der pre-mRNA herausgeschnitten, was durch die Erkennung von konservierten Spleißdonor- und akzeptorstellen durch das Spleißosom verursacht wird. Eine gesteigerte proteomische Vielfalt wird durch diesen Mechanismus erreicht und Proteine kodiert durch ein Gen divergieren in ihrer Struktur und Funktion (Gravely, 2001). Ein Beispiel für proteomische Vielfalt sind die Isoformen des *prkg* Gens: Die cGKI Isoformen α und β werden durch das alternativ gespleißte Exon 1a oder 1b generiert. Die gewebsspezifische Expression, die subzelluläre Lokalisation, Sensitivität und Substratspezifität unterscheiden sich in den Isoformen.

Das *IRAG* Gen kodiert für eine cGKI Interaktionsstelle im N-Terminus, eine cGKI Phosphorylierungsregion im C-Terminus und eine zentrale coiled coil Domäne, die die Interaktion mit dem IP₃Rezeptor vermittelt. Zusätzlich kodieren Exonsequenzen für N- und C-terminale Transmembrandomänen (Schlossmann *et al.*, 2000). Den trunkierten mRNA Varianten werden die kodierenden Exons für die IP₃R Interaktionsstelle und die cGKI Interaktionsstelle deletiert. Der Verlust der IP₃R Interaktionsstelle in den trunkierten IRAG Isoformen muss Einfluss auf die Funktionalität haben, da eine Interaktion von IRAG und dem IP₃R durch eine Deletion in Exon 12, das für die IP₃R Interaktionsstelle kodiert, *in vivo* und *in vitro* gestört ist. Die phänotypischen Merkmale der IRAG ^{$\Delta 12/\Delta 12$} knockout Maus haben einen stark dilatierten Magen und Oesophagus und eine stark herabgesetzte Magen/Darmpassage. Carbacholkontrahierte Kolonmuskelstreifen dieser Tiere, nicht aber Depolarisationskontrahierte, relaxieren cGMP-abhängig (Geiselhöringer *et al.*, 2004). Der Verlust der cGKI Phosphorylierungsstelle in den verkürzten IRAG Varianten beeinflusst ebenfalls die Funktionalität: die Phosphorylierung des Serins⁶⁷⁷ durch die cGKI β ist essentiell, um den

Kalziumausstrom von IP₃-sensitiven Speichern in die Zelle zu reduzieren (Ammendola *et al.*, 2001).

Die Transmembrandomänen vermitteln die Verankerung von IRAG in der Membran vom endoplasmatischen oder sarkoplasmatischen Retikulum (Schlossmann *et al.*, 2000). Alternatives Spleißen entfernt entweder die N-terminale, die C-terminale oder beide Transmembrandomänen. Die heterologe Expression von IRAG mit beiden oder mit der C-terminalen TMD in COS-7-Zellen zeigte, dass keine Unterschiede zwischen den beiden Isoformen in der cGKI β -abhängigen Hemmung hormoninduzierter Kalziumtransienten nachzuweisen waren (Schlossmann *et al.*, 2000). Die Funktionalität der Proteine ist unverändert und nicht anhängig von der Anzahl der TMD. Den trunkierten mRNA Varianten fehlt die C-terminale TMD. Da nicht eindeutig geklärt ist, welchen N-Terminus die trunkierten Isoformen besitzen, wäre es möglich, dass die Varianten keine der beiden TMD enthalten, so dass lösliche, nicht membranverankerte Proteine exprimiert werden. Dieser Verlust von Transmembrandomänen wirkt sich auf die Lokalisation von Proteinen aus. So sind beispielsweise die membrangebundenen und sezernierten Formen der Antikörpermoleküle Produkte alternativen Spleißens. Die Vorläufer antikörperproduzierender Zellen bilden Antikörper, die in der Plasmamembran verankert sind. Die Stimulierung der Zelle durch ein spezifisches Antigen, das vom Oberflächenantikörper erkannt wird, führt zur Zelldifferenzierung und Proliferation. Die aktivierten Zellen spleißen ihre pre-mRNA nun auf solche Weise, dass durch Entfernen der Transmembrandomäne lösliche Antikörpermoleküle entstehen, die sezerniert werden (Stryer, 1999).

Die mRNA Variante IRAG α mit einem alternativ inseriertem Exon (5a) ist bereits bekannt, wurde bis dato aber nur im Rind identifiziert und die funktionellen Versuche wurden basierend auf dieser mRNA Sequenz durchgeführt, da sie die prädominante Variante im GIT darstellt. IRAG α enthält die Sequenzen für die N- und C-terminale TMD, die cGKI Interaktions- und Phosphorylierungsstelle und die coiled coil Domäne, die die Interaktion mit dem IP₃R vermittelt (Schlossmann *et al.*, 2000; Ammendola *et al.*, 2001; Geiselhöringer *et al.*, 2004). Die Funktion der durch das Exon 5a kodierten Region ist nicht klar. Möglicherweise verändert diese Region, die die cGKI Bindestelle flankiert, die Eigenschaften in der cGKI-Bindungsaffinität. Zudem ist unklar, ob der Verlust der Expression der Exon 5a-inserierten mRNA Einfluss auf die Tumorentstehung hat. In SW480 Kolonkarzinomzellen wird lediglich die IRAG mRNA exprimiert, die Exon 5a inseriert hat, wohingegen in Oesophagus beide Varianten vorhanden sind. Der Einfluss der Exon 5a-kodierten Region auf die Proliferation und den programmierten Zelltod könnte in *in vitro* Studien näher untersucht werden. Hier könnte eine mögliche onkogene bzw. tumorsupprimierende Funktion von IRAG geklärt werden. Die Homologie zwischen humanem IRAG α und dem bovinen IRAG ist 91%. Humanes IRAG α und murines IRAG sind zu 89% homolog. Die trunkierten Varianten IRAG β , γ und δ sind mit 35%, 57% und 33% homolog zu IRAG α und teilen die Domäne für die Interaktion mit der cGKI sowie die Sequenz von Exon 5a. Die cGKI

Phosphorylierungsstelle und die C-terminale TMD fehlt den trunkierten Varianten. Es ist eine Vielzahl von Proteinisoformen bekannt, die durch alternatives Spleißen generiert werden und in ihren Bindeeigenschaften mit kleinen Molekülen, wie Hormone, und mit Makromolekülen, wie Proteine und DNA, differieren. Der Effekt des alternativen Spleißens kann ein kompletter Verlust der Bindung oder eine 2-10-fach veränderte Bindeaffinität sein (Stamm *et al.*, 2005). Häufig haben Isoformen, deren Domäne für die Interaktion mit anderen Proteinen deletiert ist, einen dominant negativen Einfluss auf die Isoform, deren Bindedomäne vorhanden ist (Stamm *et al.*, 2005).

Da eine mögliche dominant negative Funktion der IRAG Isoformen im Gastrointestinaltrakt spekuliert wurde, wurde in glatten Muskelzellen des Kolons CoSMC die spezifische Rolle der Isoformen bei der Kalziumregulation untersucht. Die funktionellen Unterschiede von N-terminalen und internen IRAG Isoformen sind nicht untersucht worden. Der Anstieg von intrazellulärem Kalzium in CoSMC wurde durch Bradykinin induziert. Bradykinin ist ein Nonapeptid, das die Bradykininrezeptoren B1 und B2 stimuliert, zwei G-Protein gekoppelte Rezeptoren, die auf glatten Muskelzellen exprimiert werden (Butt *et al.*, 1995). Die Aktivierung der Phospholipase C zur IP₃-Synthese ist Folge der Bradykinin-Bindung an seinen Rezeptor. An glatten Muskelzellen des Kolons wurde gezeigt, dass Bradykinin in Abwesenheit von extrazellulärem Kalzium fähig ist, die intrazellulären Kalziumkonzentrationen zu steigern. Bradykinin induziert daher den Kalziumausstrom aus IP₃-sensitiven Speichern in das Zellinnere (Fritsch *et al.*, 2004). In Kotransfektionsstudien wurde die Funktionalität der Isoformen in bradykininstimulierten Kalziumtransienten untersucht: Die Isoformen wurden zusammen mit dem funktionellen IRAG α in glatten Muskelzellen des Kolons exprimiert und der cGMP-abhängige Einfluss der IRAG Isoformen β , γ und δ auf die Inhibition IP₃-induzierter Kalziumtransienten wurde gemessen. Die Transfektion von IRAG α alleine führt zu einer 37%-igen, cGMP-abhängigen Inhibierung des bradykininstimulierten Anstiegs von intrazellulärem Kalzium in CoSMC. Die Kotransfektion von IRAG α und der Proteinisoform IRAG β , oder der Isoform γ hat die inhibitorische Funktion des endogenen und rekombinanten IRAG α mit einem cGMP-inhibitorischen Effekt vollständig aufgehoben. IRAG β und IRAG γ reduzieren daher signifikant die cGMP/cGKI-induzierte inhibitorische Funktion von IRAG α auf die hormoninduzierten Kalziumtransienten glatter gastrointestinaler Muskelzellen und stellen einen wichtigen Mechanismus zur Regulation von IRAG in glatten Muskelzellen dar. Dagegen wurde eine Verstärkung des Bradykinin-stimulierten Effekts durch Kotransfektion von IRAG δ erreicht. Der relative intrazelluläre Kalziumgehalt steigt in diesen CoSMC Kalziumtransienten um 40%. Die relative hohe Homologie in der mRNA Sequenz zwischen IRAG β und IRAG γ von 71% verglichen mit der deutlich geringeren Homologie zwischen IRAG β und IRAG δ von 56% oder zwischen IRAG γ und IRAG δ von 39% könnte die unterschiedlichen Effekte in der Regulation der Kalziumkonzentration erklären. Die mRNA Sequenzen von IRAG β und

IRAG γ unterscheiden sich lediglich durch die alternative Insertion des internen Exons Nummer 7. In ihrer Proteinstruktur ist die cGKI Interaktionsstelle enthalten, sowie eine C-terminale Region, die durch ein neu identifiziertes letztes Exon kodiert wird, deren Bedeutung aber nicht klar ist. IRAG δ hat in seiner Proteinstruktur ebenfalls die cGKI Interaktionsstelle. Der C-Terminus unterscheidet sich von den beiden anderen Isoformen, da dieser von einem weiteren neu identifizierten letzten Exon (20) kodiert wird. Die Funktion dieser Region ist ebenfalls unklar. Man könnte nun spekulieren, dass die trunkierten IRAG Proteine in Abhängigkeit ihres N- und C-Terminus mit unterschiedlichen Proteinen interagieren. Bei Verlust beider TMD in der Struktur der Isoformen könnte man vermuten, dass die löslichen Proteine entweder mit der cGKI α oder der cGKI β interagieren. Würde die cGKI β , die Isoform, die nach ihrer Aktivierung durch cGMP von IRAG zum ER/SR dirigiert wird (Geiselhöringer *et al.*, 2004) und für die Inhibierung des Kalziumausstroms aus IP $_3$ -sensitiven Speichern verantwortlich ist (Schlossmann *et al.*, 2000; Fritsch *et al.*, 2004), entweder die zytosolische IRAG β oder IRAG γ Isoform binden, könnte die Translokation der cGKI β zum ER/SR und die inhibierende Wirkung auf hormoninduzierte

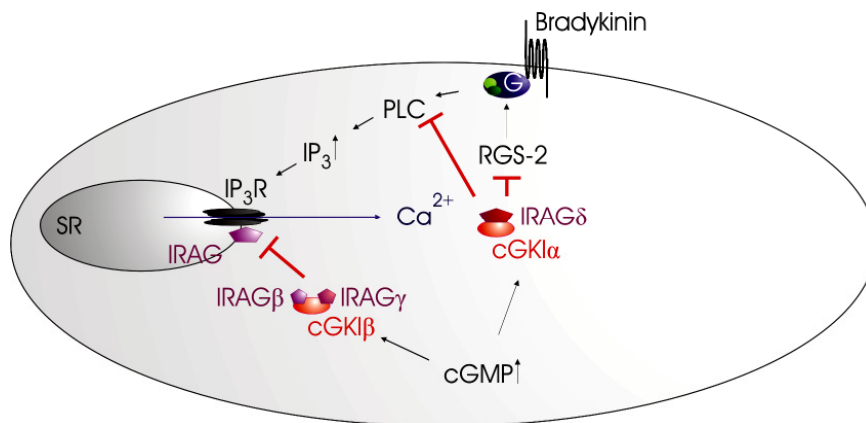


Abb. 28: Hypothetisches Modell für den dominant negativen Effekt der IRAG Isoformen auf Bradykinin-induzierte Kalziumtransienten. Die Interaktion der cGKI β mit IRAG β und IRAG γ könnte die Translokation der Kinase zum SR und die Interaktion mit IRAG blockieren. Die Inhibition des IP $_3$ -induzierten Kalziumausstroms aus dem SR in die Zelle wäre gehemmt. Eine cGKI α -IRAG δ Interaktion könnte durch den Verlust der cGKI α -inhibierenden Aktivität auf die IP $_3$ -Synthese einen Anstieg in intrazellulärem Kalzium und die Kontraktion der Zelle zur Folge haben. Die cGKI α inhibiert die IP $_3$ -Synthese entweder direkt über die Inaktivierung der Phospholipase C (PLC) oder indirekt über die Phosphorylierung von RGS-2, das die Hemmung der IP $_3$ -Synthese über die Inaktivierung des Gq-Proteins vermittelt.

Kalziumtransienten blockiert werden. Von der cGKI α wird angenommen, dass diese Isoform die Inhibition der IP $_3$ -Synthese über die direkte Inaktivierung der Phospholipase C oder die Phosphorylierung von RGS-2 induziert, das signifikant die GTPase Aktivität des Gq-Proteins von G-Protein gekoppelten Rezeptoren reduziert (Xia *et al.*, 2001; Tang *et al.*, 2003). Möglicherweise wird IRAG δ spezifisch von dieser Isoform gebunden. Die Inaktivierung der

cGKI α blockiert die Inhibierung der IP₃-Synthese, ein Anstieg von IP₃-induziertem Kalzium und die Kontraktion der Muskelzelle wären die Folge (Abb. 28). Die dominant negative Funktion der Isoformen hätte *in vivo* weitere Auswirkungen auf IP₃-unabhängige cGKI-vermittelte Prozesse. Die IRAG Isoformen würden so die Aktivität der cGKI und daher die Regulation der gastrointestinalen Motilität dominant negativ beeinflussen.

Neben der eben erwähnten Hypothese für die trunkierten, löslichen IRAG Isoformen kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Isoformen in ihrem N-Terminus eine durch das Exon 1d kodierte TMD enthalten und diese Proteine daher in den Membranen des ER/SR verankert sind. Die trunkierten IRAG Proteine könnten einen heteromeren Komplex mit IRAG 1a, 1b, 2 oder IRAG α ausbilden und so ebenfalls zur Reduktion der IRAG-vermittelten Funktionalität führen. Ein dominant negativer Einfluss von Proteinisoformen wurde bereits für einige Proteine beschrieben, die bei der Regulation von intrazellulärem Kalzium eine Rolle spielen, unter anderem eine Isoform des Ryanodinrezeptors oder des TRPC2-Kanals: Die Isoform des Ryanodinrezeptors 3 (AS-8a) bildet in HEK-293 keinen funktionellen Rezeptor aus, aber einen heteromeren Komplex mit den Ryanodinrezeptoren 2 und 3 und verringert so deren Sensitivität für Koffein (Jiang *et al.*, 2003). Auch die Interaktion der Spleißvariante smTRPC2 des TRPC2-Kanals führt zu einer veränderten Funktionalität des TRPC2-Kanals. Diese Bindung bewirkt einen verringerten erythropoietininduzierten TRPC2-abhängigen Kalziuminflux (Chu *et al.*, 2005). Die Stimulation des bradykinininduzierten Anstiegs von intrazellulärem Kalzium in CoSMC ausgelöst durch die Expression von IRAG δ könnte durch eine weitere bereits beschriebene Funktion erklärt werden: Die Spleißvariante SV1 des BK-Kanals reguliert negativ die BK_{ca} Expression in HEK293T Zellen, in dem SV1 die Untereinheiten des Kanals, α oder β 1, im ER zurückhält und so den Transport der Untereinheiten in die Plasmamembran stoppt (Zarei *et al.*, 2001). Es könnte daher spekuliert werden, dass IRAG δ den Transport von IRAG in die SR-Membran stoppt und einen Funktionsverlust des cGKI/IP₃R/IRAG-Komplexes bewirkt. In künftigen Experimenten sollte die biochemische Interaktion und deren Auswirkungen auf den cGKI/IP₃R/IRAG-Komplex untersucht werden.

Durch unterschiedliche Expressionsniveaus der C-terminal trunkierten Varianten ist es möglich, die Funktion von IRAG oder der cGKI posttranslationell zu regulieren und damit die intrazellulären Kalziumkonzentrationen zu kontrollieren. Die quantitative Expression aller IRAG mRNA Varianten ist in glattmuskulären gastrointestinalen Geweben um das circa 5-fache höher als in den Geweben wie Gehirn, Rückenmark, Leber, Niere, Plazenta und Trachea. Im Herzmuskel ist die IRAG Expression ebenfalls geringer als in den glatten Muskelgeweben. Die Daten stimmen überein mit den kürzlich veröffentlichten Daten über die Expression von IRAG in glattmuskulären Geweben, Gehirn, Herz und Trachea der Maus (Geiselhöringer *et al.*, 2004). Innerhalb des GIT ist die humane IRAG Expression im Duodenum am geringsten. Im Dünndarm (Ileum) der Maus wurde immunologisch ebenfalls eine geringere Expression von IRAG verglichen mit dem Magen und dem Kolon

nachgewiesen (Geiselhöringer *et al.*, 2004). Es sind keine Unterschiede in der Expression von IRAG mRNA in fötalem und adulten Gehirn- und Lebergewebe, IRAG spielt daher vermutlich keine Rolle in der Entwicklung dieser Organe. 0,2-0,8-fach exprimiert werden die trunkierten mRNA Varianten verglichen mit der Gesamtheit aller IRAG mRNA Transkripte. Der geringste Anteil der trunkierten mRNA Varianten ist mit etwa 20% in der Trachea, im Muskel des Pylorus und des Kolons, der höchste Anteil mit etwa 80% im Herzen und Skelettmuskel. Die cGKI/IRAG-vermittelte Kalziumkonzentration wird demnach in Trachea, im Pylorus und im Kolon durch die niedrige Expression der Isoformen deutlich geringer reguliert, als im Herz und im Skelettmuskel. Daraus lässt sich schließen, dass volle Länge IRAG Varianten für die physiologische Funktion dieser Organe bzw. Abschnitte des Gastrointestinaltrakts essentiell sind und die trunkierten Varianten z.B. im Herz und Skelettmuskel eine bisher unbekannte Rolle spielen. Eine mittlere mRNA Expression der trunkierten Varianten ist in den restlichen gastrointestinalen Gewebsabschnitten und untersuchten Geweben. Die Expression von unterschiedlichen C-terminalen IRAG Proteinen scheint daher eine wichtige Rolle in der Regulation gastrointestinaler Motilität zu spielen. Welchen Einfluss die alternativ gespleißten IRAG Varianten in kalziumregulierten Prozessen, wie der gastrointestinalen Motilität, der Genexpression, dem Zellwachstum, der Differenzierung und dem Zelltod, sowie in pathophysiologischen Prozessen haben, bleibt spekulativ und sollte in zukünftigen Experimenten untersucht werden.

ESP1/CRP2

In der RACE-PCR wurde gezeigt, dass keine mRNA Varianten vom *ESP1/CRP2* Gen vorhanden sind. Demnach ist *ESP1/CRP2* auf Chromosom 14q32.3 lokalisiert und besteht aus acht kodierenden Exons und sieben nichtkodierenden Introns, die zur Translation eines 23 kDa großen Proteins führen (Karim *et al.*, 1996). Die Expression von *ESP1/CRP2* mRNA ist eine ubiquitäre mit der höchsten quantitativen Expression in Plazenta, Lunge, Herz und den gastrointestinalen Gewebsabschnitten. Dieses Ergebnis stimmt überein mit den Northern Blot Ergebnissen der Arbeitsgruppe um Karim, die eine höchste *ESP1/CRP2* mRNA Expression in den humanen Geweben aus dem Herzen, der Lunge, der Plazenta und des Hodengewebes nachgewiesen haben (Karim *et al.*, 1996). Interessanterweise ist die Expression in fötalem Gehirn doppelt so hoch wie in adultem Gehirn. Eine entwicklungsabhängige Expression konnte schon für andere LIM-Proteine gezeigt werden: Während der Embryogenese der Maus wird *CRP2/SmLIM* mRNA herunterreguliert (Henderson *et al.*, 2002). Eine spezifische Funktion scheint *ESP1/CRP2* in glatten Muskelzellen nicht einzunehmen, vielmehr spielt es eine funktionelle Rolle in einer Vielzahl von verschiedenen Zelltypen in unterschiedlichen Zellstadien des humanen Organismus. Es ist noch nicht eindeutig, welche cGMP-abhängigen Kinasen *ESP1/CRP2* *in vivo* aktivieren. *CRP2* der Ratte wird *in vitro* nach cGMP-Stimulation durch die cGKI α , die cGKI β und die cGKII phosphoryliert (Huber *et al.*, 2000). *ESP1/CRP2* wird hoch in der Lunge exprimiert, im Gegensatz zur cGKI β , die dort nicht exprimiert wird

(Geiselhöringer *et al.*, 2004). Dagegen werden die cGKI α , cGKII und die cAK in der Lunge exprimiert und könnten die ESP1/CRP2-aktivierenden Kinasen in diesen Zellen darstellen (Lange-Carter *et al.*, 1991; Hofmann, 2004). Die cGK-abhängige Funktionalität von ESP1/CRP2 in glatten Muskelzellen des Kolons wurde untersucht. Die Sequenz von ESP1/CRP2 enthält ein nukleäres Lokalisationssignal, weswegen die subzelluläre Lokalisation dieses Proteins in Abhängigkeit des NO-Signalweges charakterisiert wurde: ESP1/CRP2 transloziert NO-abhängig in den Zellkern von CoSMC, was durch eine spezifische Blockade der cGKI nicht inhibiert werden konnte. cGMP stimuliert ebenfalls die ESP1/CRP2 Translokation in den Zellkern, die durch die cGKI-Blockade vollständig inhibiert wurde. Es gibt daher cGKI-unabhängige Signalwege, die zur Aktivierung von ESP1/CRP2 führen. Denkbar wäre eine Aktivierung durch die NO-aktivierte cAMP-abhängige Proteinkinase, wie es für das LIM-Protein LASP gezeigt wurde: LASP ist ein Aktin-bindendes Protein, das als neues Substrat der cAMP- und cGMP-abhängigen Proteinkinase beschrieben wurde. Die cAK und cGKI phosphorylieren LASP *in vitro* an Serin¹⁴⁶ und eine Mutation an diesem Serin (S146D) führt in Kosedimentationsversuchen zu einer verringerten Bindungsaffinität von LASP S146D zu F-Aktin. Die LASP S146D Lokalisation in PtK2 Zellen ist verglichen mit dem Wildtyp LASP nicht mehr in den Ausläufern der Zelle und in Regionen um Zell-Zell-Kontakte und es konnte eine 25%ige verringerte Motilität dieser Zellen verzeichnet werden. Eine cAK- und cGK-abhängige Beteiligung von LASP in der Zytoskeltorganisation und der Zellmotilität wird für dieses Protein in Betracht gezogen (Butt *et al.*, 2003).

Der NO-Signaltransduktionsweg könnte möglicherweise auch für die Aktivierung der ESP1/CRP2 homologen LIM-Proteine zur Translokation in den Zellkern zuständig sein, was bis heute nicht gezeigt werden konnte. Die membranassoziierte Lokalisation von ESP1/CRP2 und die Protein-Proteininteraktionsvermittelnde Proteinstruktur von ESP1/CRP2, sowie Kenntnisse über ESP1/CRP2 homologe Proteine deuten auf eine Zinkfinger-vermittelte Interaktion mit Zytoskelett-assoziierten Proteinen wie α -Aktin und Zyxin hin. α -Aktin ist ein essentielles Strukturprotein der Myofibrillen und seinerseits an Aktin gebunden. Durch die Interaktion von CRP-Proteinen mit α -Aktin wird eine Lokalisation der CRP-Proteine entlang der Aktin-Fasern des Zytoskeletts und an den fokalen Adhäsionsplaques in embryonalen Fibroblasten der Ratte und in glatten Muskelzellen bewirkt (Pomies *et al.*, 1997). Zyxin ist ebenfalls ein LIM-Protein und geht neben der Bindung mit CRP-Proteinen auch eine direkte Interaktion mit α -Aktin ein (Crawford *et al.*, 1992). α -Aktin ist zusätzlich noch an die β 1-Untereinheit von Integrin gebunden. An den fokalen Adhäsionsplaques wird daher ein Komplex aus Integrin, α -Aktin, Zyxin und einem CRP-Protein gebildet (Pomies *et al.*, 1997). Einige zu ESP1/CRP2 homologe Proteine, CRP1, CRP2/SmLIM und CRP3/MLP, akkumulieren entlang von Aktin- und Zyxinfilamenten im Zytosol und im Zellkern, was durch eine konservierte nukleäre Lokalisationssequenz KKYGPK vermittelt wird (Arber *et al.*, 1996). Dem LIM-Protein TLP fehlt diese Sequenz und ist ausschließlich im Zytoplasma

lokalisiert (Kirchner *et al.*, 2001). Für CRP1, CRP2/SmLIM und CRP3/MLP wurde bereits gezeigt, dass diese Proteine mit α -Aktin und Zyxin über die Zinkfingerstrukturen interagieren und dass diese Proteininteraktion für die Aufrechterhaltung der Motilität der Zellen verantwortlich ist (Arber *et al.*, 1996; Pomies *et al.*, 1997; Schmeichel *et al.*, 1998). Die CRP3/MLP knockout Maus hat eine stark vergrößerte Herzkammer und eine Reduktion der kontraktile Funktion (Esposito *et al.*, 2000). Kardiomyozyten dieser Tiere haben eine irreguläre Oberfläche und starke Veränderungen der Zellausläufer, so dass ein Einfluss von CRP3/LIM auf sowohl Zell-Matrix-, als auch Zell-Zell-Kontaktstrukturen spekuliert wird (Ehler *et al.*, 2001). Die kürzlich generierte ESP1/CRP2 *knockout* Maus hat keine gastrointestinalen Defekte, aber einen verringerten Blutdruck (persönliche Information von Prof. Ruth, Universität Tübingen). Die NO-abhängige Funktion von ESP1/CRP2 liegt daher nicht in der Relaxation glatter Muskelzellen, aber höchstwahrscheinlich in der Aufrechterhaltung des Tonus von Gefäßmuskelzellen, der wahrscheinlich über eine Interaktion von Zytoskelettproteinen vermittelt wird.

Eine Beteiligung bei der Regulation des Zellwachstums und der Zelldifferenzierung konnte in verschiedenen Zellsystemen für NO, cGMP und die cGKI nachgewiesen werden (Pfeifer *et al.*, 1999). Eine hypothetische Rolle von ESP1/CRP2 könnte daher zum einen in der Aufrechterhaltung des Zytoskeletts, in der Motilität, aber auch in der Regulation der Genexpression sein: ESP1/CRP2 der Maus wurde im Komplex mit dem Translationsinitiationsfaktor eIF-4AI (eukaryotic translation initiation factor) im Zwei-Hybrid-System gefunden. Dieser Faktor führt durch Bindung mit dem eiF-4A-Komplex zur Initiation der Translation. Eine Bindung von ESP1/CRP2 an eiF-4AI hätte zur Folge, dass kein funktioneller eiF-4A Translationsinitiationskomplex gebildet und die Translation von Proteinen nicht gestartet würde (Poeschl, Doktorarbeit 2003). Auch für LIM-Proteine konnte die Interaktion mit spezifischen Proteinen nachgewiesen werden, die an der Regulation der Genexpression beteiligt sind: LIM-Proteine interagieren neben gemeinsamen Partnern, wie α -Aktin und Zyxin, mit spezifischen Partnern. So wurde für das CRP2/SmLIM gezeigt, dass die erste LIM-Domäne, die die ersten beiden Zinkfinger bildet, spezifisch mit dem Transkriptionsfaktor SRF (serum responsive factor) interagiert und dass eine Mutation in der ersten LIM-Domäne zu einer reduzierten SMA (alpha-smooth muscle actin)-Promotoraktivität führt. Die zweite LIM-Domäne geht eine Interaktion mit dem Transkriptionsfaktor GATA4 ein und auch hier konnte eine verringerte SMA-Promotoraktivität nach Mutation der zweiten LIM-Domäne beobachtet werden (Chang *et al.*, 2003). Die Interaktion von überexprimierten CRP2/SmLIM und SRF oder GATA führte in pluripotenten 10T1/2 mesenchymalen Zellen der Maus zur Hochregulierung der Genexpression der glattmuskulären Proteine SM δ A, SM22, SM-Calponin, SM-MHC und SM δ A. In proepikardialen Zellen führte die Transfektion von N-terminal deletierten CRP2/SmLIM, das nachweislich CRP2/SmLIM dominant negativ bindet, zur Inhibition der Gefäßmuskelzellendifferenzierung. CRP2/SmLIM könnte daher an der Bildung von

Multiprotein-DNA-bindenden Komplexen beteiligt sein, die die Transkriptionsfaktoren SRF und GATA beinhalten. Eine mögliche scaffold Funktion von CRP2/SmLIM im Zytoplasma für die Aufrechterhaltung des glattmuskulären Zytoskeletts, das involviert ist in Zellsubstratadhäsion und Kontraktibilität, und eine Funktion von CRP2/SmLIM im Zellkern bei der Differenzierung glatter Muskelzellen wird in Betracht gezogen (Chang *et al.*, 2003).

Der bekannte Einfluss des NO-Signalweges auf die Zelldifferenzierung, das Zellwachstum, die Genexpression könnte durch ESP1/CRP2 vermittelt werden und sollte im Rahmen dieser Arbeit mit akuten *knockdowns* der ESP1/CRP2 Expression *in vitro* untersucht werden. RNA Interferenz- und Antisenseoligonukleotidbehandlung von SW480- und HeLa-Zellen führte zu nicht reproduzierbaren Ergebnissen auf mRNA- und Proteinebene. Oftmals wurde eine Induktion der mRNA Expression von ESP1/CRP2 und GAPDH nach Antisensebehandlung in SW480 Zellen erreicht. Dies könnte durch eine unspezifische Bindung der DNA Moleküle an mRNAs erklärt werden, die für die Regulation der Genexpression von ESP1/CRP2 wichtig sind. Alternativ könnte eine Aktivierung des Interferonsystems durch die siRNA oder Antisenseoligonukleotidbindung die Expression von ESP1/CRP2 induzieren. Die funktionelle Bedeutung von ESP1/CRP2 konnte daher auf diesem Wege nicht untersucht werden. Die Technologie des *gene silencings* durch kleine interferierende RNA Moleküle stellt seit kurzer Zeit eine äußerst interessante *in vitro* Methode dar, um die Expression des zu untersuchenden Gens zu verhindern und so Auskünfte über die spezifische Funktionalität des Proteins zu erhalten. Diese Strategie zur Regulation der Genexpression konnte *in vivo* in *C. elegans* erstmals identifiziert werden und ist bis heute in vielen Organismen, darunter im Menschen nachgewiesen worden (McManus und Sharp, 2002). Die Effektivität von transfizierten siRNA Molekülen zur Herabregulation der Genexpression ist allerdings abhängig von mehreren Faktoren und könnte die ESP1/CRP2 Ergebnisse erklären: 1.) Der Spezifität der siRNA, 2.) der Transfektionsmethode, 3.) dem Zelltyp und 4.) der Proteininstabilität. Desweiteren gibt es in Säugetieren keinen intrazellulären Prozess, der zur Vervielfältigung von siRNA Molekülen führt, wie dies zum Beispiel in einfachen Eukaryoten durch eine RNA-abhängige Polymerase erreicht wird (McManus *et al.*, 2002). Die dadurch gesteigerte Anzahl von siRNA Molekülen verstärkt die Hemmung der Genexpression. Die Effektivität von Antisenseoligonukleotiden, die wie siRNAs einen heterologen Komplex mit der exprimierten mRNA eingehen, ist ebenso abhängig von den oben erwähnten Faktoren.

Die Ergebnisse dieser Arbeit demonstrieren die NO/cGMP/cGKI-vermittelte Inhibierung von hormoninduzierten Kalziumtransienten in glatten Muskelzellen des Kolons, die entscheidend über das cGKI Substratprotein IRAG, das in einem Komplex mit dem IP₃R am sarkoplasmatischen Retikulum vorliegt, reguliert wird. N-terminal trunke IRAG Isoformen heben einerseits diese Inhibierung auf, führen andererseits zur Induktion des hormoninduzierten Anstiegs von intrazellulärem Kalzium und stellen einen weiteren

Mechanismus in der komplexen Regulation der intrazellulären Kalziumkonzentration dar. Aussagen über das cGKI Substratprotein ESP1/CRP2 bleiben spekulativ. ESP1/CRP2 wird ubiquitär exprimiert und stellt daher ein cGK aktiviertes Protein in diversen Geweben dar. Ein NO-abhängiger Einfluss von ESP1/CRP2 auf die Zelldifferenzierung, die Zellmotilität, das Zellwachstum und auf die Genexpression bleibt spekulativ und stellt ein interessantes Forschungsziel für die Zukunft dar.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Die Regulation der Kontraktilität glatter Muskelzellen ist essentiell für viele biologische Prozesse wie zum Beispiel kardiovaskuläre Homeostasis und gastrointestinale Motilität. Die Motilität des Gastrointestinaltrakts (GIT) wird über das enterische Nervensystem reguliert, das mit Motoneuronen die Muskulatur des GIT innerviert. Neurotransmitter, die von exzitatorischen Nervenzellen ausgeschüttet werden, führen nach Aktivierung diverser Signalkaskaden unter anderem zu einem Anstieg an intrazellulärem Kalzium und daher zur Kontraktion der Zelle. Inhibitorische Motoneurone dagegen initiieren die Ausschüttung von vor allem nicht-adrenergen nicht-cholinergen (NANC) Neurotransmittern und somit die Relaxation der Zelle. Stickstoffmonoxid (NO) stellt im humanen Kolon den Hauptneurotransmitter zur Relaxation glatter Muskelzellen dar (Porter *et al.*, 1997). NO-aktivierte Signalkaskaden führen zur Reduktion von intrazellulärem Kalzium oder zu einer reduzierten Kalziumsensitivität der Zelle und daher zu einem verminderten oder verlorengegangenen kontraktile Stimulus (Somlyo *et al.*, 2000). NO vermittelt diese Prozesse hauptsächlich über die Aktivierung der löslichen Guanylatzyklasen, die zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP) synthetisieren. Dieser Anstieg von cGMP initiiert die Aktivierung der cGMP-abhängigen Proteinkinase I (Pfeifer *et al.*, 1998; Sausbier *et al.*, 2000). Einige Effektorproteine der cGKI sind bekannt, die zur Inhibierung der Inositol-1,4,5-Triphosphat (IP₃)-Synthese (Xia *et al.*, 2001), zur Aktivierung des maxi-K⁺-Kanal (BK_{Ca}) (Yamakage *et al.*, 1996), einer verminderten Kalziumsensitivität der Zelle (Surks *et al.*, 1999) oder zur Inhibierung des IP₃-induzierten Kalziumeinstroms aus intrazellulären Speichern in die Zelle führen (Schlossmann *et al.*, 2000). Die entscheidende Rolle der cGKI in der Funktionalität gastrointestinaler Muskelzellen wurde klar, als cGKI *knockout* Mäuse generiert wurden und diese Tiere den Verlust NO-abhängiger glatter Muskelzellrelaxation mit einhergehenden schweren gastrointestinalen Fehlfunktionen aufwiesen.

Kürzlich konnten die beiden Proteine IRAG (IP₃Rezeptor-assoziiertes cGMP-abhängiges Kinase Substrat) und ESP1/CRP2 (estradiol-stimulated protein 1/cysteine-rich protein 2) als Substratproteine der cGKI identifiziert werden (Schlossmann *et al.*, 2000; Huber *et al.*, 2000).

IRAG ist ein wichtiger Bestandteil der cGKI-vermittelten Regulation intrazellulären Kalziums: Die Phosphorylierung von IRAG durch die cGKI inhibiert den IP₃-induzierten Kalziumausstrom aus intrazellulären Speichern nach Koexpression der beiden Proteine in COS-7-Zellen (Schlossmann *et al.*, 2000; Ammendola *et al.*, 2001). In humanen glatten Muskelzellen des Gastrointestinaltrakts war dieser inhibitorische Effekt nach Herabregulation der IRAG Expression nahezu komplett aufgehoben (Fritsch *et al.*, 2004). Eine Deletion des IRAG Gens in Mäusen führt zu schweren gastrointestinalen Fehlfunktionen: Diese Tiere haben einen dilatierten Gastrointestinaltrakt mit einer gestörten Motilität (Geiselhöringer *et al.*, 2004). Im Rahmen dieser Arbeit konnte mit der RACE-PCR gezeigt werden, dass das Gen kodierend für IRAG durch den Gebrauch von verschiedenen Promotoren, durch alternatives

Spleißen und alternative Polyadenylierung sowohl transkriptionell als auch posttranskriptionell sehr komplex reguliert wird: Drei 5' IRAG mRNA Varianten, die durch den Gebrauch von verschiedenen Promotoren generiert werden, als auch vier alternativ gespleißte 3' mRNA Varianten wurden identifiziert, wovon eine ein zusätzlich inseriertes Exon in seiner mRNA Struktur hat (IRAG α) und drei durch alternative Polyadenylierung trunkeerte mRNA Varianten sind (IRAG β , γ und δ). Die Expression dieser 5' und 3' mRNA Varianten konnte entlang des gesamten humanen Gastrointestinaltrakts, in der humanen glatten Muskelzelllinie CoSMC und der Kolonkarzinomzelllinie SW480 mit der PCR als auch quantitativ mit der Echt-Zeit-RT-PCR nachgewiesen werden. Die Transfektion der 3' mRNA Varianten in CoSMC und COS-7-Zellen führte zur Expression des volle Länge Proteins IRAG α und den trunkeerten Proteinen IRAG β , IRAG γ und IRAG δ . In Abhängigkeit vom cGMP/cGKI-Signaltransduktionsweg wurde deren Funktionalität in CoSMC auf den bradykininstimulierten IP₃-induzierten Kalziumausstrom aus intrazellulären Speichern hin untersucht. In *in vivo* Kalziummessungen zeigte sich, dass IRAG α cGMP/cGKI-abhängig einen starken inhibitorischen Einfluss auf bradykinininduzierte CoSMC Kalziumtransienten hat. Die mit IRAG α kotransfizierten trunkeerten Isoformen IRAG β und IRAG γ führten zu einer signifikanten Reduktion des cGMP/cGKI-induzierten inhibitorischen Effekts von IRAG α . Die Kotransfektion von IRAG δ dagegen führte zu einem kompletten Verlust des inhibitorischen Effekts von cGMP/cGKI-stimulierten, endogenem und überexprimiertem IRAG und sogar zur Induktion des bradykininstimulierten Anstiegs von intrazellulärem Kalzium.

Die funktionelle Rolle des zweiten cGKI Effektorproteins ESP1/CRP2, das in dieser Arbeit untersucht wurde, ist bis dato nicht geklärt. Die ESP/CRP2 *knockout* Maus hat keine gastrointestinalen Defekte, aber einen verringerten Blutdruck (persönliche Mitteilung von Prof. Ruth, Universität Tübingen). Eine NO-abhängige Funktion in der Regulation der Relaxation glatter Muskelzellen des Gastrointestinaltrakts ist daher auszuschließen. Möglicherweise spielt ESP1/CRP2 eine Rolle bei der Aufrechterhaltung des Tonus von Gefäßmuskelzellen, da von einigen verwandten Proteinen diese Funktionalität bereits gezeigt werden konnte. Diese Proteine translozieren nach Aktivierung in den Zellkern und interagieren dort mit Strukturproteinen zur Aufrechterhaltung der Motilität (Arber *et al.*, 1996; Pomies *et al.*, 1997; Schmeichel *et al.*, 1998). In EGFP-ESP1/CRP2-Transfektionsversuchen konnte gezeigt werden, dass auch ESP1/CRP2 in Abhängigkeit von NO in den Zellkern von CoSMC transloziert. Die Aktivierung der Translokation war sowohl cGKI-abhängig als auch cGKI-unabhängig. ESP1/CRP2 mRNA konnte mit der Echt-Zeit-RT-PCR entlang des humanen Gastrointestinaltrakts als auch in diversen humanen Organen mit einer ubiquitären Expression nachgewiesen werden. Eine funktionelle Rolle als Strukturprotein in diesen Zellen kann in Betracht gezogen werden.

6 LITERATUR

- Ainger K, Avossa D, Diana AS, Barry C, Barbares E, Carson JH. Transport and localization elements in myelin basic protein mRNA. *J Cell Biol.* 1997;138:1077-1087.
- Alioua A, Tnaka Y, Wallner M, Hofmann F, Ruth P, Meera P, Toro L. The large conductance, voltage-dependent, and calcium-sensitive K⁺ channel, Hslo, is a target of cGMP-dependent protein kinase phosphorylation in vivo. *J Biol Chem.* 1998;273:32950-32956.
- Allescher HD, Kurjak M, Huber A, Trudrung P, Schusdziarra V. Regulation of VIP release from rat enteric nerve terminals: evidence for a stimulatory effect of NO. *Am J Physiol.* 1996;271:568-574.
- Ammendola A, Geiselhoring A, Hofmann F, Schlossmann J. Molecular determinants of the interaction between the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-associated cGMP kinase substrate (IRAG) and cGMP kinase I β . *J Biol Chem.* 2001;276:42153-42159.
- Andre M, Latado H, Felley-Bosco E. Inducible nitric oxide synthase-dependent stimulation of PKGI and phosphorylation of VASP in human embryonic kidney cells. *Biochem Pharmacol.* 2005;69:595-602.
- Arber S, Caroni P. Specificity of single LIM motifs in targeting and LIM/LIM interaction in situ. *Genes and Dev.* 1996;10:289-300.
- Baranano DE, Snyder SH. Neural roles for heme oxygenase: Contrasts to nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98:10996-11002.
- Berridge MJ, Bootman MD, Roderick HL. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2003;4:517-529.
- Birkenmeier EH, Gordon JI. Developmental regulation of a gene that encodes a cysteine-rich intestinal protein and maps near the murine immunoglobulin heavy chain locus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986;83:2516-2520.
- Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem.* 1979;72:248-254.
- Butt SK, Dawson LG, Hall JM. Bradykinin B1 receptors in the rabbit urinary bladder: induction of responses, smooth muscle contraction, and phosphatidylinositol hydrolysis. *Br J Pharmacol.* 1995;114:612-617.
- Butt E, Gambaryan S, Gottfert N, Galler A, Marcus K, Meyer HE. Actin binding of human LIM and SH3 protein is regulated by cGMP- and cAMP-dependent protein kinase phosphorylation on serine 146. *J Biol Chem.* 2003;278:15601-7.
- Casteel DE, Zhuang S, Gudi T, Tang J, Vuica M, Desiderio S, Pilz RB. cGMP-dependent protein kinase I β physically and functionally interacts with the transcriptional regulator TFII-I. *J Biol Chem.* 2002;277:32003-32014.

- Casteel DE, Boss GR, Pilz BR. Identification of the interface between cGMP-dependent protein kinase I and its interaction partners TFII-I and IRAG reveals a common interaction motif. *JBC*. 2005;280:38211-38218.
- Chang DF, Belaguli NS, Iyer D, Roberts WB, Wu S, Dong X, Marx JG, Moore MS, Beckerle MA, Majewsky MW, Schartz RJ. Cystein-rich LIM-only proteins CRP1 and CRP2 are potent smooth muscle differentiation cofactors. *Dev Cell*, 2003;4:107-118.
- Chu X, Tong Q, Wozney J, Zhang W, Cheung JY, Conrad K, Mazack V, Stahl R, Barber DL, Miller BA. Identification of an N-terminal TRPC2 splice variant which inhibits calcium influx. *Cell Calcium*. 2005;37:173-182.
- Cornwell TL, Pryzwansky KB, Wyatt TA, Lincoln TM. Regulation of sarcoplasmic reticulum protein phosphorylation by localized cyclic GMP-dependent protein kinase in vascular smooth muscle cells. *Mol Pharmacol*. 1991;40:923-931.
- Crawford AW, Michelsen JW, Beckerle MC. An interaction between zyxin and α -actinin. *J Cell Biol*. 1992; 116: 1381-1393.
- Dawid IB, Breen JJ, Toyama R. LIM domains: multiple roles as adapters and functional modifiers in protein interactions. *Trends Genet*. 1998;14:156-162.
- Ehler E, Horowitz R, Zuppinger C, Price RL, Perriard E, Leu M, Caroni P, Sussman M, Eppenberger HM, Perriard JC. Alterations at the intercalated disk associated with the absence of muscle LIM protein. *J Cell Biol*. 2001;153:763-772.
- Ellerbroek SM, Ellerbroek SM, Wennerberg K, Burridge K. Serine phosphorylation negatively regulates RhoA in vivo. *J Biol Chem*. 2003;278:19023-10031.
- Esposito G, Santana LF, Dilly K, Cruz JD, Lao L, Lederer WJ, Rockman HA. Cellular and functional defects in a mouse model of heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2000;279:3101-3112.
- Feil R, Hartmann J, Luo C, Wolfsgruber W, Schilling K, Feil S, Barski JJ, Meyer M, Konnerth A, De Zeeuw CI, Hofmann F. Impairment of LTD and cerebellar learning by Purkinje cell-specific ablation of cGMP-dependent protein kinase I. *J Cell Biol*. 2003;163:295-302.
- Freyd G, Kim SK, Horvitz HR. Novel cysteine-rich motif and homeodomain in the product of *Caenorhabditis elegans* cell lineage gene *lin-11*. *Nature*. 1990;344:876-879.
- Fritsch RM, Saur D, Kurjak M, Oesterle D, Schlossmann J, Geiselhoringer A, Hofmann F, Allescher HD. InsP3R-associated cGMP kinase substrate (IRAG) is essential for nitric oxide-induced inhibition of calcium signaling in human colonic smooth muscle. *J Biol Chem*. 2004;279:12551-12559.
- Fukao M; Mason HS, Britton FC, Kenyon JL, Horowitz B, Keef KD. Cyclic GMP-dependent protein kinase activates cloned BKCa channels expressed in mammalian cells by direct phosphorylation at serine 1072. *J Biol Chem*. 1999;274:10927-10935.

Gambaryan S, Wagner C, Smolenski A, Walter U, Poller W, Haase W, Kurtz A, Lohmann SM. Endogenous or overexpressed cGMP-dependent protein kinases inhibit cAMP-dependent renin release from isolated perfused kidney, microdissected glomeruli, and isolated juxtaglomerular cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998;95:9003-9008.

Geiselhoringer A, Gaisa M, Hofmann F, Schlossmann J. Distribution of IRAG and cGKI-isoforms in murine tissues. *FEBS Lett*. 2004;575:19-22.

Geiselhoringer A, Werner M, Sigl K, Smital P, Worner R, Acheo L, Stieber J, Weinmeister P, Feil R, Feil S, Wegener J, Hofmann F, Schlossmann J. IRAG is essential for relaxation of receptor-triggered smooth muscle contraction by cGMP kinase. *EMBO J*. 2004;23:4222-4231.

Graveley BR. Alternative splicing: increasing diversity in the proteomic world. *Trends Genet*. 2001;17:100-107.

Grider JR, Jin JG. Vasoactive intestinal peptide release and L-citrulline production from isolated ganglia of the myenteric plexus: evidence for regulation vasoactive intestinal peptide release by nitric oxide. *Neuroscience*. 1993;54:521-526.

Hansen MB. The enteric nervous system II. Gastrointestinal function. *Pharmacol Toxicol*. 2003;92:249-257.

Hebeiss K, Kilbinger H. Nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase inhibits acetylcholine release and excitatory motor transmission in the guinea-pig ileum. *Neuroscience*. 1998;82:623-629.

Henderson JM, Brown D, Richardson JA, Olson EN, Beckerle MC. Expression of the gene encoding the LIM protein CRP2: A developmental profile. *J Histochem Cytochem*. 2002;50:107-111.

Hofmann F, Ammendola A, Schlossmann J. Rising behind NO: cGMP-dependent protein kinases. *J Cell Sci*. 2000;113:1671-1676.

Hofmann F. The biology of cyclic GMP-dependent protein kinases. *J Biol Chem*. 2005;280:1-4.

Huang PL, Dawson TM, Bredt DS, Snyder SH, Fishman MC. Targeted disruption of the neuronal nitric oxide synthase gene. *Cell*. 1993;75:1273-1286.

Huber A, Neuhuber WL, Klugbauer N, Ruth P, Allescher HD. Cysteine-rich protein 2, a novel substrate for cGMP kinase I in enteric neurons and intestinal smooth muscle. *J Biol Chem*. 2000;275:5504-5511.

Jiang D, Xiao B, Li X, Chen SR. Smooth muscle tissues express a major dominant negative splice variant of the type 3 Ca²⁺ release channel (ryanodine receptor). *J Biol Chem*. 2003;278:4763-4769.

Karim MA, Ohta K, Egashira M, Jinno Y, Niikawa N, Matsuda I, Indo Y. Human ESP1/CRP2, a member of the LIM domain protein family: characterization of the cDNA and assignment of the gene locus to chromosome 14q32.3. *Genomics*. 1996;31:167-176.

- Karlsson O, Thor S, Norberg T, Ohlsson H, Edlund T. Insulin gene enhancer binding protein Isl-1 is a member of a novel class of proteins containing both a homeo- and a Cys-His domain. *Nature*. 1990;344:879-882.
- Kirchner J, Forbush KA, Bevan MJ. Identification and characterization of thymus LIM protein: target disruption reduces thymus cellularity. *Mol Cell Biol*. 2001;21:8592-8604.
- Kleppisch T, Pfeifer A, Klatt P, Ruth P, Montkowski A, Fässler R, Hofmann F. Long-term potentiation in the hippocampal CA1 region of mice lacking the cGMP-dependent protein kinase is normal and susceptible to inhibition of NO synthase. *J Neuroscience*. 1999;19:48-55.
- Koller A, Schlossmann J, Ashman K, Uttenweiler-Joseph S, Ruth P, Hofmann F. Association of phospholamban with a cGMP kinase signaling complex. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;300:155-160.
- Kong Y, Flick MJ, Kudla A, Konieczny SF. Muscle LIM protein promotes myogenesis by enhancing the activity of MyoD. *Mol Cell Biol* 1997;17:4750-4760.
- Kozaak M. An analysis of 5' noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nuc Acids Res*. 1987;8:125-148.
- Kwan HY., Regulation of canonical transient receptor potential isoform 3 (TRPC3) channel by protein kinase G. *G Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101:2625-2630.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227:680-685.
- Lange-Carter CA, Malkinson AM. Alterations in the cAMP signal transduction pathway in mouse lung tumorigenesis. *Exp Lung Res*. 1991;17:341-357.
- Lecci A, Santicioli P, Maggi CA. Pharmacology of transmission to gastrointestinal muscle. *Curr Opin Pharmacol*. 2002;2:630-641.
- Massberg S, Sausbier M, Klatt P, Bauer M, Pfeifer A, Siess W, Fassler R, Ruth P, Krombach F, Hofmann F. Increased adhesion and aggregation of platelets lacking cGMP-Kinase I. *J Exp Med*. 1999;189:1255-1264.
- McManus MT, Sharp PA. Gene silencing in mammals by small interfering RNAs. *Nature*. 2002;3:737-747.
- Mignone F, Gissi C, Liuni S, Pesole G. Untranslated regions of mRNAs. *Gen Biol*. 2002;3:1-8.
- Murthy KS, Zhou H, Grider JR, Makhlof GM. Inhibition of sustained smooth muscle contraction by PKA and PKG preferentially mediated by phosphorylation of RhoA. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2003;284:1006-1016.
- Newton DC, Bevan SC, Choi S, Robb GB, Millar A, Wang Y, Marsden PA. Translational regulation of human neuronal nitric-oxide synthase by an alternatively spliced 5'-untranslated region leader exon. *J Biol Chem*. 2003;278:363-644.

- Oster H, Werner C, Magnone MC, Mayser H, Feil R, Seeliger MW, Hofmann F, Albrecht U. cGMP-dependent protein kinase II modulates mPer1 and mPer2 gene induction and influences phase shifts of the circadian clock. *Curr Biol*. 2003;13:725-733.
- Pfeifer A, Klatt P, Massberg S, Ny L, Sausbier M, Hirneiss C, Wang GX, Korth M, Aszodi A, Andersson KE, Krombach F, Mayerhofer A, Ruth P, Fassler R, Hofmann F. Defective smooth muscle regulation in cGMP kinase I-deficient mice. *EMBO J*. 1998;17:3045-3051.
- Pfeifer A, Aszodi A, Seidler U, Ruth P, Hofmann F, Fassler R. Intestinal secretory defects and dwarfism in mice lacking cGMP-dependent protein kinase II. *Science*. 1996;274:2082-2086.
- Pfeifer A, Ruth P, Dostmann W, Sausbier M, Klatt P, Hofmann F. Structure and function of cGMP-dependent protein kinases. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*. 1999;135:105-149.
- Pilz RB, Casteel DE. Regulation of gene expression by cyclic GMP. *Circ Res*. 2003;93:1034-1046.
- Pomies P, Louis HA, Beckerle MC. CRP1, a LIM domain protein implicated in muscle differentiation, interacts with α -actinin. *J Cell Biol*. 1997;139:157-168.
- Porter AJ, Wattoo DA, Brookes SJ, Costa M. The neurochemical coding and projections of circular muscle motor neurons in the human colon. *Gastroenterology*. 1997;113:1916-1923.
- Sadler I, Crawford AW, Michelsen JW, Beckerle MC. Zyxin and cCRP: Two interactive LIM domain proteins associated with the cytoskeleton. *J Biol Chem*. 1992;119:1573-1587.
- Saur D, Vanderwinden JM, Seidler B, Schmid RM, De Laet MH, Allescher HD. Single-nucleotide promoter polymorphism alters transcription of neuronal nitric oxide synthase exon 1c in infantile hypertrophic pyloric stenosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101:1662-1667.
- Saur D, Neuhuber WL, Gengenbach B, Huber A, Schusdziarra V, Allescher HD. Site-specific gene expression of nNOS variants in distinct functional regions of rat gastrointestinal tract. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2002;282:349-358.
- Saur D, Paehge H, Schusdziarra V, Allescher HD. Distinct expression of splice variants of neuronal nitric oxide synthase in the human gastrointestinal tract. *Gastroenterology*. 2000;118:849-858.
- Sausbier M, Schubert R, Voigt V, Hirneiss C, Pfeifer A, Korth M, Kleppisch T, Ruth P, Hofmann F. Mechanisms of NO/cGMP-dependent vasorelaxation. *Circ Res*. 2000;87:825-830.
- Schemann M, Neunlist M. The human enteric nervous system. *Neurogastroenterol Motil*. 2004;16:55-59.
- Schlossmann J, Ammendola A, Ashman K, Zong X, Huber A, Neubauer G, Wang GX, Allescher HD, Korth M, Wilm M, Hofmann F, Ruth P. Regulation of intracellular calcium by a signalling complex of IRAG, IP3 receptor and cGMP kinase I β . *Nature*. 2000;404:197-201.

Schlossmann J, Hofmann F. cGMP-dependent protein kinases in drug discovery. *Drug Discov Today*. 2005;10:627-634.

Schlossmann J, Feil R, Hofmann F. Insights into cGMP signalling derived from cGMP kinase knockout mice. *Front Biosci*. 2005;10:1279-89.

Schlossmann J, Ammendola A, Ashman K, Zong X, Huber A, Neubauer G, Wang GX, Allescher HD, Korth M, Wilm M, Hofmann F, Ruth P. Regulation of intracellular calcium by a signalling complex of IRAG, IP3 receptor and cGMP kinase Ibeta. *Nature*. 2000;404:197-201.

Schmeichel KL, Beckerle MC. LIM domains of cysteine-rich protein 1 (CRP1) are essential for its zyxin-binding function. *Biochem J*. 1998;331:885-892.

Schricker K, Kurtz A. Liberators of NO exert a dual effect on renin secretion of isolated mouse renal juxtaglomerular cells. *Am J Physiol*. 1993;265:180-186.

Shaugnessy JD, Largaespada DA, Tian E, Fletcher CF, Cho BC, Vyas P, Jenkins NA, Copeland NG. Mrvi1, a common MRV integration site in BHX2 myeloid leukemias, encodes a protein with homology to a lymphoid restricted membrane protein Jaw1. *Oncogene*. 1999;18:2069-2084.

Somlyo AP, Somlyo AV. Signal transduction by G-proteins, rho-kinase and protein phosphatase to smooth muscle and non-muscle myosin II. *J Physiol*. 2000; 83: 177-185.

Stamm S, Ben-Ari S, Rafalska I, Tang Y, Zhang Z, Toiber D, Thanaraj TA, Soreq H. Function of alternative splicing. *Gene*. 2005;344:1-20.

Stryer L. *Biochemie*. 4. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg-Berlin-Oxford.1999.

Suhasini M, Li H, Lohmann SM, Boss GR, Pilz RB. Cyclic-GMP-dependent protein kinase inhibits the Ras/mitogen-activated protein kinase pathway. *Mol Cell Biol*. 1998;18:6983-6994.

Sun X, Kaltenbronn KM, Steinberg TH, Blumer KJ. RGS2 is a mediator of nitric oxide action on blood pressure and vasoconstrictor signaling. *Mol Pharmacol*. 2005;67:631-639.

Surks HK, Mochizuki N, Kasai Y, Georgescu SP, Tang KM, Ito M, Lincoln TM, Mendelsohn ME. Regulation of myosin phosphatase by a specific interaction with cGMP-dependent protein kinase Ialpha. *Science*. 1999;286:1583-1587.

Svitkin YV, Pause A, Haghighat A, Pyronnet S, Witherell G, Belsham GJ, Sonenberg N. The requirement for eukaryotic initiation factor 4a (eIF4A) in translation is in direct proportion to the degree of mRNA 5' secondary structure. *RNA*. 2001;7:382-294.

Tang KM, Wang GR, Lu P, Karas RH, Aronovitz M, Heximer SP, Kaltenbronn KM, Blumer KJ, Siderovski DP, Zhu Y, Mendelsohn ME. Regulator of G-protein signaling-2 mediates vascular smooth muscle relaxation and blood pressure. *Nat Med*. 2003;9:1506-1512.

- Vaandrager AB, Smolenski A, Tilly BC, Houtsmuller AB, Ehlert EME, Bot AGM, Edixhoven M, Boomaars WEM, Lohmann SM, De Jonge HR. Membrane targeting of cGMP-dependent protein kinase II is required for cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl⁻ channel activation. *Proc Natl Acad Sci*. 1998;95:1466-1471.
- Varshavsky A. The N-end rule: functions, mysteries, uses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93:12142-12149.
- Wagner C, Pfeifer A, Ruth P, Hofmann F, Kurtz A. Role of cGMP-kinase II in the control of renin secretion and renin expression. *J Clin Invest*. 1998;102:1576-1582.
- Wang Y, Newton DC, Robb GB, Kau CL, Miller TL, Cheung AH, Hall AV, VanDamme S, Wilcox JN, Marsden PA. RNA diversity has profound effects on the translation of neuronal nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96:12150-12155.
- Way JC, Chalfie M. *mec-3*, a homeobox-containing gene that specifies differentiation of the touch receptor neurons in *C. elegans*. *Cell*. 1988;54:5-16.
- Weiskirchen R, Gunther K. The CRP/MLP/TLP family of LIM domain proteins: acting by connecting. *Bioessays*. 2003;25:152-162.
- Yamakage M, Hirshman CA, Croxton TL. Sodium nitroprusside stimulates Ca²⁺-activated K⁺ channels in porcine tracheal smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 1996;338-345.
- Yuasa K, Michibata H, Omori K, Yanaka N. A novel interaction of cGMP-dependent protein kinase I with troponin T. *J Biol Chem*. 1999;274:37429-37434.
- Xia C, Bao Z, Yue C, Sanborn BM, Liu M. Phosphorylation and regulation of G-protein activated phospholipase C- β 3 by cGMP-dependent protein kinases. *J Biol Chem* 2001;276:19770-19777.
- Xie J, Roddy P, Rife TK, Murad F, Young AP. Two closely linked but separable promoters for human neuronal nitric oxide synthase gene transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92:1242-1246.
- Xiong W, Hsieh CC, Kurtz AJ, Rabek JO, Papaconstantinou J. Regulation of CCAAT/enhancer-binding protein-beta isoform synthesis by alternative translational initiation at multiple AUG start sites. *Nuc Acids Res*. 2001;29:3087-3098.
- Zarei MM, Zhu N, Alioua A, Eghbali M, Stefani E. A novel MaxiK Splice Variant exhibits dominant-negative properties for surface expression. *J Biol Chem*. 2001;276:16232-16239.
- Zhuang S, Nguyen GT, Chen Y, Gudi T, Eigenthaler M, Jarchau T, Walter U, Boss GR, Pilz RB. Vasodilator-stimulated phosphoprotein activation of serum-response element-dependent transcription occurs downstream of RhoA and is inhibited by cGMP-dependent protein kinase phosphorylation. *J Biol Chem*. 2004;279:10397-10407.

7 Genorganisation IRAG

```

1698541 cactaatata tccaaaggca tctaattctg ggttggggta agactgtaat tcaactccat
1698601 aaaatgagga ggcatttggc tgctgccaga ggtttggaaa tgtgctttta ttttcaaact
1698661 caggatgtg acactctaca gttcaatgct agcacacctg tgtgaggctt aacaacatga
1698721 ggaactgata gccagtgata cacaaatoca gcacttcctc tccatttact ctgtcaggct
1698781 gtatatgggg agcaacacat atggctttgt ggcagccaga aagtgaaggt ctttttagga
1698841 ggtgacatca acaatgacac aaacacatca ctctgcaact gaaggcaggg aaccgagactc
1698901 ctagggcta gcagagatgt cagacttcag aggcatttgg gggactcttc agatccacat 20
1698961 cctcactgaa aatccagggc ctgtttctct ccagttcact accgcttggg cagcagctcc
1699021 cactgcttca ggctggctct tgctttccag aaaagatgga ctcatgagca ctttttcage
1699081 ccctgtatat atggctattc ttatgctccc ttttggagat gtccctttcc tgcacctccc
1699141 ttgcttacia atggaatagg gtgggagagg gcctgtgctt ggaagtactc ttgcaggctt
1699201 ttctgtgggg cagctggagg tgcaggagct ctccataact gccttctctgg cttttgactc
1699261 atccagaaac aaaggtagga aacttgtgac caagtgaaca atggggccag ctgagcctgg
1699321 ccctgcttta agggaggcag agattgaaca ttccccacct ggagttctgc ttccacggcc

```

//

```

1701121 atccagaggt acacacccag agcacacttt tgaagggttg ttggctctgt gcacaggcat
1701181 gttgtgtgtg tgtacacaac agtatgtgtg tatgtgtgga cagatgcgta tataataatt
1701241 catatcttcc catttcaagc actgagctaa attcagccta tacttttttt ttttttctg
1701301 agaagccttt cctacttctg taaaaagaaa ctctcattcc aaaggaaaga atgggaggct
1701361 gaagttattg aaaatgagat gggaaatggg aagatagtca ctttgcaact ccaaattcca
1701421 ggtctgatgc ttaggggtgt agtcattaag caaattcttc ctgataacca attacagaga
1701481 ggaaaaaaga gagtaagttt tttactgccc cctacctcct cctccccctg gccccgctcc
1701541 ttaccccaa ccaccagtga aggtgtttta gttctccca gccacctgag ctaggggcag
1701601 gagaccttcc ctccaatag agttccttgg tgaagggtgac ttcttcatcc actggatgct 19
1701661 ttcccagggc agttttgttg atcctccaag aacatcaagt cactgtgtat gaatagctcc
1701721 cacagaagtg ccgagtgtta aaagaacct tctcatgac ctgatgggat gggcggcagt
1701781 gtgtccacac ttgggcctga cgttatactt ggggaaaggg tggtagtctg agtgtctcag
1701841 agcagggcag tggctaggtg tgaggtttc ta ctgctctg taggctgctc atgctggagt
1701901 cctgagctcc accaggagtc cctctgggct gccgagcaag tggatcttcc aaggggcca
1701961 tcagcctgct ctgcacaaga gttataggaa ttgtagagcc ccagcacaac agtcaagacc
1702021 agcatcactg cagccatcat ccagatcact tgccagtgct gacacagttt gggatacatg
1702081 acttgtaaga aatggaccaa ttcttcaagt ttgctgtcaa tgaaaaaaaa tatgcagagg
1702141 ctttagtata ctgggcacac atatgatata cagaccaca gttctctctg cggatagctt
1702201 ccatgctgtc ttgagcaata gttctcaaac tttagctgtgc cttagattggg ttggcagcaa

```

//

```

1705861 tgggctactc actggggccc cagattcact gctgccctgg actggcattt ccagggattt
1705921 tgtgcattta aattagatga attgtaacct ccatttcagc aacggcaag agtccaaaca
1705981 caggcttccc acctgcttct tgggcccctt tctcttctct cagtttcttc tacctcttca 18
1706041 ggttctctcag gactctcact cttctgttct tctctctct ccttcaggtc ttgaagtctc
1706101 ttggtcttct ttagaccttc ttggaatctg gggggcaaaa aggaacagtt gagtctggaa
1706161 agggcagatg cagtgcaccc tttcctgagt tcttagggga ggggacttga gcagcacctc
1706221 caataattat gtgcttccca tggttccaca aaacaggaaa aagctgggaa gctccactga

```

//

```

1707241 ctgtggaaca gtcttgctct ttctatgta gttccttctt gtggcaagga ggtcctgcgg
1707301 ccactggtta cttccctaaa gcctctaaga aacaagaaag acccatggga aggcattctt
1707361 tgagaactgc cagggtgcct tgggggtggc gaggtctgac tcacccttgg ctgtaggctt
1707421 cttctccat cctggccttg gtctcctgac taagctctc caggcagctc agggctcagc 17
1707481 caggagcaga ggcttcaaaa tctgggtccc catttgtctt tccactagtg agaagagga
1707541 agtacagggc atcatttcag aaaaaggtgg aggcctaaaa acaaaacat gtttttggcc
1707601 cgattcctga ttaggagtga ggaaactcag gctttttcag taactttcag attttttccc

```

//

1716961 catttcctt aaaacttaat ttgctttcca ctgcattttg gggataaaaa tgggaggaag
1717021 gaaagtaaaa tggggaaaat ttcttgagag atccctgaag ccaagaggaa aatcgacaaa
1717081 cttacttttc caaaagtgca ggcagtgtg aagtgcagc taggctgcct tcccattgg 16
1717141 gtgattccga ctgagtgaaa aacagaagac agagaattga ggatgcgcta tggaaaggaag
1717201 aagccagagc tgctggattt ctgatgatgc tgggagcggg gctgctgctt ctctctttc
1717261 ctccatgccc ccactttcca atcttcatct gagcccagga cttggccctt tccctcaggc
//
1718881 tttgagccta tcaactcagat tctattctgg aaatttcctc tccttggtga ccctgcccc
1718941 atttggtcac cctccctgcc ctaggactga gtacgaagga aaggttattc tactattctg
1719001 tgctgggagg cagacatcgt catacttac aaggctggt aaggaggaaat ggatgatgag 15
1719061 ctgggagttt ggcaggcag attcagggca ttaaacttag gaaccacagc aacgctgacc
1719121 ctccggcgag gcatattctg caggaagaga agtgaccagg ctcaactgtct tggaggtagc
1719181 aatagccata gttcagaagg gctgggaaaa agcctcctca tttctaagtc tgtaatggca
1719241 ttcactggat attttggtt tgcagtagca atgataagat tgggtgtggag agagtggcca
1719301 aagttgacct aaattttctg ttggtgggtga gtgaacgctc aatctgttct attttagctt
1719361 atgagatctt ggagatacag aatggaaatg accccacagt ctctgggtaa caccctggag
1719421 actgtattca agctgcctgt agcaatatga aggcttatga tcaactcatg ttcatttaag
1719481 ggatgtatac atagttaagg aaacctagag caagaaagg aagatgtcag aggctaaact
1719541 tgagagtgtg gaaagccgaa tagaaactct gttcagagat tctctggcat ccatggatcc
1719601 cagaatgaat gattgtttgg gtgacctgg aaacttctgt catactcctt ccaggagccc
1719661 tggatttct tgaacatgca taccctttccc agcgtgaggg acatggaccg tgccgtgcga 14
1719721 gggaccccat cttctgcagc agggaggagc agagaagaga acacaggtaa gtttcaggct
1719781 aggcaccagc aggaaacaga aactaggcta tcgtatccat gggccagaac tggccctcaa
1719841 gggatagccc aagggtctgg gtggtgggga cactgagttt ggcacttcat cctttgagat
//
1726321 gtgggcagca ctagacagga gtgctgctca actggaaata agtcctgggg ctgttctgac
1726381 agctctaate ctagccaaga gctcttgaa gtccacctg tagggccaag atggggcagg
1726441 agcctaggtc cttaccagag gggccacagc tggggcttga attctgattt gcaagctttt 13
1726501 taaactccat gagctccgca tggctcttct catacgtcct ctttagattc tccacatact
1726561 gcatcatcac ttccgttct ttogacatgc gcttttctg cggggaagga gcgcatgagt
1726621 gcatgaggcc attggaggaa aggctccgtt ggcacttatt tgctctgacc tagggtctgg
1726681 gctaggagaa tcaaaaggat acagggacaa gactctgccc tctgaagagt ttgctgtctg
//
1728481 tgagggttca gtgatctgcc aaaaatactc tgaataatac tgcaatgatg tgcataggat
1728541 gcctggccca gaggaagcca cctctaagtg gtatctgtag ttgccgctgc ttgggtgatt
1728601 gctctacttt acgtaggtgg aacagagttg gcaagaccgg gggctggaga gactcacctg 12
1728661 gcggacggcg cctaccacct cagctcggct ggagagcgg gcagccaggc ggtgcaggac
1728721 agcgtatgct tccagcaact tctggtagt ttcccggtgc tcacagtgt gccagagtga
1728781 agctgaggac tgaacaggag taggagcctc acctggggtc ctcaataat gttatggact
1728841 aatcagcag tccccacct tttcggctc agggactggt ttggaagaca attttccac
1728901 aaacctggtg ggggcgatgg tttggggatg aaactcttcc acctctgatc attagattct
//
1729801 tctgaggaac actgtcagag tcttggctca attttctact tcaggagact atacttggtg
1729861 cctgagagaa gcatgacacc ctgtatggcc cttggggaca gtctctgctc cagggtattc
1729921 tcacatcagg ctccacaatt acgtaatgg aagctttgaa gttttccagt tctttctcag 11
1729981 tgttctctc tgctcaggtt cgttccctt cagcctgggt aattctagat tccagagtgt
1730041 agctgtcatt tctaaaggcc aaggacagtt gcacaaacac gttctgttgg gaacaaggg
1730101 gtgagagagg tgctgggagg agttactgca gaggacaagg ctgcagctgt gctccttgca
1730161 cgagcgtttt gcaacggccc ctggaacagc cgccaaagca ccaaagcagc catgtgcaag
//
1732141 gaatgttcac attaccccac agtcactctt tctcattttt gtctaaaaat gtcagagcta
1732201 gagtctggag gaagaaatgt tttgaataag ccagtcagc cacgggactc aaatttcata
1732261 acacacttga gtcacttac tcaacttct tttcagtgag tggaggggca ctgtgaaaa 10

1732321 gaaaacacac aattgaactg tgtgcaacct agtcaataga cccaaggtg actctgaatg
 1732381 accagcagac catgtgtttc caggggtgga gtaagctgtg ttggtgagaa ggaaaagatg

//

1735141 agacaattgg actttggccc ttctggggtc aagaattaag actggtgttc ctctgtgtcc
 1735201 cacctagaat ccaacacagg ggccactcgg tacagggcct tctgtaaccc acatcctgat
 1735261 tttaccttcc agggagactc ctgtggaccg gcagtttgcg cagcagcaca tcagaaatat 9
 1735321 taggcatgac atctaagcca ctctttgact ctctctctc aatagctggg gagagttag
 1735381 aaggaagccc tgaaaaaaaaa gtgcttactt ataaaaatgc tctttgaaat cacagtagta
 1735441 ctggtggcag ctagcttcag gagctttgac atttataagt atctagtctc atgttaaggg
 1735501 ctttttaatt gttatcttac attattctca caatgagcta gaacttagtc atcccatttc

//

1748341 atacaatttc attcgttcat tcaacaaata cctatgcagg ccctagtagt gccaggcatt
 1748401 gttgtaagca gtggacacac acacacacac acacacacac tctgcccctt gggggcttct
 1748461 tctctagggg taatagctga cacctagata acacctgtca tgtaccaggt attgttttag
 1748521 gtactttata gatattagct gctttaatct ccataatcac ctaagaaggg aggtactgtt
 1748581 cttagcctgg ttttacatgc ccagggaggt tgaatagctt gcccaggtca cctgagtggg 8a
 1748641 agcagggcct acagttccaa ctctgtgggg ggctcgacat actcatgcag gagaatgggg
 1748701 ccgaggaagg gtggtggggg cactgggagc agggctggac ttgccagct agatctagag
 1748761 gggtcagaac cctactgaga acatcggcag aggtgagtgc agagagggag gcagtgcggg
 1748821 ggctgaagcc tcattttcag aaccattttc cccgccatgg ttctggcaga aggtggacag
 1748881 ggaaccagag gcttggagga aggggctgc agctaccag cagggcaggg ctggggatg
 1748941 gactttgtgg tgacagcaga ttagtaagca agagatggcc gtgatgcctt gaaaagagga
 1749001 actcttcagt ttgggcagct tctctgggtg acgaggaaaa ggaagtgtca aaagtccagg
 1749061 cctcagggcac ccttccaggg cctactagat ccagcatggc ttaggggagg ctgacagcga
 1749121 ggccctgggg ctgggtggaa ggaggcaggt ttggaggtgc tgagcgggca gaagacacaa
 1749181 tcggattcat tcattcacca gcaaatgttt cctgaggaag acacaggaag tcttgtgttt
 1749241 acacattcac cttccttgat ctggcacaga caaatcagca ctcgctgaga cagcatctgc
 1749301 cccaaccca cctacctttt tcctgctcag ctgcttact aaggctgga agcttgagcc 8
 1749361 ccaactaagtt ctgattttctc atcaggatgt gctcctttgt ggtaaaagaa agagataaca
 1749421 atttcagatg atgacactgg gctgggctgt tctcttggct ctgtctatgg ttctgagacc
 1749481 actatcttag gtgggaaagc ggggcagcct gagaggtggg tgggcaggca tggcatggtg

//

1751341 cataaatagg cctgacttct cagagtggga aaatttacgc cctcacaagg cccaagtcca
 1751401 ggccagagct gccctggcca ggggcccaga ctccagccctg aggtcttcag cccagggagt
 1751461 acctggagta cacactctgc ccaactggcc cccaggaacc cactctcgg agcttgggtca
 1751521 gtttctgcat ccgcaocggg tgcaacttga tctgaaagtc tttgagacca ggggccttgg
 1751581 ccagcttgcc gccggccttg cctgcaaaac gcttttcttc ctctgccagt ggcagcttgg 7
 1751641 caagcacttt ctgcagccgg gggccaggtt cttcagggcc actgtcccag gagagccctc
 1751701 gcagcagcgg gggccgggac acagtgggtg gaagctcagc tttggagcca gcctcgggcc
 1751761 ccactcggctc tccagctggg cctctcccc gggaggtcgg gggaccact cctgccgcat
 1751821 cctgggttgg acttctcggc agagggctgc cctcccagcc cgttttcaag agctgcttcc
 1751881 ccagctcgtc ctccacgggg ccaggtgag ggctgttcag ggccattttc ccaactgctgt
 1751941 ttgtaacagg agctaggcct ttgggtgtgg tctcggggta ctggagggga tcgaagtttt
 1752001 ccttttgttc tattgcaatc tttttggact tctcaactgg aggaggacga ggagccagcc
 1752061 tgccctgaga cactttctc tggctattct gcttctgtc agctagccct ttggggagct 7'
 1752121 tctgaaaaag acaaggtaga gctggaaccc tcggggggcag gttgagggga aacaggtgag
 1752181 gccacttctg ctgtggagtc tctgccccca cacacctgc caaggggccc atttgtataa
 1752241 gtgtgtatgg ggtatgagtg gacgatgtgg aaggagaggg cttctgccc aggtttgtca
 1752301 aacagacagg aaaatggaac ctgcaatcca aaaccagcca agaatttccc aagggatagg
 1752361 agctgaggaa aactgaatag aaggcagctt tggccctaac tcagttgccc cagatctagc
 1752421 cttggtgctg cttagcaagg cccttaactc ttagggacc caggtttgtga accctctgaa
 1752481 attatgtatg tgtatgtctg tgtgtggagg ggtgtttttc taggaaaaaac atccacagct
 1752541 ttcaacaatt tctcagagtt ccatgatcca aagaggttag ggatcattgg atgggggtgat
 1752601 tcttgcaaaag gtgatgtctt cctgctcaga agctctaaga ttctgcagtg ttagtttact
 1752661 ttgttcattc cccaagggaa aactgggccc tgagcagcac gtgggtctgg ggtctgtgt
 1752721 ggctgacctg tgtgtgctga gactcttcca gaggactgta tcccagacc agttccaggt

1752781 gacactaaat tctactgctg cccttgaaac actgagcacg tgggcccctc gatgtgagca
 1752841 ggggtggggcg cttctgttgc tcatcaacaa agatgaggtt ttcccggcct ccccagacag
 1752901 aatcccaggc aggggctggc gctttcctgc ccttttctact ggagctgaca ggagccacag
 1752961 tctcacctgg cctggaggte ccccttgtct ccaaccagca gcctgactgg gggtcagcgc
 1753021 tgtgagtatt gcctccacgg agttcacccc cctgaatcct gcctccccac ccctccacct
 1753081 tagacttcta gtcaactataa ggcaggggaa tctgctgttt ccccagccct gaccctccac
 1753141 tcatacgtgt gcatgcacac acaactgaag gctgcccagg agccagccta ggcttctagg
 1753201 agactgtgcc ccccacactc aaatcatcca aagggagcaa agctcaaact **cacaggctcg** 6
 1753261 **ccagggtgag gtgaagagac gtcggcctca tccccttct** gctggagaag gtgaacagga
 1753321 gtcagtcagc aatgggaaga gaccgtgttt cctcttgaac tatcccgaag gaggccccct
 1753381 agcagtggtg ttcattgcct ccaccagca cctcatctc cagtgggtca cgaagggcct
 1753441 cctgggtgttc ggggtaaggg gagagacca ttggcataga aacagcacag caggtggggg
 1753501 gtcctgtcac **ctgtgggtgt gctccaggca gaggggatgg cggggccactg cacacatcca** 5a
 1753561 **aacctggaag** ggtccagaca ctagtgtgtg agggccagca gccaggccc tcagctgtgc
 1753621 tttcagccac atctccctcc cggggtatc ctccctttgc aatctcaggc ctggaagatt
 1753681 tgctgactac ctcccggtg ccaggttctc aggtgggccc tcacagaatg ttcacagaga
 1753741 ccacaggagg aaactgaggc acagggaaat caaagtctca tggccaggaa atgtcagcac
 1753801 tgagatttgg gccaggctg cctggccccg acctgagcgt gcctgcccg actgatgagg
 1753861 gccggttgcc cttcctggca cctccccct ttcttgttg gctggagggt gtgactctgg
 1753921 gtacagccta atgaaagga agaagtcaaga ccccaaagag gcctttctgt ataagctctt
 1753981 gagggtctct ctgagcctcc ctgagccaga gaggctgtcc tagtcccctt tcccaccag
 1754041 ccttctgac cctgggttac acctgcctcc cgacacaagc ccaagatgct aacagaaagt
 1754101 ctatctgcct cctctgggtg gccagcaaaa tggccccct ggagaggggt cttgctctgg
 1754161 gtgtgaaggg gccatcagag ttcttgaagg ggaagcctgc aggtgggag gcatgctgat
 1754221 ctgtccaggc tgagctgcca ccagagcga gaggcagggc aggaagtccc cgggcagctg
 1754281 ggctcactc **ggcggggtgg ggactgtaag tgagttgctc cgagaggatg taggagaagc** 5
 1754341 **gctggggctg aggttcgggg aaacagctgt** gaagacagac acaaattggc tggcattcat
 1754401 gaaggttag gacttcaacc tggcaaaggc atccttttag gtattcccag gccctggga
 1754461 ctgggtctgc cttgctgggc tcaggggctg atgctggact gcaatatgat gctcctgta
 1754521 cagcccaacc cctccctgct gctgctcaag agatgggtgc cctcaggcca tttgggggtt
 1754581 cgaggataga gtcacacttc tcagcctgcc tggcctgacc tcaaggcact gtccagaaac
 1754641 tgaggcctgg cgttgggtgg caggtacagc tccagaggct gctccttctc gacttcccag
 1754701 ggtggccctg acttcaaaaag ctcccttgt cctcctaagt acacttacac acttgcccaa
 1754761 ctttttctc aggaagaaaa gtgactctag catagaggaa gcaggaggat tttctggccc
 1754821 aggaaaacct tccctctaac ccagaaattc cccaaagacc atctcctctt ccccagagg
 1754881 cctaggatcc tcccagcac ccacagagat caaggggaagg gagcccagga cagaatcctg
 1754941 acctctgctg aggagagcag gtgagctcaa ggcgacctcc tcggagggtga ggcgcccact
 1755001 gcagctggtg ccaggccctt cctcccagc cctagagggg ctcagggcag ccacctgtac
 1755061 atcctgccac ctaactgat **ggggagtctc cggggctgct cctggacttc ctcccagggc**
 1755121 **gggtcaggaa tcgctcactc accaacttgg cttcttccag cagcggcagg tttttcttct** 4
 1755181 **tgctctctc tgagatgctg atgtctggca gctggtcatt caccaggtca atgatgtgcc**
 1755241 **ccgcggggtc** tgcagaagga ggatgagctg ggggtgagagc cactgcatcc gtggccccag
 1755301 gctgaggtca tgccatacca tgctcatcc cagggactct gccacagct gaccagcca
 1755361 gccaaacctc agcccagtc catcaagagg gttgcatggg gacagacagt ggcttctct

//

1757401 taccctgtcc tgttggactt atcgggaggg agcgccttaa agagcaggag agaggaagga
 1757461 gtcaagccca gccacgtgct cagacctgtc tttctactca acatgcctta gattgccctg
 1757521 gtccttacc **acagatgtca gggaggcagt ggacaccttc aagtgtcggg gagaaagcct** 3
 1757581 **cttgtgggga ctgtgaactc** tgaagacag aacagtcctc ttgttcagaa aatcaatcca
 1757641 caacttgaaa ataggtgaaa agatgcctgt atattctttt tcttttctt tctttctttc
 1757701 tttgtttcct tctttccttc tttctttctt tttttttttt tttgactcag ttttactctg

//

1759381 tgattatagt ttagtcaata aatgatata agaaaaaaga aaagatttat ttaaaaatat
 1759441 agctgtctga tctcatggt ctaggaaata ttgtttgtca caatgcaagg atcaggcacc
 1759501 tgtacctgtt **ggccaggttt ttgtcggttt ctcttctgg tgaagtggca tcccagtc** 2
 1759561 **g**gacaatcgt **gggagttgga ctgcaagata ctctgcggc aggaggacc** tgccggttta
 1759621 **gaacaaaaac acagagttag gcttgggctg gtgggacttc cagggacagg agccagagca** 2'
 1759681 **tttattctca** catcatgatg ctccagagcca tcttgataag gggacaaatg cagtttactc

//

```

1777441 ccactgcaac ctacatgagc tgtcagcaaa ccctctggcc agcctaaaag ctgtggcctc
1777501 agcccagggt gcttggcttg gccccagcc aggctagctg agggcaggga gggggcactt
1777561 acttggccgg cagggctctg ggctgcctgt ggctctccgg ggggctcctc gtcctcgggg
1777621 atgtggggcatggcagcctc ctgctgggag tggccacgtg tgcccggaac ctccgctgcg 1d
1777681 tcagcccaaa agatgctcca agaggcctgg gctccacagg ctggggagat gccaaaaagga
1777741 caagtcaaat ccattcccat cctgtccca agctgggttc catttcccgg agccacaagc
1777801 cacagtgaga gccggcttga gtttgcata acaccggagg tcaaaccagg ctaggagagg
1777861 gcatttgga tttcatttcc tccggctctc tggctttggt tacaagtca gaggtgacct
1777921 tagagatttt gcatctaatt tggcttttac agtaaacaca gctatcccag aaggagaaa
1777981 tgtgcttcga actcctcaaa gctgtagcta atggaagata ctccattgag atcacattgg

```

//

```

1815661 gctcacgcct ataatccag actttgggag gctgagggtg gctgatcact tgaggtcagg
1815721 agttcgagac cagcctgggc aacatgacaa aactccatct ttactaaaaa tgtaaaaatt
1815781 agccaggcat ggtggtactc acctgtaatc cagctactt gggaggctga ggcatgagaa 1c
1815841 ttgcttgaac ccgggagggtg gggttgcaac actgcaactcc agcctgggtg acagtgcgag
1815901 accctgtcta aaaaaaaaaa aatggttcc tgtccgacca actgtcctct gctttccacc
1815961 tcccttgag aaagcccttg cagagaaggc agggcttgtc cagggtcatg ggcgtgagtt
1816021 acctctgcta agactctgaa tttgaaggcc catttgtgag gctgccctgg actgtcgct

```

//

```

1818841 caaaaggagc acaatctagt taagttagga ctggcaagat tcaacttctga tttaaaactt
1818901 aagacagcaa caataaagat actcagctga aatgccacc aacaaagcca gctcccctgg
1818961 aaagttaaag ttagcacc ccattcccagc accctgtacc tttaaggaag agaaggttcc 1b
1819021 ctccgcttcc cagccgaaga ggcaggttat tctaggatat aggggaggct tacctaaaac
1819081 tgagttattc tcctttcctc ctctggccag cctctcttca ctctggggag cttttaccat 1a
1819141 ttaaggtcaa tgttacatct ggctccggag ctcagagccg agaagcctct ggctgcagaa
1819201 cctcgccgc acgcctcctc tgagaggggc tgggacttag agccgagagc tcctctggga
1819261 gccccactc ggcctggctc gggggataat ggcagggaaa gccgaccagc tggcctcagg
1819321 gctcaggca ggctgggctc ttggggcagt cgctcacct gggcccctcc gatgggtatc 1a'
1819381 cacacagcag atggcagtc ccattggcaac tcgtgccact ggacactgtc ctggccggac
1819441 gggaaacaaag ggaccctgca gatctcccca cccgcctgga gcctccagca agcatgtgag
1819501 cctggagaag accctgggcc agcgccaaga gaaactggga atggttctctg tcctggggat
1819561 tcggggggcag gggctgctcc cactgcgcta aactcttggg attgccagag agaatggcct
1819621 gggagattca gctactccca gacttggcac cagccccagg gatgtcaacc ttgctcctcc

```

Abb. 30: Exon-Intron Sequenz vom humanen *IRAG* Gen auf Chromosom 11. Die durch das *Human Genome Project* gewonnene DNA Sequenzen einer Teilregion des humanen Chromosom 11 wurden als Contig NT_028309 veröffentlicht. In dieser genomischen Region ist das *IRAG* Gen mit einer gesamtgenomischen Länge von 120.906 Nukleotiden (nt) lokalisiert. Die kodierenden Exonsequenzen des Gens sind in rot, blau sowie grün dargestellt. Rot markierte Nukleotide stellen die bisher bekannten, blau markierte Nukleotidsequenzen die in dieser Arbeit neu identifizierten Exons dar. Die grün markierten Sequenzen in den Exons 1a, 2 und 7 stellen die Bereiche dar, die durch alternative Spleißdonor- und akzeptorstellen deletiert werden und so zu den verkürzten Exons 1a', 2' und 7' führen. Die Nummerierung der Exons ist rechts neben der Sequenz angegeben. Konservierte Spleißdonorstellen (GT; revers komplementär: AC) und Spleißakzeptorstellen (AG; revers komplementär: CT) sind unterstrichen. Translationsstartkodons (CAT; revers komplementär: ATG und CAG; revers komplementär: CTG) der Exons 1b, 1c, 1d und 2 sowie die Translationsstopkodons (CTA oder TCA; revers komplementär: TAG oder TGA) in den Exons 8a, 19 und 20 sind fett und im Rahmen dargestellt.

8 IRAG 5' mRNA Varianten

IRAG mRNA Variante 3a

1 AATAACCTGCCTCTTCGGCTGGGAAGCGGAGGGAACCTTCTCTTC **Exon 1b**
 46 **CTTAAAG**ACAGGGTCTCGCACTGTCACCCAGGCTGGAGTGCAGTG
 91 GTGCAACCCACCTCCCGGGTTCAAGCAATCTCATGCCTCAGCC **Exon 1c**
 136 TCCCAAGTAG**ctggg**attacag**ggctcctcctaccgcaggagtatc**
 L G L Q G P P T A G V S
 181 **ttgcagtc**caactcccacgatt**gtcctgactggggatgccacttc** **Exon 2**
 C S P T P T I V L T G D A T S
 226 **accagaaggagaaaccgacaaaaacctggccaacagag**gttcacag
 P E G E T D K N L A N R V H S
 271 tccccacaagaggcttttctcaccgacacttgaaggtgtccactgc **Exon 3**
 P H K R L S H R H L K V S T A
 316 ctccctgacatctgtggaccccgcggggcacatcattgacctggt
 S L T S V D P A G H I I D L V
 361 gaatgaccagctgccagacatcagcatctcagaggaggacaagaa
 N D Q L P D I S I S E E D K K
 406 gaaaaacctggcgctgctggaagaagccaagttggtgagtgagcg
 K N L A L L E E A K L V S E R
 451 attcctgacccgacctgggaggaagtccaggagcagccccggaga
 F L T R R G R K S R S S P G D
 496 ctccccatcagctgtttccccgaacctcagccccagcgcttctcc
 S P S A V S P N L S P S A S P
 541 tacatcctctcggagcaactcacttacagtccccaccccgccaga
 T S S R S N S L T V P T P P E
 586 aggggatgagggcagctctcttcacctcaccctggcgagcctaa
 G D E A D V S S P H P G E P N
 631 cgtccccaaaggctagctgacaggaagcagaatgaccagaggaa
 V P K G L A D R K Q N D Q R K
 676 agtgtctcagggcaggtggctcctcgtcctcctccagttgagaa
 V S Q G R L A P R P P P V E K
 721 gtccaaagagattgcaatagaacaaaaggaaaacttcgatcccct
 S K E I A I E Q K E N F D P L
 766 ccagtaccccgagaccacacccaaaggcctagctcctgttacaaa
 Q Y P E T T P K G L A P V T N
 811 cagcagtgggaaaatggccctgaacagccctcagcctggccccgt
 S S G K M A L N S P Q P G P V
 856 ggagagcgagctggggaagcagctcttgaaaacgggctgggagg
 E S E L G K Q L L K T G W E G
 901 cagccctctgccgagaagtccaaccaggatgcggcaggagtggg
 S P L P R S P T Q D A A G V G
 946 tccccagcctcccaggggagaggcccagctggagagccgatggg
 P P A S Q G R G P A G E P M G
 991 gcccagggctggctccaaagctgagcttccaccactgtgtccc
 P E A G S K A E L P P T V S R
 1036 gccccgctgctgcgagggctctcctgggacagtgcccctgaaga
 P P L L R G L S W D S G P E E
 1081 acctggccccggctgcagaaagtgcttgccaagctgccactggc
 P G P R L Q K V L A K L P L A
 1126 agaggaagaaaagcgttttcagggcaaggccggcgcaagctggc
 E E E K R F A G K A G G K L A
 1171 caaggccctggctctcaaagactttcagatacaagtgagcccg
 K A P G L K D F Q I Q V Q P V
 1216 gcgatgcagaaactgaccaagctccgagaggagcacatcctgat
 R M Q K L T K L R E E H I L M
 1251 gagaatcagaacttagtggggctcaagcttccagaccttagtga
 R N Q N L V G L K L P D L S E
 1306 agcagctgagcaggaaaaagggttcttctgaaactctcccagc
 A A E Q E K G L P S E L S P A
 1351 tattgaggaagaagagtcaaagagtggttagatgtcatgcctaa
 I E E E E S K S G L D V M P N
 1396 tatttctgatgtgctgctgcgcaactgcggtccacaggagtct
 I S D V L L R K L R V H R S L
 1441 ccctggaagtgcccctccactcactgaaaaggaagttgagaacgt
 P G S A P P L T E K E V E N V
 1486 gtttgtgcaactgtccttggcctttagaaatgacagctacactct
 F V Q L S L A F R N D S Y T L
 1531 ggaatctagaattaaccaggctgaaagggaaacgcaacctgacaga
 E S R I N Q A E R E R N L T E
 1576 ggagaacactgagaaagaactggaaaacttcaaagcttcattac
 E N T E K E L E N F K A S I T
 1621 gtcctcagcttactctggcaccactgtgagcaccgggaaaccta
 S S A S L W H H C E H R E T Y

```

1666 ccagaagttgctggaggacatcgctgtcctgcaccgcctggctgc
    Q K L L E D I A V L H R L A A
1711 cgcctctccagccgagctgaggtgtagcgccgcccagga
    R L S S R A E V V G A V R Q E
1756 aaagcgcagtgtcgaagcaacggaagtgatgatgcagtatgtgga
    K R M S K A T E V M M Q Y V E
1801 gaatctaagaggacgtatgagaaggaccatgacgagctcatgga
    N L K R T Y E K D H A E L M E
1846 gtttaaaaagccttgcaaatcagaattcaagccgacgtgtggccc
    F K K L A N Q N S S R S C G P
1891 ctctgaagatggggtccctcgacggcaggtccatgtccctcac
    S E D G V P R T A R S M S L T
1936 gctgggaaagaatatgcctcgccggagggtcagcgttgctgtggt
    L G K N M P R R R V S V A V V
1981 tcctaaagtttaatgcctgaatctgctgcccactcccagctc
    P K F N A L N L P G Q T P S S
2026 atcatccattccctccttaccagccttgtcggaaatcacccaatgg
    S S I P S L P A L S E S P N G
2071 gaaagcagcctacctgtcacttcagcaactgctgcacttttggga
    K G S L P V T S A L P A L L E
2116 aaatggaaagacaaaatggggaccagattgtgaagcctctgctcc
    N G K T N G D P D C E A S A P
2161 tcctgagaccctgagctgcctggaggagcttagtcaggagaccaa
    A L T L S C L E E L S Q E T K
2206 ggccaggatggaggaagaagcctacagcaaggatccaagaagg
    A R M E E E A Y S K G F Q E G
2251 tctaagaagaccaaagaacttcaagacctgaaggaggaggagga
    L K K T K E L Q D L K E E E E
2296 agaacagaagagtgagagtcctgaggaacctgaagggtagaaga
    E Q K S E S P E E P E E V E E
2341 aactgaggaagaggaaaaggcccaagaagcagcaacttgaaga
    T E E E E K G P R S S K L E E
2386 attggtccatttcttacaagtcagtatcccaaactgtgtcagca
    L V H F L Q V M Y P K L C Q H
2431 ctggcaagtgatctggatgatggctgcagtgatgctggtcttgac
    W Q V I W M M A A V M L V L T
2476 tgttgctgctgggctctacaattcctataactcttgtgcagagca
    V V L G L Y N S Y N S C A E Q
2521 ggctgatggccccttggaaagatccacttgcctggcagcccagag
    A D G P L G R S T C S A A Q R
2566 ggactcctggtggagctcaggactccagcatgagcagcctacagag
    D S W W S S G L Q H E Q P T E
2611 cagtag
    Q *

```

Abb. 31: Die IRAG 5' mRNA Variante 3a kodiert für eine Isoform mit 823 Aminosäuren. Alternatives Spleißen führt zur Expression der IRAG mRNA Variante 3a mit den ersten Exons 1b und 1c gefolgt vom Exon 2 bis einschließlich Exon 19. Ein CTG Translationsstartkodon in Exon 1c an Nukleotid 146 (grün) und ein Translationsterminationskodon in Exon 19 an Nukleotid 2614 (rot) führen zur Translation eines IRAG Proteins mit 823 Aminosäuren Länge. Das Molekulargewicht wurde mit einer Online-Software (www.bioinformatics.org) errechnet und ergab 89,91kDa.

IRAG mRNA Variante 3b

```

1 AATAACCTGCCTCTTCGGCTGGGAAGCGGAGGGAACCTTCTCTTC
    Exon 1b
46 CTTAAAGACAGGGTCTCGCActgtcaccaggctggagtgagtg
    Exon 1c
    L S P R L E C S G
91 gtgcaacccccacctcccgggttcaagcaattctcatgcctcagcc
    A T P P P G F K Q F S C L S L
136 tcccaagtagctgggattacagagttcacagctcccacaagagggc
    Exon 3
    P S S W D Y R V H S P H K R L
181 ttctcaccgacacttgaaggtgtccactgcctccctgacatctg
    S H R H L K V S T A S L T S V
226 tggacccccggggcacatcattgacctggatgaccagctgc
    D P A G H I I D L V N D Q L P
271 cagacatcagcatctcagaggaggacaagaagaaaaacctggcgc
    D I S I S E E D K K K N L A L
316 tgctggaagaagccaagttggtgagtgagcgattcctgaccgcc
    L E E A K L V S E R F L T R R
361 gtgggaggaagtccaggagcagccccggagactcccatcagctg
    G R K S R S S P G D S P S A V
406 ttccccgaacctcagccccagcgttctcctacatcctctcgga
    S P N L S P S A S P T S S R S
451 gcaactcacttacagtccccaccccgccagaaggggatgaggccg

```

N S L T V P T P P E G D E A D
496 acgtctcttcacctcaccctggcgcgacctaacgtcccccagggc
V S S P H P G E P N V P K G L
541 tagctgacaggaagcagaatgaccagaggaagtgtctcagggca
A D R K Q N D Q R K V S Q G R
586 ggctggctcctcgtcctcctccagttgagaagtccaagagattg
L A P R P P P V E K S K E I A
631 caatagaacaaaaggaaaacttcgatcccctccagtaccccgaga
I E Q K E N F D P L Q Y P E T
676 ccacacccaaaggcctagctcctgttacaaacagcagtgaggaaaa
T P K G L A P V T N S S G K M
721 tggccctgaacagccctcagcctggccccgtggagagcgagctgg
A L N S P Q P G P V E S E L G
766 ggaagcagctcttgaacgggctgggagggcagccctctgccga
K Q L L K T G W E G S P L P R
811 gaagccaaccaggatgcggcaggagtggtccccagcctccc
S P T Q D A A G V G P P A S Q
856 aggggagagggccagctggagagccgatggggcccaggtggct
G R G P A G E P M G P E A G S
901 ccaaagctgagcttccaccactgtgtcccggcccccgctgctgc
K A E L P P T V S R P P L L R
946 gagggctcctcggacagtgccctgaagaacctggccccggc
G L S W D S G P E E P G P R L
991 tgcagaaagtgttgccaagctgccactggcagaggaagaaaagc
Q K V L A K L P L A E E E K R
1036 gttttgcaggcaaggcggcggaagctggccaaggccccgtgctc
F A G K A G G K L A K A P G L
1081 tcaaagactttcagatacaagtgcagcccgtcggatgcagaaac
K D F Q I Q V Q P V R M Q K L
1126 tgaccaagctccgagaggagcacatcctgatgagaaatcagaact
T K L R E E H I L M R N Q N L
1171 tagtggggctcaagcttccagacctagtgaagcagctgagcagg
V G L K L P D L S E A A E Q E
1216 aaaaagggttcttctgaactctccccagctattgaggaagaag
K G L P S E L S P A I E E E E
1251 agtcaaagagtggttagatgtcatgcctaataatttctgatgtgc
S K S G L D V M P N I S D V L
1306 tgetgcgcaaacctgcgggtccacaggagtctccctggaagtgcc
L R K L R V H R S L P G S A P
1351 ctccactcactgaaaaggaagttgagaacctgtttgtgcaactgt
P L T E K E V E N V F V Q L S
1396 ccttggcctttagaaatgacagctacactctggaatctagaatta
L A F R N D S Y T L E S R I N
1441 accaggctgaaaggaacgcaacctgacagaggagaactcagaga
Q A E R E R N L T E E N T E K
1486 aagaactggaacttcaaagcttccattacgtcctcagcttcac
E L E N F K A S I T S S A S L
1531 tctggcaccactgtgagcaccgggaaacctaccagaagttgctgg
W H H C E H R E T Y Q K L L E
1576 aggacatcgctgtcctgcaccgctggctgccgcctctccagcc
D I A V L H R L A A R L S S R
1621 gagctgaggtggtaggcgccgtccgccaggaagcgcagctgcga
A E V V G A V R Q E K R M S K
1666 aagcaacggaagtgatgatgcagatgtggagaatctaaagagga
A T E V M M Q Y V E N L K R T
1711 cgtatgagaaggaccatgaggagctcatggagtttaaaaagcttg
Y E K D H A E L M E F K K L A
1756 caaatcagaattcaagccgagctgtggcccctctgaagatgggg
R N Q N S S S C G P S E D G V
1801 tccctcgcacggcaggtccatgtccctcacgctgggaaagaata
P R T A R S M S L T L G K N M
1846 tgcctcgccggagggtcagcgttgctgtggttcctaaagttaatg
P R R R V S V A V V P K F N A
1891 ccctgaatctgcctggccaaactcccagctcatcatccattccct
L N L P G Q T P S S S S I P S
2936 ccttaccagccttgcggaatcaccaatgggaaaggcagcctac
L P A L S E S P N G K G S L P
2981 ctgtcacttcagcactgcctgcacttttgaaaatggaaagacaa
V T S A L P A L L E N G K T N
2026 atggggaccagattgtgaagcctctgctcctgcgctgacccctga
G D P D C E A S A P A L T L S
2071 gctgcctggaggagcttagtcaggagaccaaggccaggatggagg
C L E E L S Q E T K A R M E E
2116 aagaagcctacagcaagggattccaagaaggtctaagaagacca
E A Y S K G F Q E G L K K T K
2161 aagaactcaagacctgaaggaggaggaggaagaacagaagagtg
E L Q D L K E E E E Q K S E
2206 agagtctgaggaacctgaagaggtagaagaaactgaggaagagg

```

      S P E E P E E V E E T E E E E
2251 aaaagggccaagaagcagcaaaacttgaagaattggtccatttct
      K G P R S S K L E E L V H F L
2296 tacaagtcattgtatcccaaactgtgtcagcactggcaagtgatct
      Q V M Y P K L C Q H W Q V I W
2341 ggatgatggctgcagtgatgctgttcttactgttgtgtgtggggc
      M M A A V M L V L T V V L G L
2386 tctacaattcctataactcttgtgcagagcaggctgatgggcccc
      Y N S Y N S C A E Q A D G P L
2431 ttggaagatccacttgcctcggcagcccagaggactcctgggtgga
      G R S T C S A A Q R D S W W S
2476 gctcaggactccagcatgagcagcctacagagcagtag
      S G L Q H E Q P T E Q *

```

Abb. 32: Die IRAG 5' mRNA Variante 3b kodiert für eine Isoform mit 815 Aminosäuren. Dieser IRAG mRNA Variante mit den ersten Exons 1b und 1c fehlt durch Deletion das Exon 2. Exon 3 bis Exon 19 bilden den 3' Bereich dieser Variante. Das CTG Translationsinitiationskodon an Nukleotid 66 (grün) und das Translationsstopkodon (rot) in Exon 19 an Nukleotid 2511 führen zur Translation der IRAG Isoform 3b mit 815 Aminosäuren. Das Molekulargewicht wurde mit einer Online-Software (www.bioinformatics.org) errechnet und ergab 89,48 kDa.

IRAG mRNA Variante 3c

```

  1 AATAACctgcctcttcggctgggaagcggagggaaccttctcttc Exon 1b
      L P L R L G S G G N L L F
100 cttaaggtcctcctaccgaggagtatcttgcagtcctcaactccc Exon 2
      L K G P P T A G V S C S P T P
145 acgattgtcctgactggggatgccacttcaccagaaggagaaacc
      T I V L T G D A T S P E G E T
190 gacaaaaacctggccaacagaggttcacagtcctccacaagaggctt Exon 3
      D K N L A N R V H S P H K R L
235 tctcaccgacacttgaaggtgtccactgcctccctgacatctgtg
      S H R H L K V S T A S L T S V
280 gaccccgggggcacatcattgacctggatgaccagctgcca
      D P A G H I I D L V N D Q L P
325 atcagcatctcagaggaggacaagaagaaaaacctggcgtctgtg
      D I S I S E E D K K K N L A L
370 gaagaagccaagttggtgagtgagcattcctgacccgctcgt
      L E E A K L V S E R F L T R R
415 gggaggaagtcagagcagccccggagactccccatcagctgtt
      G R K S R S S P G D S P S A V
460 tccccgaacctcagccccagcgttctcctacatcctcctggagc
      S P N L S P S A S P T S S R S
505 acctcacttacagtcctcccccggcagaaagggatgagggcggac
      N S L T V P T P P E G D E A D
550 gtctcttcacctcacctggcagcctaactcctcccaagggcta
      V S S P H P G E P N V P K G L
595 gctgacaggaagcagaatgaccagaggaagtgtctcagggcagg
      A D R K Q N D Q R K V S Q G R
640 ctggctcctcgtcctcctccagttgagaagtcctcaagagattgca
      L A P R P P P V E K S K E I A
685 atagaacaaaaggaaaacttcgatcccctccagtacccccgagacc
      I E Q K E N F D P L Q Y P E T
730 acaccctaaaggcctagctcctgttacaacagcagtgaggaaatg
      T P K G L A P V T N S S G K M
775 gccctgaacagccctcagcctggcccgtggagagcagagctgggg
      A L N S P Q P G P V E S E L G
820 aagcagctcttgaaaacgggctgggagggcagccctctgccgaga
      K Q L L K T G W E G S P L P R
865 agtccaaccaggatgcccagcaggagggtccccagcctcccag
      S P T Q D A A G V G P P A S Q
910 gggagagggccagctggagagccgatggggcccagagctggctcc
      G R G P A G E P M G P E A G S
955 aaagctgagcttccaccactgtgtccggcccccgctgctgcca
      K A E L P P T V S R P P L L R
1000 gggctctcctgggacagtgccctgaagaacctggccccggctg
      G L S W D S G P E E P G P R L
1045 cagaaagtgttccaagctgccactggcagaggaagaaaagcgt
      Q K V L A K L P L A E E E K R
1090 tttgaggcaaggccggcggaagctggccaaggcccctgtctc
      F A G K A G G K L A K A P G L
1135 aaagactttcagatacaagtgagcccgctgaggatgcagaaactg
      K D F Q I Q V Q P V R M Q K L
1180 accaagctccagagaggacacatcctgatgagaaatcagaactta

```

```

T K L R E E H I L M R N Q N L
1225 gtggggctcaagcttccagaccttagtgaagcagctgagcaggaa
V G L K L P D L S E A A E Q E
1270 aaagggttctcttctgaactctccccagctattgaggaagaagag
K G L P S E L S P A I E E E E
1315 tcaaagagtggcttagatgtcatgcctaataatctgatgtgctg
S K S G L D V M P N I S D V L
1360 ctgcgcaaaactgcggtccacaggagtctccctggaagtgccct
L R K L R V H R S L P G S A P
1405 ccactcactgaaaaggaagttgagaacgtgtttgtgcaactgtcc
P L T E K E V E N V F V Q L S
1450 ttggcctttagaaatgacagctacactctggaatctagaattacc
L A F R N D S Y T L E S R I N
1495 caggctgaaaaggaacgcaacctgacagaggagaacactgagaaa
Q A E R E R N L T E E N T E K
1540 gaactggaaaacttcaaagcttccattacgtcctcagcttctactc
E L E N F K A S I T S S A S L
1585 tggcaccactgtgagcaccgggaaacctaccagaagttgtgtggag
W H H C E H R E T Y Q K L L E
1630 gacatcgctgtcctgcaccgctggtgcccgcctctccagccga
D I A V L H R L A A R L S S R
1675 gctgaggtggttaggcgcctccgccaggaaaagcgcagtgcgaaa
A E V V G A V R Q E K R M S K
1720 gcaacggaagtgatgatgcagtatgtggagaatctaaagaggacg
A T E V M M Q Y V E N L K R T
1765 tatgagaaggaccatgctggagctcatggagtttaaaagcttgca
Y E K D H A E L M E F K K L A
1810 aatcagaattcaagccgcagctgtggcccctctgaagatggggctc
N Q N S S R S C G P S E D G V
1855 cctcgcacggcaggtccatgtccctcacgctgggaaagaatag
P R T A R S M S L T L G K N M
1900 cctcgccggagggtcagcgttgctgtggttcctaagtttaatgcc
P R R R V S V A V V P K F N A
1945 ctgaatctgcctggccaaactcccagctcatcatccattccctcc
L N L P G Q T P S S S I P S
1990 ttaccagccttgtcgaatcacccaatgggaaaggcagcctacct
L P A L S E S P N G K G S L P
2035 gtcacttcagcactgcctgcacttttgaaaatggaagacaaat
V T S A L P A L L E N G K T N
2080 ggggacccagattgtgaagcctctgctcctgcgctgaccctgagc
G D P D C E A S A P A L T L S
2125 tgcctggaggagcttagtcaggagaccaagccaggatggaggaa
C L E E L S Q E T K A R M E E
2170 gaagcctacagcaagggattccaagaaggtctaaagaagaccaa
E A Y S K G F Q E G L K K T K
2215 gaacttcaagacctgaaggaggaggaggaagaacagaagagtgag
E L Q D L K E E E E Q K S E
2260 agtctgaggaacctgaagaggtagaagaactgaggaagaggaa
S P E E P E E V E E T E E E E
2305 aagggcccaagaagcagcaaaacttgaagaattggtccatttctta
K G P R S S K L E E L V H F L
2350 caagtcatgtatccaaaactgtgtcagcactggcaagtgatctgg
Q V M Y P K L C Q H W Q V I W
2395 atgatggctgcagtgatgctggtcttgactggtgtgctggggctc
M M A A V M L V L T V V L G L
2440 tacaattcctataactcttgtgcagagcaggctgatgggccctt
Y N S Y N S C A E Q A D G P L
2485 ggaagatccacttgctcggcagcccagaggactcctggtggagc
G R S T C S A A Q R D S W W S
2530 tcaggactccagcatgagcagcctacagagcagtag
S G L Q H E Q P T E Q *

```

Abb. 33: Die IRAG 5' mRNA Variante 3c kodiert für eine Isoform mit 852 Aminosäuren. Die mRNA kodierend für das Protein IRAG Isoform 3c mit 852 Aminosäuren besteht aus dem ersten Exon 1b gefolgt von Exon 2 bis Exon 19. Ein CTG Translationsstartkodon ist an Nukleotid 7 in Exon 1b (grün) und das Translationsstopkodon an Nukleotid 2563 in Exon 19 lokalisiert. Daher wird ein Proteinprodukt von 852 Aminosäuren Länge translatiert. Das Molekulargewicht wurde mit einer Online-Software (www.bioinformatics.org) errechnet und ergab 89,61 kDa.

9 IRAG 3' mRNA Varianten

IRAG mRNA Variante α

132 **atgga**accagcttgggacaggaatggatttgacttgcctttt
 M E P S L G Q G M D L T C P F
 177 **ggcgtctccc**agcctgtggagccaggcctcttggagcatcttt **Exon 1d**
 G V S P A C G A Q A S W S I F
 222 **ggggctgacgcagcggaggttccgggcacacgtggccactcccag**
 G A D A A E V P G T R G H S Q
 267 **caggaggctgccatgccccacattcccgaggacgaggagcccccc**
 Q E A A M P H I P E D E E P P
 312 **tgagagccacagggcagcccagagccctgccggccaacagggtcct**
 G E P Q A A Q S P A G Q Q G P
 357 cctaccgcaggagatcttgcagtccaactcccacgattgtcctg **Exon 2**
 P T A G V S C S P T P T I V L
 402 actgggatgccacttaccagaagagaaaaccgacaaaaacctg
 T G D A T S P E G E T D K N L
 447 gccaacag**agttcacagtccccacaagaggctttctcaccgacac** **Exon 3**
 A N R V H S P H K R L S H R H
 492 **ttgaaggtgtccactgcctccctgacatctgtgg**accgccgggg
 L K V S T A S L T S V D P A G
 537 cacatcattgacctggtgaatgaccagctgccagacatcagcatc
 H I I D L V N D Q L P D I S I
 582 tcagaggaggacaagaagaaaaacctggcgctgctggaagaagcc **Exon 4**
 S E E D K K K N L A L L E E A
 627 aagttggtgagtgagcgattcctgaccgccgtgggaggaagtc
 K L V S E R F L T R R G R K S
 672 aggagcagccccggagactccccatcag**ctgtttccccgaacctc**
 R S S P G D S P S A V S P N L
 717 **agccccagcgcttctcctacatcctctcggagcaactcacttaca** **Exon 5**
 S P S A S P T S S R S N S L T
 762 **gtccccaccggcag**gtttggatgtgtgcagtggccccccatcc **Exon 5a**
 V P T P P G L D V C S G P P S
 807 cctctgcctggagcaccaccacaga**aaggggatgaggccgacgtc** **Exon 6**
 P L P G A P P Q K G D E A D V
 852 **tcttcacctcacctggcgagcct**aacgtccccaaagggctagct
 S S P H P G E P N V P K G L A
 897 gacaggaagcagaatgaccagaggaagtgctcagggcaggctg
 D R K Q N D Q R K V S Q G R L
 942 gctcctcgtcctcctccagttgagaagtccaagagattgcaata **Exon 7**
 A P R P P P V E K S K E I A I
 987 gaacaaaaggaaaacttcgatcccctccagtaccccgagaccaca
 E Q K E N F D P L Q Y P E T T
 1032 cccaaaggcctagctcctgttacaacagcagtgaggaaaatggcc
 P K G L A P V T N S S G K M A
 1077 ctgaacagccctcagcctggccccgtggagagcgagctggggaag
 L N S P Q P G P V E S E L G K
 1122 cagctcttgaaaacgggctgggagggcagccctctgccgagaagt
 Q L L K T G W E G S P L P R S
 1167 ccaaccaggatgcggcagagtggtccccagcctcccagggg
 P T Q D A A G V G P P A S Q G
 1212 agaggcccagctggagagccgatggggcccagggctggctccaaa
 R G P A G E P M G P E A G S K
 1257 gctgagcttccaccactgtgtccccggccccgctgctgcgaggg
 A E L P P T V S R P P L L R G
 1302 ctctcctgggacagtgccctgaagaacctggccccggctgcag
 L S W D S G P E E P G P R L Q
 1347 aaagtgcttgccaagctgccactggcagaggaagaaaagcgtttt
 K V L A K L P L A E E E K R F
 1392 gcaggcaaggccggcggaagctggccaaggccccctggtctcaaa
 A G K A G G K L A K A P G L K
 1437 gactttcagatacaagtgacagccctgcggatgcagaaactgacc
 D F Q I Q V Q P V R M Q K L T
 1482 aagctccgagaggg**agcacatcctgatgagaatcagaacttagtg**
 K L R E E H I L M R N Q N L V
 1527 **gggctcaagcttccagaccttagtgaagcagctgagcaggaaaaa** **Exon 8**
 G L K L P D L S E A A E Q E K
 1572 **gggcttccttctgaactctccccagctattgaggaagaagagtca**
 G L P S E L S P A I E E E E S
 1617 aagagtggcttagatgtcatgcctaataatctgatgtgctgctg **Exon 9**
 K S G L D V M P N I S D V L L
 1662 cgcaaacctgcgggtccacaggagctcctcctggaagt**gccccctcca** **Exon 10**
 R K L R V H R S L P G S A P P
 1707 **ctcactgaaaaggaagttgag**aacgtgtttgtgcaactgtccttg

```

L T E K E V E N V F V Q L S L
1752 gcctttagaatgacagctacactctggaatctagaattaaccag Exon 11
A F R N D S Y T L E S R I N Q
1797 gctgaaagggaaacgcaacctgacagaggagaacctgagaaagaa
A E R E R N L T E E N T E K E
1842 ctgaaaaacttcaaagcttccattacgtcctcagcttcactctgg
L E N F K A S I T S S A S L W
1887 caccactgtgagcaccgggaaacctaccagaagttgctggaggac Exon 12
H H C E H R E T Y Q K L L E D
1932 atcgctgtcctgcaccgcctggctgccgcctctccagccgagct
I A V L H R L A A R L S S R A
1977 gaggtggtaggcgccgtccgccaggaaaagcgcgcatgctgaaagca
E V V G A V R Q E K R M S K A
2022 acggaagtgatgatgcagatgtggagaatctaaagaggacgtat Exon 13
T E V M M Q Y V E N L K R T Y
2067 gagaaggaccatgctggagctcatggagtttaaaaagcttgcaaat
E K D H A E L M E F K K L A N
2112 cagaattcaagcgcagctgtggcccctctgaagatggggctccct Exon 14
Q N S S R S C G P S E D G V P
2157 cgcacggcaccggtccatgtccctcacgctgggaaagaaatagcct
R T A R S M S L T L G K N M P
2202 cgccggagggtcagcgttctgtgtgttcctaagtttaatgcctg Exon 15
R R R V S V A V V P K F N A L
2247 aatctgcctggccaaactcccagctcatcatccattccctcctta
N L P G Q T P S S S S I P S L
2292 ccagccttgtcggaaatcaccaatgggaaaggcagcctacctgtc Exon 16
P A L S E S P N G K G S L P V
2337 acttcagcactgcctgcacttttggaaaatggaaagacaaatggg
T S A L P A L L E N G K T N G
2382 gaccagattgtgaagcctctgctcctgcgctgacccctgagctgc Exon 17
D P D C E A S A P A L T L S C
2427 ctggaggagcttagtcaggagaccaaggccaggatggaggaagaa
L E E L S Q E T K A R M E E E
2472 gcctacagcaagggaattccaagaaggtctaagaagaccaagaa
A Y S K G F Q E G L K K T K E
2517 cttcaagacctgaaggaggaggaggaagaacagaagagtgagagt Exon 18
L Q D L K E E E E E Q K S E S
2562 cctgaggaacctgaagaggtagaagaaactgaggaagaggaaaag
P E E P E E V E E T E E E E K
2607 ggccaagaagcagcaaaactgaagaattggtccatttcttaciaa
G P R S S K L E E L V H F L Q
2652 gtcagtatcccaaactgtgtcagcactggcaagtgatctggatg
V M Y P K L C Q H W Q V I W M
2697 atggctgcagtgatgctggtcttgactggtgtgctggggtctac Exon 19
M A A V M L V L T V V L G L Y
2742 aattcctataactcttgtgcagagcaggctgatggccccttgga
N S Y N S C A E Q A D G P L G
2787 agatccacttgctcggcagcccagaggactcctggtggagctca
R S T C S A A Q R D S W W S S
2832 ggactccagcatgagcagcctacagagcagtagGAAACCTCACAC
G L Q H E Q P T E Q *
2877 CTAGCCAGTGCCCTGCTCTGAGACACTCAGACTACCCCTTTCC
2922 CCAAGTATAACGTGAGGCCCAAGTGTGGACACTGCCGCCATC
2967 CCATCAGGTCATGAGGAAGGGTTCTTTTAACTCGGCACTTCTG
3012 TGGGAGCTATTACATACAGTGACTTGATGTTCTTGGAGGATCAA
3057 CAAAAGTCCCTGGGAAAGCATCCAGTGGATGAAGAAGTACCTT
3102 CACCAAGGAACCTCTATTGGAAGGGAAGGTCTCCTGCCCTAGCTC
3147 AGGTGGCTGGGGAGAACTAAAACACCTTCACTGGTGGTTGGGGT
3192 AAGGAGCGGGGCAGGGGGAGGAGGTAGGGGCAGTAAAAAA
3237 CTTACTCTCTTTTTTCTCTCTGTAATTGGTTATCAGGAAGAATT Exon 20
3282 TGCTTAATGACTAACACCCTAAGCATCAGACCTGGAATTTGGAGT
3327 TGCAAAGTACTATCTTCCATTCCCATCTCATTTCATAAAT
3372 TCAGCCTCCATTCTTCTTTGGAATGAGAGTTCTTTTACAG
3417 AAGTAGGAAAGGCTTCTCAGAAAAAATAAAAAA

```

Abb. 34: Die 3' IRAG mRNA Variante α kodiert für ein Protein mit 910 Aminosäuren. Die C-terminale Proteinisoform IRAG α hat eine Länge von 910 Aminosäuren, deren offener Leserahmen durch das ATG Translationsstartkodon in Exon 1d an Nukleotid 132 (grün) und das TAG Translationsstoppkodon im letzten Exon 20 an Nukleotid 2862 (rot) festgelegt ist. Alternativ inseriert ist das neu identifizierte Exon 5a zwischen Exon 5 und Exon 6. Das Molekulargewicht wurde mit einer Online-Software (www.bioinformatics.org) errechnet und ergab 89,61 kDa.

IRAG mRNA Variante β

```

132 atggaaccagcttgggacaggaatggatttgacttgcctttt
M E P S L G Q G M D L T C P F
177 ggcgtctcccagcctgtggagccaggcctcttggagcatctt
G V S P A C G A Q A S W S I F
222 ggggctgacgcagcggaggttccgggcacacgtggccactcccag
G A D A A E V P G T R G H S Q Exon 1d
267 caggaggctgcatgccccacattcccaggagcaggagcccccc
Q E A A M P H I P E D E E P P
312 ggagagccacaggcagcccagagccctgccggccaaagggtcct
G E P Q A A Q S P A G Q Q G P
357 cctaccgcaggagtatcttgcagtcaccaactcccacgattgtcctg
P T A G V S C S P T P T I V L Exon 2'
402 actggggatgccacttcaccagaaggagaaacggacaaaaacctg
T G D A T S P E G E T D K N L
447 gccaacagagttcacagtccccacaagaggtttctcaccgacac
A N R V H S P H K R L S H R H Exon 3
492 ttgaaggtgtccactgcctccctgacatctgtggacccccggggg
L K V S T A S L T S V D P A G
537 cacatcattgacctggtgaatgaccagctgccagacatcagcatc
H I I D L V N D Q L P D I S I
582 tcagaggaggacaagaagaaaacctggcgctgctggaagaagcc
S E E D K K K N L A L L E E A Exon 4
627 aagttggtgagtgagcgttccctgaccccgctgggaggaagtcc
K L V S E R F L T R R G R K S
672 aggagcagccccggagactccccatcagctgtttccccgaacctc
R S S P G D S P S A V S P N L
717 agccccagcgttctcctacatcctctcgaagcaactcacttaca
S P S A S P T S S R S N S L T Exon 5
762 gtccccacccccgaggtttggatgtgtgcagtgggcccgccatcc
V P T P P G L D V C S G P P S Exon 5a
807 cctctgcctggagcaccaccacagaagggggatgaggccgacgtc
P L P G A P P Q K G D E A D V Exon 6
852 ccttcacctcaccctggcgagcctgagcacatcctgatgagaaat
P S P H P G E P E H I L M R N Exon 8
897 cagaacttagtgggctcaagcttccagaccttagtgaagcagct
Q N L V G L K L P D L S E A A
942 gagcaggaaaaaggaacatttgctgggtgaATGAATGAATCCGAT
E Q E K G N I C W * Exon 8a
987 TGTGCTTCTGCCCGCTCAGCACCTCCAAACCTGCCTCCTTCCAA
1032 CCAGCCCCAGGCCTCGCTGACAGCCCTCCCTAAGCCATGCTGGC
1077 ATCTAGTGGGCCTGGAAGGGTGCCTCAGGCCTGAACTTTTGACAC
1122 TTCTTTTCTCCTCGTACACCAGGAAGCTGCCAAACTGAAGAGTT
1167 CCTCTTTTCAAGGCATCAGGCCATCTCTTGCTTACTAACTGCTG
1212 GTCACCACAAAGTCCATACCCAGCCCTGCCTGCTGGGTAGCTG
1257 CAGGCCCTTCTCCAAGCCTCTGGGTTCCTGTCCCCCTTTTGC
1302 CAGAACCATGGCGGGGAAATGGTCTGAAAATGAGGCTTCAGCC
1347 CCCGCACTGCCTCCCTCTCTGCACTCACCTCTGCCGATGTTCTCA
1392 GTAGGGTTCTGACCCTCTAGATCTAGCTGGCAAGTCCAGCCCT
1437 GCTCCAGTGCSCCAACACCCTTCTCGGCCCATCTCTCTGCA
1482 TGAGTATGTCGAGCCCACCACGAGTTGGAAGTGAAGCCCTGCT
1527 ACCACTCAGGTGACCTGGGCAAGCTATTCAACCTCCCTGGGCATG
1572 TAAAACAGGCTAAGAACAGTACCTGCCTTCTTAGGTGATTATGG
1617 AGATTAAGCAGCTAATATCTATAAAAAAAAAAAGAAAAAAAAA
1662 AAAAAAA

```

Abb. 35: Die 3' IRAG mRNA Variante β kodiert für ein Protein mit 279 Aminosäuren. Die C-terminale Proteinisoform IRAG β hat eine Länge von 279 Aminosäuren, deren offener Leserahmen durch das ATG Translationsstartkodon in Exon 1d an Nukleotid 132 (grün) und das TGA Translationsstoppkodon im letzten Exon 8a an Nukleotid 969 (rot) festgelegt ist. Alternatives Spleißen der IRAG pre-mRNA führt zur mRNA mit der Exonabfolge 1d, 2', 3, 4, 5, 5a, 6, 8 und 8a. Eine alternative Spleißakzeptorstelle in Exon 2 führt zur Deletion einer 75 bp-langen Sequenz und so zum verkürzten Exon 2'. Das Molekulargewicht wurde mit einer Online-Software (www.bioinformatics.org) errechnet und ergab 30,81 kDa.

IRAG mRNA Variante γ

132 **atgga**accagcttgggacaggaatggatttgacttgtcctttt
 M E P S L G Q G M D L T C P F
 177 **ggcgtctcccc**agcctgtggagccaggcctcttggagcatctt
 G V S P A C G A Q A S W S I F
 222 **ggggctgacgcagcggaggttccgggcacacgtggccactcccag** Exon 1d
 G A D A A E V P G T R G H S Q
 267 **caggaggctgccatgccccacattccc**gaggacgaggagcccc
 Q E A A M P H I P E D E E P P
 312 **ggagagccacaggcagcccagagccctgcccggc**caaagggctct
 G E P Q A A Q S P A G Q Q G P
 357 cctaccgcaggagtatcttgcagtcaccaactcccacgattgtcctg Exon 2'
 P T A G V S C S P T P T I V L
 402 actggggatgccacttcaccagaaggagaaacggacaaaaacctg
 T G D A T S P E G E T D K N L
 447 **gccaacagagttcacagtccccacaagaggtttctcaccgacac** Exon 3
 A N R V H S P H K R L S H R H
 492 **ttgaaggtgtccactgcctccctgacatctgtgg**acccccgggg
 L K V S T A S L T S V D P A G
 537 cacatcattgacctggtgaatgaccagctgccagacatcagcatc
 H I I D L V N D Q L P D I S I
 582 **tcagaggaggacaagaagaaaaacctggcgctgctggaagaagcc** Exon 4
 S E E D K K K N L A L L E E A
 627 aagttggtgagtgagcgttctgacccgcccgtgggaggaagtcc
 K L V S E R F L T R R G R K S
 672 **aggagcagccccggagactccccatcagctgtttccccgaacctc**
 R S S P G D S P S A V S P N L
 717 **agccccagcgttctcctacatcctctcggagcaactcacttaca** Exon 5
 S P S A S P T S S R S N S L T
 762 **gtccccacccccgcag**gtttggatgtgtgcagtgcccgcctatcc Exon 5a
 V P T P P G L D V C S G P P S
 807 cctctgcctggagcaccaccacaga**aagggggatgagccgacgtc** Exon 6
 P L P G A P P Q K G D E A D V
 852 **tcttcacctcaccctggcgagcct**aaagctccccaaagggctagct
 S S P H P G E P N V P K G L A
 897 **gacaggaagcagaatgaccagaggaaagtgtctcagggcaggtg**
 D R K Q N D Q R K V S Q G R L
 942 **gctcctcgccctcctccagttgagaagtccaaagagattgcaata**
 A P R P P P V E K S K E I A I
 987 **gaacaaaaggaaaaacttcgatccctccagtaccccgagaccaca**
 E Q K E N F D P L Q Y P E T T
 1032 **cccaaggcctagctcctgttacaacagcagtgggaaaatggcc**
 P K G L A P V T N S S G K M A
 1077 **ctgaacagccctcagcctggccccgtggagagcagctggggaag** Exon 7
 L N S P Q P G P V E S E L G K
 1122 **cagctcttgaaaacgggctgggagggcagccctctgccgagaagt**
 Q L L K T G W E G S P L P R S
 1167 **ccaacccaggatgaggcagagtggtccccagcctcccagggg**
 P T Q D A A G V G P P A S Q G
 1212 **agagggcccagctggagagccgatggggcccagagctggctccaaa**
 R G P A G E P M G P E A G S K
 1257 **gtgagcttccaccactgtgtccggcccccgctgctgcgaggg**
 A E L P P T V S R P P L L R G
 1302 **cttcctgggacagtgccctgaagaacctggccccggctgcag**
 L S W D S G P E E P G P R L Q
 1347 **aaagtgttgccaagctgccactggcagaggaagaaaagcgtttt**
 K V L A K L P L A E E E K R F
 1392 **gcaggcaaggccggcggcaagctggccaaggccccgtctcaaa**
 A G K A G G K L A K A P G L K
 1437 **ggctttcagatacaagtgcagcccgtgaggatgcagaaactgacc**
 G F Q I Q V Q P V R M Q K L T
 1482 **aagctccgagaggacacatcctgatgagaaatcagaacttagtg** Exon 8
 K L R E E H I L M R N Q N L V
 1527 **gggctcaagcttccagaccttagtgaagcagctgagcaggaaaaa**
 G L K L P D L S E A A E Q E K
 1572 **gg**aaacatttgctggtgaATGAATGAGTCCGATTGTCTTCTGCG Exon 8a
 G N I C W *
 1617 CCGTCTAGCACCTCCAAACCTGCCTCCTTCCAACCAGCCCCCAGG
 1662 CCTCGCTGTCAGCCCTCCCTAAGCCATGCTGGCATCTAGTGGCC
 1707 TGGAAAGGGTGCCTCAGGCCTGAACCTTTTGACACTCCTTTTCTC
 1752 GTACACCCAGGAAGCTGCCCAAAGTGAAGAGTTCCTCTTTTCAAG
 1797 GCATCAGGCCATCTCTTGCTTACTAATCTGCTGTACCCACAAAA
 1842 TCCATACCCAGCCCTGCCCTGCTGGGTAGCTGCAGGCCCTTCC
 1887 TCCAAGCCTTGGTTCCTGTCCACCTTCTGCCAGAACCATTGGCG
 1932 GGGAAAATGGTTCGAAAATGAGGCTTACGCCCCCGCAGTGCCTC
 1977 CCTCTGCACTCACCTCTGCCGATGTTCTCAGTAGGGTTCTGAC

```

2022 CCCTCTAGATCTAGCTGGGCAAGTCCAGCCCTGCTCCCAGTGCCC
2067 CCAACACCCTTCTCGGCCCATTTCTCTGCATGAGTATGTCGAG
2112 CCCACCACGAGTTGGAAGTGAAGCCCTGCTACCACTCAGGTGA
2157 CCTGGGCAAGCTATTCAACCTCCCTGGGCATGTAAAACCAGGCTA
2202 AGAACAGTACCTGCCTTCTTAGGTGATTATGGAGATTAAGCAGC
2247 TAATATCTATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

Abb. 36: Die 3' IRAG mRNA Variante γ kodiert für ein Protein mit 485 Aminosäuren. Die IRAG γ mRNA Variante führt mit dem ATG Translationsstartkodon in Exon 1d an Nukleotid 132 (grün) und dem TGA Translationsstopkodon im letzten Exon 8a an Nukleotid 1587 (rot) zur Translation eines IRAG Proteins mit einer Länge von 485 Aminosäuren. Alternatives Spleißen der IRAG pre-mRNA führt zur mRNA mit der Exonabfolge 1d, 2', 3, 4, 5, 5a, 6, 7, 8 und 8a. Eine alternative Spleißakzeptorstelle in Exon 2 führt zur Deletion einer 75 bp-langen Sequenz und so zum verkürzten Exon 2'. Das Molekulargewicht wurde mit einer Online-Software (www.bioinformatics.org) errechnet und ergab 52,73 kDa.

IRAG mRNA Variante δ

```

132 atggaaccagcttgggacaggaatggatttgacttgcctttt
M E P S L G Q G M D L T C P F
177 ggcgtctccccagcctgtggagccaggcctcttggagcatcttt
G V S P A C G A Q A S W S I F
222 ggggctgacgcagcggaggttccgggcacacgtggccactcccag Exon 1d
G A D A A E V P G T R G H S Q
267 caggaggtgccatgccccacattcccaggagcaggagcccccc
Q E A A M P H I P E D E E P P
312 ggagagccacaggcagcccagagccctgccggccaacagggtcct
G E P Q A A Q S P A G Q Q G P
357 cctaccgcaggagtatcttgcagtcctccactcccacgattgtcctg Exon 2'
P T A G V S C S P T P T I V L
402 actggggatgccacttcaccagaaggagaacccgacaaaaacctg
T G D A T S P E G E T D K N L
447 gccaacagagttcacagtcaccacaagaggtttctcaccgacac Exon 3
A N R V H S P H K R L S H R H
492 ttgaaggtgtccactgcctccctgacatctgtggaccocgctggg
L K V S T A S L T S V D P A G
537 caacatcattgacctggtgaatgaccagctgccagacatcagcatc
H I I D L V N D Q L P D I S I
582 tcagaggaggacaagaagaaaaaacctggcgctgctggaagaagcc Exon 4
S E E D K K K N L A L L E E A
627 aagttggtgagtgagcattcctgacccgctgggaggaagtcc
K L V S E R F L T R R G R K S
672 aggagcagccccggagactccccatcagctgtttccccgaacctc
R S S P G D S P S A V S P N L
717 agccccagcgttctcctacatcctctcgaagcaactcacttaca Exon 5
S P S A S P T S S R S N S L T
762 gtccccacccccgaggtttggatgtgtgcagtgccccgcatcc Exon 5a
V P T P P G L D V C S G P P S
807 cctctgcctggagcaccaccacagaagggggatgaggccagctc Exon 6
P L P G A P P Q K G D E A D V
852 tcttcacctcaccctggcgagcctaacgtccccaaaggctagct Exon 7
S S P H P G E P N V P K G L A
897 gacaggaagcagttatggagagctcctgcacctccagctgcccc
D R K A V M E S S C T S S C P
942 acagaaaagcctgcaagagtacttccagcacaggccctctccca
T E K P A R V L P G T G P L P
987 ccctattccatttgaagcaaggaggtcgaggaaggacatctc Exon 20
P Y S I C K Q G R S R K R T S
1032 ccaaaaggagcataaagaatagccatataacaggggctgaaaaa
P K G S I R I A I Y T G A E K
1077 gtgctcatgagtcacatcttttctggaagcaagaccagcctgaa

```

```

V L M S P S F L E S K D Q P E
1122 gcagtgggagctgctgcccaagcggtagtgaactggagagaaaca
A V G A A A Q A V V N W R E T
1167 ggcctggattttcagtgagatgtggatccgaagagtcctccca
G P G F S V R M W I R R V P Q
1212 atgcctctgaagtctgacatctctgcttagCCCTAGGAGTCTGGT
M P L K S D I S A *
1257 TCCCTGCCTTCAGTTGCAGAGTGATGTGTTTGTGTCATTGTTGAT
1302 GTCACCTCCTAAAAAGACCTTCACTTTCTGGCTGCCACAAAGCCA
1347 TATGTGTTGCTCCCCATATACAGCCTGACAGAGTAAATGGAGAGG
1392 AAGTGCTGGATTTGTGTATCACTGGCTATCAGTTCCTCATGTTGT
1437 TAAGCCTCACACAGGTGTGCTAGCATTGAACTGTAGAGTGTGACA
1482 TACCTGAGTTTAAAAATAAAAGCACATTTCCAAACCTCAAAAAAA
1527AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

Abb. 37: Die 3' IRAG mRNA Variante δ kodiert für ein Protein mit 367 Aminosäuren. 367 Aminosäuren werden von der mRNA Sequenz der IRAG Variante δ kodiert. Der offene Leserahmen startet mit dem ATG Translationsstartkodon in Exon 1d an Nukleotid 132 (grün) und endet mit dem TAG Translationsstopkodon im letzten Exon 20 an Nukleotid 1239 (rot). Alternatives Spleißen der IRAG pre-mRNA führt zur Expression einer mRNA mit der Exonabfolge 1d, 2', 3, 4, 5, 5a, 6, 7' und 20. Eine alternative Spleißakzeptorstelle in Exon 2 führt zur Deletion einer 75 bp-langen Sequenz und so zum verkürzten Exon 2'. Eine Alternative Spleißdonorstelle in Exon 7 führt zur Deletion eines 521 nt langen Bereichs von Exon 7 und somit zur Expression des 97 nt langen Exon 7'. Das Molekulargewicht wurde mit einer Online-Software (www.bioinformatics.org) errechnet und ergab 40,3 kDa.

10 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	Adenin
ACh	Acetylcholin
AMP	Adenosinmonophosphat
ANP	atrial natriuretic peptide
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BNP	brain-type natriuretic peptide
bp	Basenpaar(e)
BK _{Ca}	Ca ²⁺ -aktivierter maxi-K ⁺ -Kanal
C	Cytosin
Ca ²⁺	Kalziumion
cAK	cAMP-abhängige Proteinkinase
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cGK	cGMP-abhängige Proteinkinase
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
cDNA	kodierende DNA
CIP	Phosphatase des Kälberdarms
CFTR	cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
CNP	C-type natriuretic peptide
CO	Kohlenstoffmonoxid
COOH-	Carboxy-
CoSMC	Glatte Muskelzellen des Kolons
CRIP	cysteine-rich intestinal protein
CRP3/MLP	CRP3/ muscle LIM protein
CRP2/SmLIM	CRP2/ smooth muscle LIM
CTP	Cytidintriphosphat
DMEM®	Dulbecco's modified Eagle's medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	desoxy ATP/ CTP/ GTP/ TTP
DTT	Dithiothreitol
ECL	enhanced chemiluminescence
<i>E.coli</i>	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamin-N, N, N',N'-tetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ESP1/CRP2	estradiol-stimulated protein1/cysteine-rich protein2
FCS	fötale Kälberserum
FISH	fluorescence in situ hybridisation

G	Guanin
GAPDH	Glyzerinaldehyd-3-Dehydrogenase
GC	Guanylatzyklase
GMP	Guanosinmonophosphat
GIT	Gastrointestinaltrakt
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde(n)
HBSS®	HEPES-gepufferte Kochsalzlösung
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-Ethansulfonsäure
IHPS	Infantile Hypertrophe Pylorusstenose
IP ₃	Inositol-1,4,5-Triphosphat
IP ₃ R	Inositol-1,4,5-Triphosphat Rezeptor
IRAG	IP ₃ Rezeptor-assoziiertes cGMP-abhängiges Kinase Substrat
Jaw1	lymphoid-restricted membrane protein1
kb	Kilobasenpaar(e)
kDa	Kilodalton
LB	Luria-Bertani
LIM	Lin-11, Isl-1, Mec-3
LTD	long-term depression
LTP	long-term potentiation
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MEM®	Minimum Essential Medium
min	Minute(n)
MLC	Mysosin light chain
MLCK	Ca ²⁺ /calmodulin-dependent myosin light chain kinase
mRNA	messenger RNA
MRV	murine AIDS-related virus
Mrvi1	MRV integration site 1
nt	Nukleotid(e)
N-	Amino-
NLS	Nukleäres Lokalisationssignal
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	NO-Synthase
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
PDE	Phosphodiesterase
pH	negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoffkonzentration

PIP ₂	Phosphatidylinositol-4, 5-Bisphosphat
PLB	Phospholamban
PM	Plasmamembran
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RGS-2	regulator of G-protein signaling-2
rpm	Umdrehungen pro Minute
RPMI®	Rosewell Park Memorial Institute
RT	Reverse Transkriptase
RT	Raumtemperatur
SCN	Suprachiasmatischen Nukleus
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
SmBM®	Smooth muscle Basal Medium
SmGM®	Smooth muscle Growth Medium
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
T	Thymin
TAE	Tris-Azetat EDTA
TFII-I	transcription factor II-I
TLP	thymus LIM protein
TMD	Transmembrandomäne
TNS®	Trypsin neutralisierende Lösung
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TRPC3	transient receptor potential channel 3
TTP	Thymidintriphosphat
UTR	untranslatierte Region
VASP	vasodilator-stimulated phosphoprotein
VSMC	glatte Gefäßmuskelzellen
ZNS	Zentrales Nervensystem

Danksagung

Herrn Prof. Dr. R. Schmid möchte ich sehr für die Ermöglichung der hier vorliegenden Arbeit und die anregenden Diskussionsrunden danken.

Herrn Prof. Dr. M. Schemann möchte ich meinen herzlichsten Dank für seine Bereitschaft bei der Betreuung dieser Arbeit aussprechen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. D. Saur. Er hat mich während der gesamten Zeit fachlich betreut und unterstützt, was zur Entstehung der vorliegenden Arbeit führte.

Vielen herzlichen Dank an Herrn Prof. Dr. H.-D. Allescher für die freundliche Motivation und die anregenden Gespräche.

Herrn Dr. G. Schneider, Herrn Dr. R. Fritsch und Herrn Dr. F. Geisler möchte ich für interessante und hilfreiche Ideen danken.

Für die ausgesprochen gute und motivierende Atmosphäre im Labor danke ich Frau Dr. M. Retzer-Lidl, Frau M. Scheibel, Frau U. Götz und Frau M. Werb.