

Charakterisierung von ATBP, eines transportrelevanten Interaktionspartners des Angiotensin II AT₂-Rezeptors

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
Dipl.-Biol. Christoph Jan Wruck
aus Osnabrück

Kiel, im Mai 2005

There is no sadder sight in the world than to see a beautiful theory killed by a brutal fact.

Thomas Henry Huxley (1825-95), brit. Zoologe

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|------------|--|-----------|
| 1 | Einleitung | 5 |
| 1.1 | G-Protein gekoppelte Rezeptoren | 5 |
| 1.1.1 | Struktur | 6 |
| 1.1.2 | Ligandenbindung | 6 |
| 1.1.3 | G-Protein-Kopplung | 7 |
| 1.1.4 | Heterotrimere G-Proteine | 8 |
| 1.1.5 | Effektoren der G-Proteine | 9 |
| 1.1.6 | GPCR Regulation | 11 |
| 1.1.7 | Dimerisierung | 12 |
| 1.1.8 | G-Protein unabhängige Interaktionspartner | 13 |
| 1.2 | Das Renin-Angiotensin System | 15 |
| 1.2.1 | Der AT1-Rezeptor | 17 |
| 1.2.2 | Der AT2-Rezeptor | 18 |
| 1.2.2.1 | Funktionen des AT2-Rezeptors | 19 |
| 1.2.2.2 | Signaltransduktion des AT2-Rezeptors | 21 |
| 1.3 | Das <i>Yeast Two-Hybrid</i> System | 24 |
| 1.4 | Zielsetzung der vorliegenden Arbeit | 26 |
| 2 | Methoden | 27 |
| 2.1 | Das <i>Yeast Two-Hybrid</i> System | 27 |
| 2.1.1 | Arbeitsschema | 27 |
| 2.1.2 | Verwendeter Hefe-Stamm, Plasmide und cDNA-Bibliotheken | 27 |
| 2.1.3 | Herstellung von kompetenten Hefen und Transformation | 27 |
| 2.1.4 | Kotransformation | 29 |
| 2.1.5 | DNA-Isolierung aus Hefen | 29 |
| 2.1.6 | Transformation von DNA in <i>E. coli</i> | 30 |
| 2.1.7 | Rücktransformation von DNA in Hefen | 30 |
| 2.1.8 | Subklonierung der im <i>Yeast Two-Hybrid</i> System identifizierten cDNAs | 30 |
| 2.2 | Molekularbiologische Methoden | 31 |
| 2.2.1 | Elektrophoresetechnik zur Analyse von Nukleinsäuren | 31 |
| 2.2.2 | Herstellung von cDNA und 5'-RACE | 31 |
| 2.2.3 | Schema der Synthese des ersten cDNA-Stranges mit Hilfe der 5'-RACE-Technik | 32 |
| 2.2.4 | Polymerase-Kettenreaktion (PCR) | 32 |
| 2.2.5 | Klonierung von cDNA-Fragmenten | 33 |
| 2.2.6 | siRNA Experimente | 34 |
| 2.2.7 | Klonierung eines Golgi-Markers | 34 |
| 2.2.8 | Herstellung eines plasmamembranständigen EGFP-gekoppelten AT2-Rezeptors | 35 |

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|------------|---|-----------|
| 2.3 | Zellbiologische Methoden | 35 |
| 2.3.1 | Zellkultur | 35 |
| 2.3.2 | Transfektion von Mammalia-Zellen | 36 |
| 2.3.3 | Zellproliferationsassay | 36 |
| 2.4 | Proteinchemische Methoden | 36 |
| 2.4.1 | Probenaufbereitung | 36 |
| 2.4.2 | Immunoblotting | 37 |
| 2.4.3 | Coimmunpräzipitation nach Coexpression von AT2-Rezeptor und ATBP50..... | 38 |
| 2.4.4 | ELISA zur Detektion von Rezeptorexpression auf der Plasmamembran | 39 |
| 2.5 | Immunofluoreszenz-Mikroskopie | 39 |
| 2.6 | Datenbankanalysen | 41 |
| 3 | Ergebnisse | 42 |
| 3.1 | Identifikation von ATBP50 als ein AT2-Rezeptor Bindeprotein | 42 |
| 3.1.1 | „Beute“ des <i>Yeast Two-Hybrid</i> Screens | 42 |
| 3.1.2 | Validierung der Interaktion von ATBP50 und dem AT2-Rezeptor | 43 |
| 3.2 | Charakterisierung von ATBP | 44 |
| 3.2.1 | Nachweis der ATBP-mRNA durch <i>Northern-Blot</i> | 44 |
| 3.2.2 | Sequenz und Strukturanalyse der ATBP-Proteine | 45 |
| 3.2.3 | Subzelluläre Lokalisation von ATBP50 | 48 |
| 3.2.4 | Datenbanksuche mit ATBP50 Proteinsequenzen | 49 |
| 3.2.5 | Genomische Organisation des ATBP-Gens..... | 52 |
| 3.3 | Charakterisierung der Interaktion von AT2-Rezeptor und ATBP50 | 54 |
| 3.3.1 | Subzelluläre Lokalisation von AT2-Rezeptor und ATBP50..... | 54 |
| 3.3.2 | ATBP50 ist erforderlich zum AT2-Rezeptor <i>trafficking</i> | 55 |
| 3.3.3 | Einfluss von ATBP50 auf die AT2-Rezeptor-Funktion in N1E-115-Zellen | 57 |
| 4 | Diskussion und Ausblick | 60 |
| 4.1 | ATBP50, ATBP60 und ATBP135: eine neue Proteinfamilie | 60 |
| 4.1.1 | Identifikation von ATBP50, ATBP60 und ATBP135 | 60 |
| 4.1.2 | Das ATBP-Gen | 61 |
| 4.1.3 | Die Expression von ATBP | 62 |
| 4.1.4 | Die Struktur der ATBP-Proteine | 63 |
| 4.1.5 | Subzelluläre Lokalisation der ATBP-Proteine | 64 |
| 4.2 | ATBP50 - ein Interaktionspartner des AT2-Rezeptors | 65 |
| 4.2.1 | ATBP50 - ein Modulator der subzellulären Verteilung des AT2-Rezeptors | 65 |
| 4.2.2 | ATBP50 - ein Modulator der AT2-Rezeptor-Aktivität | 66 |

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|-------------|--|------------|
| 4.2.3 | ATBP50 - Physiologische Bedeutung und Ausblick..... | 67 |
| 5 | Zusammenfassung..... | 68 |
| 6 | Summery..... | 69 |
| 7 | Literaturverzeichnis | 70 |
| 8 | Abbildungsverzeichnis | 85 |
| 9 | Abkürzungsverzeichnis | 86 |
| 10 | Anhang | 88 |
| 10.1 | Translation der ATBP-cDNA Sequenzen | 88 |
| 10.2 | Bezugsnachweis der verwendeten Materialien..... | 97 |
| 10.2.1 | Geräte | 97 |
| 10.2.2 | <i>Yeast Two-Hybrid</i> System..... | 97 |
| 10.2.3 | Zellkultur | 98 |
| 10.2.4 | Antikörper | 99 |
| 10.2.5 | Feinchemikalien | 100 |
| 10.2.6 | Enzyme und Kits | 101 |
| 10.2.7 | Vektoren | 101 |
| 10.2.8 | Verbrauchsmaterialien | 102 |
| 10.2.9 | Liste der Primersequenzen | 103 |
| 11 | Kongressbeiträge und Publikationen | 104 |
| 11.1 | Vorträge | 104 |
| 11.2 | Posterpräsentationen | 105 |
| 11.3 | Publikationen | 106 |
| 12 | Danksagung | 107 |
| 13 | Lebenslauf..... | 108 |
| 14 | Erklärung..... | 109 |

1 Einleitung

1.1 G-Protein gekoppelte Rezeptoren

Die membranständigen Rezeptoren an der Zelloberflächen von Zellen lassen sich in vier große Klassen einteilen: die ligandengesteuerten Ionenkanäle, die Tyrosin-Kinasen bindenden Rezeptoren, Rezeptoren mit eigener Kinaseaktivität und die G-Protein gekoppelten Rezeptoren (G protein-coupled receptor, GPCR).

Die GPCR stellen mit über 1000 Mitgliedern die mit Abstand größte Rezeptorklasse aller eukaryotischen Organismen dar (zur Übersicht siehe: <http://www.gpcr.org>; Horn et al., 1998). Ihre Aufgabe ist die Bindung extrazellulärer Liganden unterschiedlichster Natur wie Proteine, Peptide, biogene Amine, Nucleotide, Nucleoside, Lipide, Kohlenhydrate, Ca^{2+} , aber auch Photonen, gustatorische und olfaktorische Signale. Zudem kann der gleiche Ligand verschiedene GPCR binden, so sind z.B. zurzeit für Serotonin 15 unterschiedliche GPCR bekannt. Eine weitere Aufgabe der GPCR ist, diese Ligandenbindung durch eine Konformationsänderung des Rezeptors in ein Signal in das Zellinnere umzuwandeln. Im Zellinneren wird das Signal über heterotrimäre G-Proteine und/oder andere Mediatoren auf Effektoren wie Enzyme und Ionenkanäle übertragen und dadurch diversifiziert und verstärkt. Auf diese Weise wird die ungeheure Vielzahl von Signalen, die von GPCR erkannt werden, auf nur wenige Effektoren in der Zelle übertragen, und so den Zellen eine Reaktion auf diese Signale ermöglicht (Bockaert und Pin, 1999). Folglich sind GPCR an der Kontrolle vieler physiologischer Vorgänge, wie auch unserem Verhalten beteiligt (Hamm, 1998; Gether, 2000). Diese zentrale Bedeutung von GPCR wird u.a. dadurch deutlich, dass sie in pathologische Prozesse, wie kardiovaskuläre und mental-psychische Störungen, Degeneration der Netzhaut, Krebs und AIDS, involviert sein können (Berger et al., 1999; Rattner et al., 1999; Rockman et al., 2002; Schöneberg et al., 2002; Seifert et al., 1999; Unger, 2002).

Über 3% der menschlichen Gene entsprechen GPCR-Genen, woraus die sehr große Bedeutung der GPCR in der Pharmakologie ersichtlich wird. Mehr als die Hälfte aller neu eingeführten Arzneistoffe sind gegen Rezeptoren dieser Klasse gerichtet, um deren Wirkung zu stimulieren oder zu blockieren (Sautel et al., 2000; Schwalbe et al., 2002).

1.1.1 Struktur

Obwohl die GPCR keine allgemeine Proteinsequenzhomologie aufweisen, haben sie charakteristische strukturelle und funktionelle Gemeinsamkeiten. So zeichnen sich alle GPCR topologisch durch sieben α -helikale Transmembrandomänen (TMD) aus, die durch alternierende intra- und extrazelluläre Schleifen miteinander verbunden sind. Zudem tragen diese Rezeptoren einen extrazellulären Aminoterminus (N-Terminus) und einen intrazellulären Carboxyterminus (C-Terminus), deren Länge rezeptorspezifisch sehr variieren kann. Signifikante Proteinsequenzhomologien innerhalb der TMD lassen eine Einteilung der Rezeptoren in drei Familien zu:

Die Familie A der Rhodopsin-verwandten Rezeptoren, die Familie B der Glucagonrezeptor-ähnlichen Rezeptoren und die Rezeptoren der Familie C, deren Struktur den metabotropen Neurotransmitterrezeptoren ähnlich ist. Die Pheromonrezeptoren STE2 und STE3 der Hefen sowie vier unterschiedliche cAMP-Rezeptoren aus *Dictyostelium Discoideum* bilden drei weitere kleinere Familien (siehe: <http://www.gpcr.org/phylo/phylo.html>; Strader et al., 1995).

Die mit Abstand größte und am besten untersuchte Familie ist die der Rhodopsin-verwandten Rezeptoren, zu der auch die Angiotensinrezeptoren gehören. Diese Familie zeichnet sich durch verschiedene, hoch konservierte Eigenschaften aus. So verfügen alle Rezeptoren der Familie über eine Disulfidbrücke zwischen der ersten und zweiten extrazellulären Schleife und einer Palmitoylierungsstelle am zytoplasmatischen Ende, die zur Ausbildung einer vierten intrazellulären Schleife führt. Ebenso hoch konserviert sind die Motive Glu/Asp-Arg-Tyr (E/DRY) auf der zytoplasmatischen Seite der dritten TMD und Asn/Asp-Pro-xx-Tyr (N/DPxxY) auf der zytoplasmatischen Seite der siebten TMD, wobei x jeder beliebigen genetisch kodierten Aminosäure entsprechen kann.

1.1.2 Ligandenbindung

Die Ligandenbindung der GPCR ist abhängig von den strukturellen Eigenschaften der Rezeptoren, sowie der Art der Liganden. Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass die Bindung von größeren Peptidliganden, wie beispielsweise der Chemokine und auch der Angiotensine, vor allem über die extrazellulären Domänen, insbesondere über den N-Terminus der Familie A Rezeptoren erfolgt (Leong et al., 1994; Hjorth et

Einleitung

al., 1994; Feng et al., 1995; Heerding et al., 1997). Kleine Moleküle wie Eicosanoide, Purine und biogene Amine, aber auch das Chromophor 11-cis-Retinal des Rhodopsins gehen Wechselwirkungen tief in der von den TMD gebildeten Bindungstasche der Familie A Rezeptoren ein (Sakmar, 1998; Ji et al., 1998; Mansour et al., 1992; Wang et al., 1993; Gantz et al., 1992).

Eine wichtige pharmakologische Erkenntnis ist, dass Peptidliganden in einigen Fällen durch kleine peptidfremde Moleküle ersetzt werden können, die deutlich stabiler und leichter zu applizieren sind als Peptide. Diese Moleküle können sowohl als Antagonisten, aber auch als Agonisten eingesetzt werden (Schwartz et al., 1995; Rohrer et al., 1998). Das führte dazu, dass GPCR das Ziel einer sich schnell entwickelnden Forschung zur Entdeckung neuer pharmakologischer Komponenten wurden (Hughes et al., 1975; Schwartz et al., 1995).

Bereits 1971 wurde das Peptid Saralasin als Angiotensin II (AngII)-Rezeptorantagonist eingeführt (Pals et al., 1971), seine blutdrucksenkende Eigenschaft 1979 erstmals an Patienten beschrieben. Saralasin ist als Peptid nicht oral bioverfügbar und kann zudem nicht zwischen den beiden AngII-Rezeptorsubtypen-1 (AT1) und -2 (AT2) diskriminieren. Als erster peptidfremder, synthetischer und hochselektiver Ligand des AT1-Rezeptors wurde 1995 das benzylsubstituierte Imidazolderivat Losartan als Rezeptor-Antagonist eingeführt. Bindungsstudien an den AngII-Rezeptoren mit dem peptidfremden Antagonisten PD123177 führten dann zur Entdeckung des AT2-Rezeptors, des weiteren, wichtigen AngII-Rezeptor Subtyps (Timmermans PB et al., 1993).

Interessant ist zum einen, dass die kleinen peptidfremden Moleküle, die an die GPCR binden, keinerlei strukturelle Verwandtschaft zu den endogenen Peptidliganden aufweisen müssen, und zum anderen, dass unterschiedliche Aminosäurereste der GPCR an der Bindung beteiligt sein können (Turcatti et al., 1997). Dadurch kann es mehrere Möglichkeiten geben, ein und denselben GPCR zu aktivieren (Schwartz und Rosenkilde, 1996).

1.1.3 G-Protein-Kopplung

Die Bindung von spezifischen extrazellulären Liganden induziert in GPCR eine Konformationsänderung, die zur Rezeptoraktivierung führt. Die Rezeptor-assoziierten G-Proteine auf der Innenseite der Zellmembran leiten das Signal in das Zellinnere weiter und beginnen die Signalkaskade. G-Proteine sind heterotrimer und jeweils aus

Einleitung

einer α -, β - und γ -Untereinheit zusammengesetzt. Bei ihrer Aktivierung wirken GPCR als Guaninnukleotid-Austauschfaktoren (guaninucleotide exchange factors, GEFs), wobei das an der α -Untereinheit gebundene GDP durch GTP ausgetauscht wird. Sowohl die durch GTP-Bindung aktivierte α -Untereinheit als auch das Dimer aus den β - und γ -Untereinheiten dissoziiert darauf vom Rezeptor. In diesem Zustand können sie verschiedene Effektorproteine durch Protein-Protein-Interaktion aktivieren, und zwar, unabhängig voneinander, synergistisch oder antagonistisch (Neer und Clapham, 1988). Die intrinsische GTPase-Aktivität der α -Untereinheit sorgt wiederum für die Umsetzung von GTP zu GDP unter Freisetzung eines Phosphatrestes. Die α -Untereinheit koppelt wieder an den Rezeptor und die $\beta\gamma$ -Untereinheit; sie kann bei der nächsten Stimulierung des Rezeptors erneut aktiviert werden (Conklin und Bourne, 1993; Inglese et al., 1995).

Über diesen Kopplungsmechanismus wird ein Signal nicht nur von außen in die Zelle weitergeleitet, sondern auch deutlich verstärkt. Es wird eine Signalkaskade aufgebaut, in der jeder aktivierte Rezeptor eine Vielzahl von G-Proteinen aktiviert und so zur Signalübertragung auf entsprechend viele Effektorenzyme beiträgt. Jedes aktivierte Effektorenzym kann das Signal wiederum um das Hundert- bis Tausendfache verstärken. Zudem können einige GPCR unterschiedliche G-Proteintypen aktivieren und so das Signal diversifizieren. So sind für den AT1-Rezeptor Kopplungen mit dem Gi-, Gq- und Go-G-Protein beschrieben (Shirai et al. 1995).

1.1.4 Heterotrimere G-Proteine

Der ungeheuren Vielzahl von GPCR steht nur eine limitierte Anzahl von G-Proteinen gegenüber, wobei einige von ihnen ubiquitär, andere nur in bestimmten Geweben exprimiert werden. Es sind zurzeit nur 16 α -Untereinheiten bekannt, die aufgrund von Sequenzhomologien in die vier Familien Gas, Gai, Gaq und $G\alpha_{12/13}$ aufgeteilt werden. Die strukturelle und funktionelle Klassifizierung der trimären G-Proteine wurde über ihre α -Untereinheit definiert. Die α -Untereinheit ist assoziiert mit dem $\beta\gamma$ -Dimer, das sich aus jeweils einer Untereinheit der fünf β - und 12 γ -Untereinheiten zusammensetzt. Die lineare Sequenz der β -Untereinheiten besteht aus sieben oder acht Tandem-Wiederholungen mit einer zentralen konservierten Trp-Asp-Sequenz, auch "WD-40"-Motiv genannt (Garcia-Higuera et al., 1998). Die γ -Untereinheiten sind in ihrer Primärsequenz weniger konserviert als die β -Untereinheiten und werden zur Verankerung des $\beta\gamma$ -Dimers in der Zellmembran am

Einleitung

C-Terminus prenyliert, wobei die retinale G1-Untereinheit farnesyliert und die anderen G-Untereinheiten in Säugetieren geranylgeranyliert werden (Casey, 1995; Iniguez-Lluhi et al., 1992).

Diese Verankerung in der Zellmembran führt zu einer Einschränkung auf eine nur zweidimensionale Bewegungsfreiheit. Da sowohl die GPCR als auch die allermeisten Effektormoleküle in der Zellmembran residieren, führt diese Einschränkung zu einer Beschleunigung der Signaltransduktion.

Reguliert werden die G-Proteine unter anderem durch GTPase aktivierende Proteine (GAPs), die die intrinsische GTPase-Aktivität der α -Untereinheit unterstützen. Außerdem wird die Hydrolyse von GTP an der aktivierten α -Untereinheit trimärer G-Proteine von den Regulatoren der G-Protein-Signalübertragung (RGS-Proteine) stimuliert, deren Familie mehr als 20 Mitglieder zählt (De Vries et al., 2000).

Die $\beta\gamma$ -Untereinheit trimärer G-Proteine wird durch das Protein Phosducin reguliert, das fest an das $\beta\gamma$ -Dimer bindet und so dessen Interaktion mit der α -Untereinheit und den Effektoren inhibiert (Bluml et al., 1997).

1.1.5 Effektoren der G-Proteine

Die α - und $\beta\gamma$ -Untereinheiten der G-Proteine regulieren die Aktivitäten von strukturell ganz unterschiedlichen Gruppen von Effektormolekülen, bestehend aus Enzymen zur Synthese intrazellulärer Signalmoleküle, so genannter "second messenger", sowie Ionenkanälen. Eine Übersicht über die G-Protein-Effektoren ist in Tabelle 1.1 gegeben.

Die Aktivierung dieser Enzyme und Kanäle hat eine Konzentrationsänderung von diffusionsfähigen Signalmolekülen zur Folge, welche das Rezeptorsignal verstärken und, von der Zellmembran ausgehend, in der gesamte Zelle verbreiten.

Die weit verbreitete Adenylatzyklase katalysiert die Bildung von zyklischem AMP (cAMP) aus dem Substrat Mg^{2+} -ATP (Iyengar, 1993). Die cGMP-Phosphodiesterase spielt eine zentrale Rolle im visuellen System von Wirbeltieren und katalysiert die Bildung von cGMP (Hamm, 1991).

Die Hydrolyse von Inositollipiden wird von der Phospholipase C (PLC) katalysiert. Es gibt drei PLC-Familien, die als PLC- β , - γ und - δ bezeichnet werden, wobei die PLC- β -Familie mit ihren vier Isoenzymen von G-Proteinen aktiviert werden kann (Tab. 1.1). Sie katalysiert die Umsetzung von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂)

Einleitung

in das Protein-Kinase C (PKC)-aktivierende Diacylglycerin (DAG) und das Ca^{2+} -Kanäle öffnende Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP3) (Rhee und Choi, 1992).

Phosphoinositol-3-Kinasen sind ATP-abhängige Enzyme, die die Phosphorylierung der D-3-Hydroxylgruppen der drei häufigsten myo-Inositol enthaltenden Phospholipide katalysieren, so dass aus Phosphatidylinositol (PI), Phosphatidylinositol-4-phosphat und Phosphatidylinositol-3-phosphat PIP2, Phosphatidylinositol-3,4-bisphosphat sowie Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat gebildet werden (Vanhaesebroeck et al., 1997).

Die Phospholipase A2 setzt Arachidonat von Zellmembranlipiden frei, eine Vorstufe in der Synthese von Prostaglandinen. Man unterscheidet sekretorische Formen mit geringen und zytosolische Formen mit hohem Molekulargewicht (Dennis, 1997). Zudem spielen G-Proteine eine entscheidende Rolle bei der Aktivierung und Modulierung von K^+ -, Ca^{2+} -, Na^+ - und Cl^- -Kanälen (Clapham, 1994).

| Gruppe | Isotypen | G-Protein Selektivität |
|--------------------------|---|---|
| Adenylatzyklase | I | $\alpha_s \uparrow$, $\alpha_o \downarrow$, $\alpha_z \downarrow$, $\beta\gamma \downarrow$ |
| | II, IV | $\alpha_s \uparrow$, $\beta\gamma \uparrow$ |
| | III, VI, VIII, IX | $\alpha_s \uparrow$ |
| | V | $\alpha_s \uparrow$, $\alpha_z \downarrow$ |
| cGMP-Phosphodiesterase | | $\alpha_T \downarrow$ |
| Phospholipase C | β_1 , β_2 , β_3 , β_4 | $\alpha_q \uparrow$, $\alpha_{11} \uparrow$, $\alpha_{15} \uparrow$, $\alpha_{16} \uparrow$, $\beta\gamma \uparrow$ |
| Phosphoinositol-3-kinase | P120 γ , p101 | $\beta\gamma \uparrow$, $\alpha_o \uparrow$ |
| Phospholipase A2 | | $\beta\gamma \uparrow$ |
| K^+ -Kanäle | IK.ACH | $\alpha_i \uparrow$, $\beta\gamma \uparrow$ |
| | IK.ATP | $\alpha_i \uparrow$ |
| Ca^{2+} -Kanäle | neuronaler N-Typ | $\alpha_{i1} \downarrow$, $\alpha_{i2} \downarrow$, $\beta\gamma \downarrow$ |
| | cardialer L-Typ | $\alpha_s \uparrow$ |
| Na^+ -Kanäle | cardial | $\alpha_s \uparrow$ |
| | epithelial | $\alpha_{i3} \downarrow$ |
| | cardial | $\alpha_s \uparrow$ |
| | epithelial | $\alpha_i \downarrow$ |

Tabelle 1.1 G-Protein-Effektoren (nach: Morris und Malbon, 1999);
 \uparrow aktivierend; \downarrow inhibierend

1.1.6 GPCR Regulation

Die Dissoziation des Agonisten vom Rezeptor ist der zeitlich schnellste Vorgang, der zur Signalabschaltung führt. Bei häufiger Stimulation des Rezeptors durch seinen Agonisten ist aber oftmals eine Abschwächung des Signals zu beobachten. Dieser Vorgang wird als Desensibilisierung bezeichnet. Als homologe Desensibilisierung wird die Verminderung der Signalübertragung des Rezeptors in Gegenwart seines Agonisten bezeichnet. Eine heterologe Desensibilisierung erfolgt, wenn ein nichtstimulierter Rezeptor durch die Stimulation eines anderen Rezeptors desensibilisiert wird und dadurch nicht mehr stimulierbar ist.

Eine wichtige Rolle für die Desensibilisierung spielt die Phosphorylierung von bestimmten Serin- und/oder Threoninresten an den intrazellulären Domänen des Rezeptors. Sie wird durch verschiedene Kinasen (z.B. cAMP-abhängige Proteinkinase A, Ca^{2+} /Phospholipid-abhängige Proteinkinase C oder G-Protein gekoppelte Rezeptor-Kinasen) katalysiert, die über „second messenger“ aktiviert werden und so mittels negativer Rückkopplung zur Beendigung des Signals führen (Bünemann und Hosey, 1999).

Die Rezeptorphosphorylierung begünstigt die Bindung von zytosolischen β -Arrestinen an die GPCR. Die β -Arrestin-Bindung verhindert die erneute Kopplung von G-Proteinen an die Rezeptoren und führt zur Rezeptor-Internalisierung. Gleichzeitig ermöglichen die β -Arrestine als Adapter die funktionelle Interaktion mit dem Protein Clathrin, das die Dynamin-abhängige oder -unabhängige Internalisierung zu intrazellulären Kompartimenten einleitet (Oakley et al., 1999; Cao et al., 1998; Luttrell, 1999; Roettger et al., 1995). Es sind jedoch auch Fälle bekannt, in denen Caveolin-haltige Vesikel die Internalisierung von GPCR vermitteln (Anderson, 1998). Die Internalisierung eines Ligand-besetzten Rezeptors erfolgt in Form endozytotischer Vesikel, in denen der intrazelluläre Transport erfolgt. Nach Dephosphorylierung durch Phosphatasen, sowie der Dissoziation des Liganden (Cornea et al., 1999) wird der Rezeptor zurück zur Zelloberfläche gebracht, wo er erneut aktiviert werden kann. Internalisierte Rezeptoren unterliegen aber zu einem gewissen Anteil auch der Degradation, d.h. diese Rezeptoren werden durch Proteasen abgebaut. GPCR, die im Laufe ihrer Aktivierung irreversibel verändert werden, wie es bei Protease-aktivierten Rezeptoren (PAR1-3) der Fall ist, unterliegen

Einleitung

naturgemäß einem Abbau und sind beispielhaft für GPCR-Regulation, die in starkem Maß auf transkriptioneller Ebene stattfindet. Die Ergebnisse einer Arbeit von Shenoy et al., 2001, deuten darauf hin, dass β -Arrestine nicht nur eine Adapter-Funktion für die Internalisierungsmechanismen übernehmen, sondern ebenfalls direkten Einfluss auf die Rezeptor-Degradierung ausüben. β -Arrestine regulieren beispielsweise die Ubiquitinierung des β 2-adrenergen Rezeptors (β 2AR) durch E2 Ubiquitin-Ligasen (Stous & Govers, 1999; zur Übersicht siehe: Ferguson SS., 2001).

Darüber hinaus weisen die Ergebnisse einer Arbeit von Daaka et al., 1998, darauf hin, dass die GPCR-Internalisierung funktioneller Teil des Aktivierungsprozesses sein kann. So bildet die Translokation der GPCR zu intrazellulären Kompartimenten der Zelle die Voraussetzung für die G-Protein-unabhängige Aktivierung einer Mitogen-aktivierten Protein-Kinase (Daaka et al., 1998).

1.1.7 Dimerisierung

Im Gegensatz zu anderen plasmamembranständigen Rezeptoren, wie z.B. den Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTK), für die die funktionelle Dimerisierung Teil des Aktivierungsprozesses darstellt, wurden GPCR lange Zeit als funktionelle Monomere angesehen. In den letzten Jahren aber hat sich gezeigt, dass eine ganze Reihe GPCR die Fähigkeit zur Dimerisierung besitzen (Hébert und Bouvier, 1998). Über die genauen Mechanismen sowie die funktionelle Relevanz der Dimerisierung ist bislang noch wenig bekannt. Die Arbeitsgruppe um Qwitterer et al. konnte zeigen, dass die GPCR der vasoaktiven Peptide Bradykinin und AngII ihre Signalwirkung mittels Heterodimerisierung modulieren. So kann der AT1-Rezeptor seine AngII induzierte Aktivität durch Heterodimerisierung mit dem Bradikinin Rezeptor auf diesen übertragen und dadurch verstärken (AbdAlla et al., 2000; 2001a). Eine Heterodimerisierung des AT1-Rezeptors mit dem AT2-Rezeptor jedoch führt zu einer Antagonisierung des Signals des AT1-Rezeptors (AbdAlla et al., 2001b). Diese Homo- und Heterodimerisierungen der GPCR führen zu einer neuen Stufe an Komplexität, da sie den stöchiometrischen Verhältnissen, in denen die Rezeptoren zueinander stehen, ein größeres Gewicht bei der Betrachtung der Rezeptorfunktionen verleiht (zur Übersicht siehe: Milligan et al. 2003).

Einleitung

Sie können aber auch eine Hilfe bei der Entschlüsselung von Signaltransduktionswegen von GPCR sein, deren Signaltransduktion noch im Dunkeln liegt. So ist die Signaltransduktionskaskade des AT₂-Rezeptors noch nicht hinreichend bekannt. Ein Wirken des Rezeptors über Hetero- und/oder Homodimerisierungen mit anderen GPCR würde neue Ansätze für Hypothesen bieten und helfen, die ihm zugesprochene intrinsische Aktivität zu erklären (Miura and Karnik, 2000).

1.1.8 G-Protein unabhängige Interaktionspartner

Eine stetig wachsende Zahl von Hinweisen hat in den letzten Jahren zu einer Modifizierung des ursprünglichen Verständnisses über die Physiologie von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren geführt, wonach ein GPCR spezifisch mit nur einem Typ von G-Proteinen interagiert. GPCR sind vielmehr in der Lage, mit den unterschiedlichsten intrazellulären Proteinklassen zu interagieren und so ein hochkomplexes Signaltransduktionsnetzwerk mit zahlreichen Regulationsebenen aufzubauen. Neben der Ausbildung von funktionellen GPCR-Homo- und Heterodimeren werden funktionelle Interaktionen mit Rezeptor-Tyrosin-Kinasen, zytoplasmatischen Regulatorproteinen und Komponenten des Zytoskeletts beschrieben (siehe Reviews: Selbie & Hill, 1998; Bockaert & Pin, 1999; Marinissen & Gutkind, 2001; Bockaert et al., 2003). Neue Technologien wie das *Yeast two-hybrid* System und *Proteomics* haben zur Entdeckung einer Vielzahl von GPCR-assoziierten Proteinen geführt.

Der zytosolische C-Terminus des AT₁-Rezeptors hat wichtige Funktionen in der Rezeptor-Phosphorylierung, -Desensibilisierung und -Internalisation. In diesem Zusammenhang sind die β -Arrestine (β -Arrestin-1 und β -Arrestin-2) die am besten beschriebenen G-Protein-unabhängigen Interaktionspartner des zytosolischen C-Terminus des AT₁-Rezeptors. Es ist für eine Vielzahl von GPCR gezeigt, dass sie von β -Arrestinen über ihren phosphorylierten C-Terminus gebunden werden und zur Internalisierung und Desensibilisierung des Rezeptors beitragen (siehe 1.1.6 GPCR-Regulation). β -Arrestine haben zudem Funktionen in den G-Protein-unabhängigen Signaltransduktionskaskaden der GPCR. Sie binden sowohl die Komponenten der MAPK-Kaskaden als auch die aktivierten GPCR und fügen sie auf diese Weise zu einem Multiprotein-Komplex zusammen. Proteine, deren Aufgabe es ist,

Einleitung

Komponenten eines Signalwegs in räumliche Nähe zueinander zu bringen, werden in der Literatur als „scaffolding proteins“ bezeichnet.

So ist der AT1-Rezeptor in der Lage, unabhängig von G-Proteinen, zwei unterschiedliche MAPK-Kaskaden zu aktivieren, wobei die eine zur Aktivierung der ERK1/2, die andere zur Aktivierung der JNK führt. Nur über das „scaffolding“ durch β -Arrestine, das die Komponenten dieser Phosphorylierungskaskaden zu Multiprotein-Komplexen zusammenbringt, ist der AT1-Rezeptor fähig, diese Kaskaden zu aktivieren (Tohgo et al., 1999; McDonald et al., 2000; Luttrell et al., 2001). Dieses „scaffolding“ der β -Arrestine konnte des Weiteren für den Neurokinin-1 Rezeptor, die Protease-aktivierten Rezeptoren und den Vasopressin-2 Rezeptor beschrieben werden (Thomas and Qian, 2003; Luttrell and Lefkowitz, 2002). So führt die Bindung der β -Arrestine an die GPCR zum Ende der Aktivierung der G-Proteine und vermittelt gleichzeitig über „scaffolding“ die Aktivierung der G-Protein unabhängigen Signale.

Der intrazelluläre Transport von internalisierten Vesikeln ist ein hochgradig regulierter Prozess, an dem eine Vielzahl von Adaptermolekülen beteiligt ist. Werden GPCR durch β -Arrestine gebunden und internalisiert, sorgen verschiedene Interaktionspartner für eine Zielsteuerung der Transportvesikel (zur Übersicht: Seachrist and Ferguson, 2003). Es wurden mittels *Yeast Two-Hybrid Screen* AT1-Rezeptor-interagierende Proteine entdeckt, die eine Funktion in diesem Vesikeltransport haben. So zeigte Seachrist et al., 2002, eine Interaktion des AT1-Rezeptors mit Rab5, einem kleinen GTP-bindenden Protein. Die Bindung des Rezeptors an Rab5 verhindert den Transport des Vesikels zu Lysosomen und damit die Degradierung des AT1-Rezeptors. Eine Überexpression des Rab7 indes bewirkt eine verstärkte lysosomale Degradierung des AT1-Rezeptors, während ein verstärktes Rezeptor-„recycling“ über Rab11 nachgewiesen wurde. Die kleinen G-Protein-bindenden Proteine Rab5, Rab7 sowie Rab11 können über Bindung an den C-Terminus des AT1-Rezeptors den Vesikeltransport und auf diese Weise die Rezeptordichte auf der Plasmamembran regulieren (Seachrist et al., 2002; Dale et al., 2004). Eine ähnliche Rolle wurde für das Guanylat-Austausch Protein ARAP1 nachgewiesen. Bindet ARAP1 an den C-Terminus des AT1-Rezeptors, wird dieser nach erfolgter Internalisation in verstärktem Maße an die Plasmamembran „recycled“ und dort reaktiviert (Guo et al., 2003).

In einigen Fällen konnte eine direkte Interaktion der GPCR mit ihren Effektoren nachgewiesen werden. So beschrieben Marrero et al. eine YIPP-Domäne im intrazellulären C-Terminus des AT1-Rezeptors, wodurch die direkte Interaktion mit dem Effektor Janus Kinase 2 (JAK2) und weiterführend die Aktivierung der STAT1- und STAT2- (*Signal Transducers and Activators of Transcription*) Signalwege stattfindet. Bemerkenswerterweise werden diese Signalwege klassisch nur von Zytokin-Rezeptoren aktiviert (Marrero et al., 1995; Ali et al., 1997). Ferner ermöglicht diese YIPP-Domäne eine Interaktion mit dem AT1-Rezeptor-Effektor PLC γ 1. Nach AngII-Stimulation interagiert der AT1-Rezeptor mit PLC γ 1 und aktiviert diesen Effektor (Venema et al., 1998). Eine einzige Domäne im C-Terminus des AT1-Rezeptors kann somit zwei völlig unterschiedliche Effektoren binden und unabhängig von G-Proteinen aktivieren.

1.2 Das Renin-Angiotensin System

Das Renin-Angiotensin-System (RAS) steuert durch Angiotensinrezeptoren Gefäßtonus, Blutdruck und Wachstumsprozesse und interagiert mit der Elektrolytaufnahme, dem endokrinen und parakrinen System, der Aldosteronproduktion und der Katecholaminfreisetzung (Übersicht in: Kaschina und Unger, 2003). Bei verringertem Blutfluß in den Nieren setzen juxtaglomeruläre Zellen die Aspartylprotease Renin ins Blut frei, die die Umwandlung des in der Leber gebildeten Angiotensinogens zum Dekapeptid Angiotensin I (AngI) katalysiert. Auf der Oberfläche von Endothelien befindet sich die Dipeptidyl-Carboxypeptidase „*angiotensin converting enzyme*“ (ACE), die AngI in das Oktapeptid Angiotensin II (AngII) umwandelt. Daneben kommen AngII-produzierende Komponenten des RAS in Gefäßen, in den Nebennieren und dem Herzen vor. Für weitere Angiotensinfragmente wie das durch verschiedene Aminopeptidasen synthetisierte Angiotensin III (Ang 2-8), Angiotensin IV (Ang 3-8) und Ang1-7 konnten ebenfalls biologische Wirkungen nachgewiesen werden. Die Degradierung durch Angiotensinasen führt schließlich zu inaktiven Metaboliten (zur Übersicht: Timmermans et al., 1993).

AngII wirkt auf die glatte Gefäßmuskulatur als ein potenter Vasokonstriktor. Über das sympathische Nervensystem beeinflusst es die Kontraktilität des Herzens und die Herzfrequenz. In der Nebennierenrinde bewirkt AngII die Synthese von Aldosteron, was in den Nieren zu einer verstärkten Natriumionen- und Wasserrückresorption

Einleitung

führt. Weiterhin erhöht AngII das Durstgefühl, stimuliert die Sekretion von Antidiuretischem Hormon und ist für einige Zelltypen (glatte Gefäßmuskelzellen, Fibroblasten und Kardiomyozyten) ein wachstums- bzw. hypertrophieinduzierender Faktor (zur Übersicht: Unger et al., 1996).

Bis heute sind zwei Rezeptoren für AngII pharmakologisch charakterisiert und kloniert, der AT₁- und AT₂-Rezeptor (zur Übersicht: de Gasparo, 2000). Eine Unterscheidung dieser beiden Rezeptoren wurde durch die Entwicklung hochselektiver Antagonisten möglich (Timmermans et al., 1993). Der AT₁-Rezeptor zeigt eine geringe Affinität zu den Tetrahydroimidazolpyridinen PD-123177 und PD-123319, aber eine hohe Affinität zu den Biphenylimidazolen, den „Sartanen“. Der AT₂-Rezeptor zeigt ein genau entgegengesetztes Bindungsverhalten zu diesen Antagonisten (Brechler et al., 1993). Beide Rezeptoren verfügen über eine ähnliche Affinität zu AngII und sind G-Protein-gekoppelte Rezeptoren mit sieben transmembranären Domänen (TMD), wobei für den AT₂-Rezeptor eine G-Proteinkopplung nicht sicher nachgewiesen werden konnte. Dabei weisen AT₁- und AT₂-Rezeptoren eine Aminosäuresequenzhomologie von lediglich 34% auf. Unterschiede zwischen ihnen bestehen in Bezug auf ihre Expression in den verschiedenen Organen, die subtypspezifische Bindung von Liganden, die Signaltransduktionswege und die von den Rezeptoren vermittelten Wirkungen (zur Übersicht siehe Tabelle 1.2).

| AT₁ | AT₂ |
|-----------------------------------|--------------------------|
| Vasokonstriktion | Vasodilation |
| Zellproliferation | Apoptose |
| Zellhypertrophie | Inhibition des Wachstums |
| Antinatriurese | Natriurese |
| Superoxide Produktion | NO-Produktion |
| Endothelin Freisetzung | Kollagensynthese |
| Lipidperoxidation | |
| Expression von Adhäsionsmolekülen | |
| Expansion der Vaskulärmatrix | |

Tabelle 1.2 Physiologische Effekte des AT₁- und AT₂-Rezeptors

1.2.1 Der AT1-Rezeptor

Der AT1-Rezeptor gehört der Familie der Rhodopsin-verwandten GPCR an und stellt im adulten Organismus den dominierenden Rezeptorsubtyp des AngII dar. Besonders ausgeprägt kommt der AT1-Rezeptor in Nieren, Arterien, Nebennieren, im Myokard, im zentralen und peripheren Nervensystem, in Fortpflanzungsorganen und der Leber vor. Die meisten der heute bekannten physiologischen Effekte von AngII wie Vasokonstriktion, Aldosteronsekretion, Hypertrophie, Zellwachstum, Katecholamin-freisetzung und renale Reabsorption von Natriumionen werden über den AT1-Rezeptor vermittelt.

Der AT1-Rezeptor kann als ein „klassischer“ GPCR angesehen werden, da seine Signaltransduktion zum großen Teil über die Stimulation verschiedener Typen von G-Proteinen vermittelt wird. So führt die AT1-Rezeptor-Stimulation zum einen zur Aktivierung des G_i -Proteins und damit zur Hemmung der Adenylatzyklase und zur Senkung des cAMP-Spiegels in der Zelle. Zum anderen verläuft über das G_q -Protein eine Aktivierung der Phospholipase C- β (PLC β), welche eine Freisetzung von 1,4,5-Inositol-trisphosphat (IP3) und Diacylglycerol (DAG) katalysiert. Dieses hat einen Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration sowohl durch Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern als auch durch Einstrom von Ca^{2+} -Ionen nach Öffnung des L-Typ Calcium-Kanals zur Folge. Der Anstieg der Ca^{2+} -Ionenkonzentration in der Zelle führt anschließend zur Aktivierung der PKC, einem Aktivator der MAPK-Kinase (MEK) und damit zur Stimulation der ERK1/2 Signalkaskade (zur Übersicht: Kaschina und Unger, 2003).

Ein anderer Aktivierungsweg der MAPK-Kaskade durch den AT1-Rezeptor verläuft unabhängig von G-Proteinen über den Ras-Raf-MAPK-Signaltransduktionsweg und ähnelt damit der Signaltransduktion der Rezeptortyrosinkinasen, wie z.B. dem PDGF- (*platelet derived growth factor*) Rezeptor (Tohgo et al., 1999; McDonald et al., 2000; Luttrell et al., 2001). In beiden Fällen kommt es durch die aktivierten MAPK zur Induktion und Aktivierung der Protoonkogene c-fos und c-jun (Xie et al., 1996). Weiterhin aktiviert AngII über den AT1-Rezeptor die MAPK p38 (Eguchi et al., 2001; Touyz et al., 2001), die JNK (Kudoh et al., 1997) und den JAK/STAT-Signaltransduktionsweg (McDonald et al., 2000), der auch von vielen Zytokinen aktiviert wird. Zusammengefasst ist die Signaltransduktion des AT1-Rezeptors ausgesprochen komplex und umfasst sowohl die für Sieben-transmembranäre

Rezeptoren typischen G-Protein-gekoppelten, wie auch verschiedene G-Protein-unabhängige Signaltransduktionswege.

1.2.2 Der AT2-Rezeptor

Wie der AT1-Rezeptor gehört auch der AT2-Rezeptor der Familie der Rhodopsin-verwandten GPCR an. Aufgrund seines GPCR-untypischen Verhaltens, wie dem Ausbleiben der Internalisation und der fehlenden G-Protein Kopplung, nimmt er aber innerhalb dieser Klasse eine Sonderstellung ein (Stoll und Unger, 2001). Die den AT2-Rezeptor-kodierende cDNA konnte bereits aus verschiedenen Spezies kloniert und sequenziert werden (Mukoyama et al., 1993). Sowohl im Menschen als auch in Rodentia ist das Gen des AT2-Rezeptors X-chromosomal lokalisiert (Koike et al., 1994). Die Struktur des Gens ist hoch konserviert und besteht aus drei Exonen, wobei sich die kodierende Sequenz ausschließlich auf dem dritten Exon befindet (Martin et al., 1996). Diese Gen-Struktur lässt keine Spleißvarianten auf Proteinebene des AT2-Rezeptors erwarten.

Es hat sich bei der Arbeit an Zellkulturen, die den AT2-Rezeptor exprimieren, gezeigt, dass die Kulturbedingungen die Expression des Rezeptors stark beeinflussen. So ist die AT2-Rezeptordichte in proliferierenden Zellen nur sehr gering, kommen die Zellen aber in ein konfluentes Stadium oder werden in serumfreien Medium kultiviert, so wird die Expression des Rezeptors aktiviert und die Rezeptordichte nimmt rapide zu. Werden die Zellen durch Zusatz von Serum zur Proliferation stimuliert, verringert sich die Rezeptordichte. Zudem wird die Expression des AT2-Rezeptors durch verschiedene Wachstumsfaktoren sowie die Aktivierung des AT1-Rezeptors inhibiert. Jedoch ist die Regulation der Expression des AT2-Rezeptors weitaus komplexer als nur eine inverse Relation zur Zellproliferation, denn sie ist bei einigen Zelllinien auch von der Passagezahl der Zellen abhängig und kann zudem durch inflammatorische Faktoren, Steroide und die Stimulation des AT2-Rezeptors selbst initiiert werden (zur Übersicht siehe Tabelle 1.3).

| AT2-Rezeptor-Expression steigernd | AT2-Rezeptor-Expression senkend |
|---|---|
| Basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) (Ichiki et al., 1995a) | Insulin (Ichiki et al., 1995b) |
| Epidermal Growth Factor (EGF) (Kizima et al., 1996) | Insulin-like growth factor (IGF) (Kambayashi et al., 1996) |
| Nerve Growth Factor (NGF) (Li et al., 1998) | Interleukin 1b (Il1b) (Armando et al., 2002) |
| Platelet Derived Growth Factor (PDGF) (Li et al., 1999) | Östrogen (Shibata et al., 1997) |
| AngII via AT1-Rezeptor (Li et al., 1999) | AngII via AT2-Rezeptor (Stoll et al., 2002). |

Tabelle. 1.3 AT2-Rezeptor-Expression beeinflussende Faktoren

1.2.2.1 Funktionen des AT2-Rezeptors

Die erste für den AT2-Rezeptor beschriebene Funktion war sein antiproliferativer Effekt auf kultivierte koronare Endothelzellen, der von Stoll et al., 1995, gezeigt werden konnte. Diese Funktion wurde in weiteren Studien sowohl an den neuronalen Zelllinien NG108-15 und PC12W, sowie R3T3 Fibroblasten und renalen Mesangialzellen bestätigt (Goto et al., 1997; Munzenmaier und Greene, 1996; Tsuzuki et al., 1996). Ein weiterer Effekt des AT2-Rezeptors ist die Induktion einer Differenzierung von Zellen. Dieses wurde in erster Linie an Zellen neuronalen Ursprungs wie den PC12W- und NG108-15-Zellen (Meffert et al., 1996; Laflamme et al., 1996), aber auch an *vascular smooth muscle cells* (VSMC) gezeigt (Yamada et al., 1999).

Die hohe Expressionsrate des AT2-Rezeptors während der Embryogenese unterstützt die Hypothese, dass der Rezeptor eine Funktion in der Regulation von Zellproliferation und Differenzierung hat. Da die Expression des Rezeptors ihren Höhepunkt in der späten Embryogenese erreicht und in den ersten Tagen nach der Geburt rapide zurückgeht, wird eine besondere Rolle des Rezeptors in der Entwicklung des vaskulären Systems diskutiert (Shanmugam und Sandberg, 1996).

Einleitung

Im adulten Organismus ist der AT₂-Rezeptor in nur wenigen Geweben exprimiert, so ist er in niedrigen Konzentrationen in Nebenniere, Herz, Aorta, Niere und einigen Hirnregionen, Myometrium, Ovar, Testis und Lunge zu finden (zur Übersicht: de Gasparo et al., 2000).

Eine Reexpression von AT₂-Rezeptoren erfolgt beim „Remodeling“ von Geweben, z.B. bei kardiovaskulären Erkrankungen wie Herzinsuffizienz, experimentell induzierter kardialer Hypertrophie, Myokardinfarkt, sowie bei Gefäßverletzung, Wundheilung und Nervenschädigung (zur Übersicht: Unger, 1999; de Gasparo et al., 2000). In Patienten mit terminaler Herzinsuffizienz und dilatativer Kardiomyopathie ist eine erhöhte AT₂-Rezeptordichte in endokardialen und interstitiellen Regionen sowie den Rändern von infarzierten Regionen zu finden (Wharton et al., 1998). Tsutsumi et al. konnten eine solche verstärkte AT₂-Rezeptor-Expression den Fibroblasten zuordnen (Tsutsumi et al. 1998). In verschiedenen Arbeiten an Tiermodellen wurde gezeigt, dass eine Stimulation von AT₂-Rezeptoren in Endothelzellen, glatten Gefäßmuskelzellen und Fibroblasten antiproliferativ wirkt und den Gehalt an extrazellulären Matrixproteinen wie Fibronectin und Kollagen I reduziert (zur Übersicht: Matsubara, 1998).

Zudem spielt der AT₂-Rezeptor eine wichtige Rolle in der Regeneration nach Nervenschädigungen. Die Expression des AT₂-Rezeptors wird nach Nervenschädigungen dramatisch hochreguliert und kann einen positiven Einfluss auf die Nervenregeneration ausüben (Zhu et al., 2000; Reinecke et al., 2003; zur Übersicht: Rosenstiel et al., 2002).

Eine Blutdrucksenkung, die durch AT₁-Rezeptor-Blockade hervorgerufen wird, wird zum Teil auf eine erhöhte Stimulation des AT₂-Rezeptors zurückgeführt. So haben verschiedene Untersuchungen gezeigt, dass der AT₂-Rezeptor eine Vasodilatation und damit eine Blutdrucksenkung bewirkt. Diese Befunde machen den AT₂-Rezeptor zu einem Kandidaten-Gen in der Pathophysiologie der Hypertonie (zur Übersicht: Siragy und Carey, 2001).

Trotz der hohen Expressionsrate während der Embryonalentwicklung zeigen AT₂-Rezeptor-*knockout*-Mäuse keinen auffälligen Phänotyp. Jedoch ist die Durstentwicklung nach Wasserentzug und der Explorationstrieb verringert. Das Fehlen der AT₂-Rezeptoren bewirkt einen leicht erhöhten Blutdruck und einen

Einleitung

verstärkten Blutdruckanstieg nach AngII-Infusion (Hein et al., 1995; Ichiki et al., 1995). Senbonmatsu et al. beschreiben in den AT2-Rezeptor-*knockout*-Tieren eine verminderte linksventrikuläre Hypertrophie nach Druckbelastung (Senbonmatsu et al., 2000).

Das im Ovar und Uterus vorhandene lokale RAS beeinflusst Vorgänge wie Ovulation und Steroidgenese (Pucell et al., 1987; Feral et al., 1995). Dem von Granulosazellen exprimierten AT2-Rezeptor wird eine wichtige Funktion bei der Oocytenreifung, der Ovulation und der Produktion von Estradiol und Prostaglandinen zugeschrieben (Pucell et al., 1991; Yoshimura et al., 1996).

1.2.2.2 Signaltransduktion des AT2-Rezeptors

Die Entschlüsselung des Signalweges des AT2-Rezeptors erwies sich als sehr viel komplizierter als die des AT1-Rezeptors. Die Natur der Signaltransduktion des AT2-Rezeptors ist in einem hohen Maß vom Kontext der Signaleingänge der Zelle abhängig. So kann der AT2-Rezeptor als ein Modulator von Signalen anderer Rezeptoren beschrieben werden. Das Fehlen eines konkret messbaren Signaleffekts hat die Erforschung dieses Rezeptors erschwert und so ist die Signaltransduktion des AT2-Rezeptors noch immer nicht vollständig aufgeklärt.

Die mitogen-inhibierende Wirkung des AT2-Rezeptors wird im Wesentlichen über Phosphatasen vermittelt. So führt die Stimulation des AT2-Rezeptors zur Aktivierung der Tyrosin/Threonin-Phosphatase *Mitogen activated protein kinase phosphatase 1* (MKP-1), der Serin/Threonin-Phosphatase *protein phosphatase 2A* (PP2A) sowie der Tyrosin-Phosphatase *SH2 domain-containing phosphatase 1* (SHP-1) (zur Übersicht: Nouet und Nahmias, 2000). Zurzeit liegt der Signaltransduktionsweg, der zu Aktivierung dieser Effektoren führt, noch weitestgehend im Dunkeln.

In Primärzellkulturen von Epithelzellen des Nierentubulus und in kultivierten Herzzellen konnte ein möglicher Transduktionsweg zur ERK1/2 Stimulierung gezeigt werden. So führt eine AT2-Rezeptor vermittelte Aktivierung der *membrane-associated phospholipase A2* (PLA2) zur Freisetzung von Arachidonsäure aus Membranen. Dieses bewirkt eine Aktivierung des Tyrosin-Kinase Signalwegs Shc-Grb2-SOS und daraus resultierend zu einer Stimulierung der Kinasen ERK1/2 (Dulin et al., 1998; Zhu et al., 1998; Lokuta et al., 1994). Auch führt die Stimulation des AT2-Rezeptors in PC12W-Zellen zu einem Anstieg der ERK1/2-Aktivität und zur

Einleitung

neuronalen Ausdifferenzierung der Zellen, wenn die Proliferation der Zellen durch Entzug von Wachstumsstimulation gestoppt wurde (Stroht et al., 2000).

In einigen Zelltypen konnte eine Veränderung der zellulären cGMP-Mengen sowie der NO-Produktion gemessen werden (Sumners et al., 1991; Siragy and Carey, 1997; Gohlke et al., 1998). Nach Matsubara et al. zählen zu den Wirkungen vom AT₂-Rezeptor auch die Aktivierung von spannungsabhängigen Kaliumionenkanälen und die Hemmung von T-Typ Kalziumionenkanälen, wodurch er Wachstumshemmung, die Einleitung von Apoptose und Vasodilatation vermittelt (Matsubara, 1998).

Die Apoptose, auch programmierter Zelltod genannt, ist ein natürlicher Prozess in der embryonalen Entwicklung, aber auch in geschädigten Geweben und nach Infektionen. Verschiedene Signale können in Zellen dieses Programm starten, an deren Ende der regulierte Tod und die Beseitigung der Zelle steht. Verschiedene Studien haben ergeben, dass AngII eines dieser apoptotischen Signale darstellt, wenn es den AT₂-Rezeptor stimuliert (Yamada et al., 1996). Eine Rolle als *second messenger* des AT₂-Rezeptors übernimmt hierbei das Sphingolipid Ceramide. So wurde gezeigt, dass eine Langzeitaktivierung des AT₂-Rezeptors in PC12W-Zellen zu einer verstärkten *de novo*-Synthese von Ceramiden und in eine AT₂-Rezeptor vermittelte Apoptose führt (Gallinat et al., 1999; Lehtonen et al., 1999). Die AT₂-Rezeptor vermittelte Apoptose wird hierbei über verschiedene Apoptose-Mediatoren vermittelt, wie der Aktivierung von Caspase 3, der Dephosphorylierung von BCL-2 und der Hochregulation von Bax (Dimmeler et al., 1997; Horiuchi et al., 1998). Insbesondere die AT₂-Rezeptor vermittelte Aktivierung der Caspase 3 ist von Bedeutung, da sie eine Schlüsselrolle in der Apoptose von neuronalen Zellen einnimmt (Kuida et al., 1996).

Der AT₂-Rezeptor ist in vielerlei Hinsicht ein unüblicher Vertreter seiner Rezeptorklasse. So führt die Bindung von Liganden bei den meisten GPCR zur Desensibilisierung und zur Internalisation des Rezeptors. Zudem wird oftmals eine Hemmung der Transkription des Rezeptors festgestellt. Dieser Mechanismus verringert die Rezeptordichte auf der Zelloberfläche und führt zu einer *feed back*-Inhibition des Signals. Im Gegensatz zu diesem Konzept wird der AT₂-Rezeptor weder internalisiert (Hein et al., 1997) noch wird die Expression des Rezeptors

Einleitung

verringert. Im Gegensatz dazu stimuliert der AT₂-Rezeptor seine eigene Expression sowohl auf Transkriptions-, als auch auf Translationsebene (Shibata et al., 1997; Li et al., 1999). Weiter zeigten Miura und Karnik, dass die Bindung des Liganden AngII nicht obligatorisch für die Funktion des Rezeptors ist, sondern dass das Überschreiten einer kritischen Rezeptordichte auf der Zelloberfläche hinreichend ist. So führt eine erhöhte Expression des AT₂-Rezeptors in Zellen zur Apoptose, was auf eine intrinsische Aktivität des Rezeptors schließen lässt (Miura und Karnik, 2000). Diese Hypothese wird durch die Ergebnisse von AbdAlla et al. unterstützt, die eine Antagonisierung des AT₁-Rezeptor-Signals durch die Heterodimerisierung mit dem AT₂-Rezeptor zeigten. Wie bei Miura und Karnik erfolgt dieser AT₂-Rezeptor-Effekt unabhängig von einer AngII-Stimulation (AbdAlla et al., 2001b).

Die Signaltransduktionswege sowie die Funktionen sind in der Abbildung 1.1 zusammenfassend dargestellt.

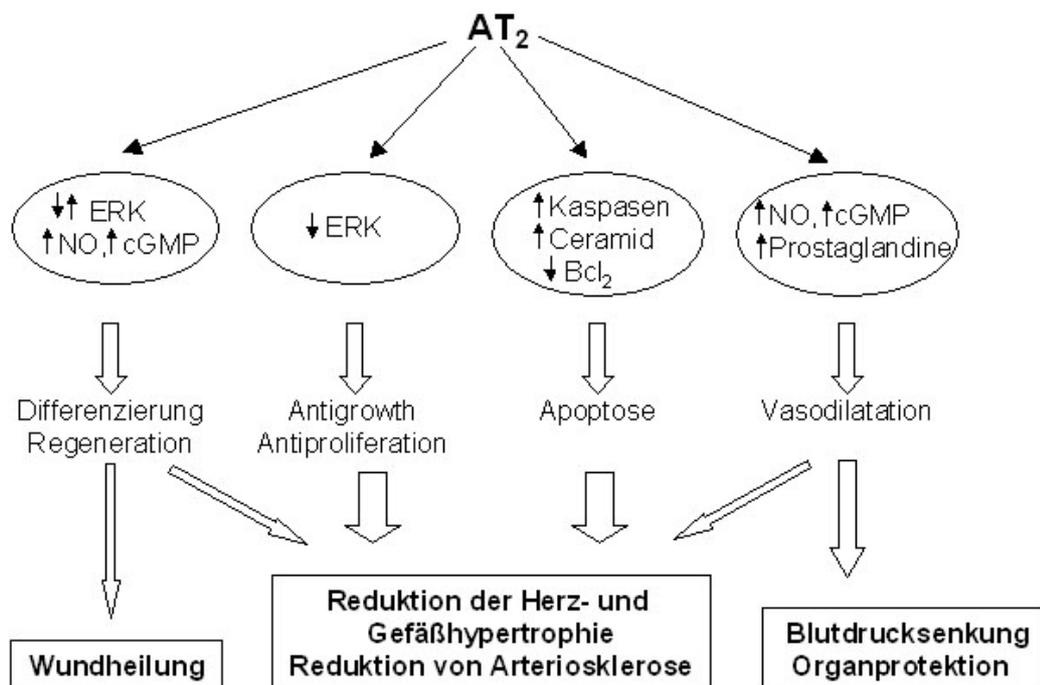


Abb. 1.1 Zusammenfassung der AT₂-vermittelten Signalwege und Effekte des AngII

ERK, *extracellular signal-regulated kinase*; NO, *nitric oxide*; cGMP, *cyclic guanosine monophosphate*; Bcl₂, B-cell leukemia 2 Protein

1.3 Das *Yeast Two-Hybrid* System

Bei allen zellbiologischen Mechanismen spielen Interaktionen zwischen Proteinen eine essentielle Rolle. Das gilt insbesondere für die Vorgänge bei der Signaltransduktion in der Zelle. Konsequenterweise wurde eine Vielzahl von Methoden entwickelt, die diese Interaktionen aufklären. Diesen Methoden ist aber allen zueigen, dass sie nur Interaktionen von bereits bekannten Proteinen nachweisen können. Erst mit der von Fields und Song entwickelten Methode des so genannten *Yeast Two-Hybrid* Systems (auch *interaction Trap* genannt) wurde es möglich, zu einem bekannten Protein noch unbekannte Interaktionsproteine zu finden (Fields und Song, 1989). Ein weiterer Vorteil des *Yeast Two-Hybrid* Systems ist, dass es in intakten Zellen und ausschließlich auf genetischer Basis funktioniert. Dies macht das Verfahren weniger artifiziell als biochemische Verfahren. Zudem können auch sehr schwache und transiente Interaktionen nachgewiesen werden, was insbesondere bei der Untersuchung von Signalkaskaden von Bedeutung ist.

Das *Yeast Two-Hybrid* System basiert auf der biologischen Wirkung eines eukaryotischen Transkriptionsfaktors, dessen Funktion ironischerweise gar nicht genau verstanden wird. Der Transkriptionsfaktor Gal4 aus der Bäckerhefe (*Saccharomyces cerevisiae*) besteht im Wesentlichen aus zwei Strukturdomänen, einer DNA-Bindedomäne und einer Aktivierungsdomäne, welche den Kontakt zum Transkriptionsapparat aufnimmt. Werden die beiden Domänen voneinander getrennt, verliert der Transkriptionsfaktor seine Funktion. Im *Yeast Two-Hybrid* System werden die beiden Domänen mit getrennt Hybridproteinen fusioniert (daher *Two-Hybrid* System). Interagieren diese Hybride über die Fusionsproteine miteinander, kommt es zu einer Rekonstitution der Funktionalität des Transkriptionsfaktors. Über die Aktivierung von Reportergenen durch den Transkriptionsfaktor kann die Interaktion der Hybridproteine nachgewiesen werden. Als Reportergene werden meist nutritive Selektionsfaktoren verwendet, die den Hefen ein Überleben auf Mangelmedien erlaubt. Mit einem solchen System lassen sich Interaktionen von bekannten Proteinen bestimmen und strukturell kartieren. Eine immense Anwendungserweiterung erfährt es aber erst dadurch, dass mit seiner Hilfe bislang unbekannte Interaktoren für ein bestimmtes „Köderprotein“ aus einer cDNA-Expressionsbibliothek isoliert werden können. Zu diesem Zweck wird die Aktivator-domäne mit einer Vielzahl von Sequenzen fusioniert, die im Idealfall allen

Einleitung

Proteinen entsprechen, die in einem Gewebe exprimiert werden. Die große Mehrzahl von der cDNA-Expressionsbibliothek wird mit dem Köderprotein nicht interagieren. Aber aus denjenigen Zellen, in denen das Reporterogen aktiviert wird, können cDNAs für die interagierenden Proteine einfach gewonnen werden.

Es gibt allerdings auch einige Einschränkungen dieses Systems. So ist es oft nicht möglich, Proteine mit einem hohen Anteil an lipophilen Aminosäureresten z.B. Transmembransequenzen in diesem System einzusetzen, da diese die Funktion des Transkriptionsfaktors beeinträchtigen. Proteine mit einem hohen Anteil an sauren Aminosäureresten neigen dazu, selbstständig den Transkriptionsapparat zu aktivieren, ohne eine Interaktion mit dem zweiten Hybridprotein einzugehen, und so das System „kurzzuschließen“. Weiterhin werden einige Proteinmodifikationen wie z.B. Glykosylierungen und Phosphorylierungen in Hefezellen nicht oder in veränderter Weise durchgeführt (Cricking and Beyaert, 1999).

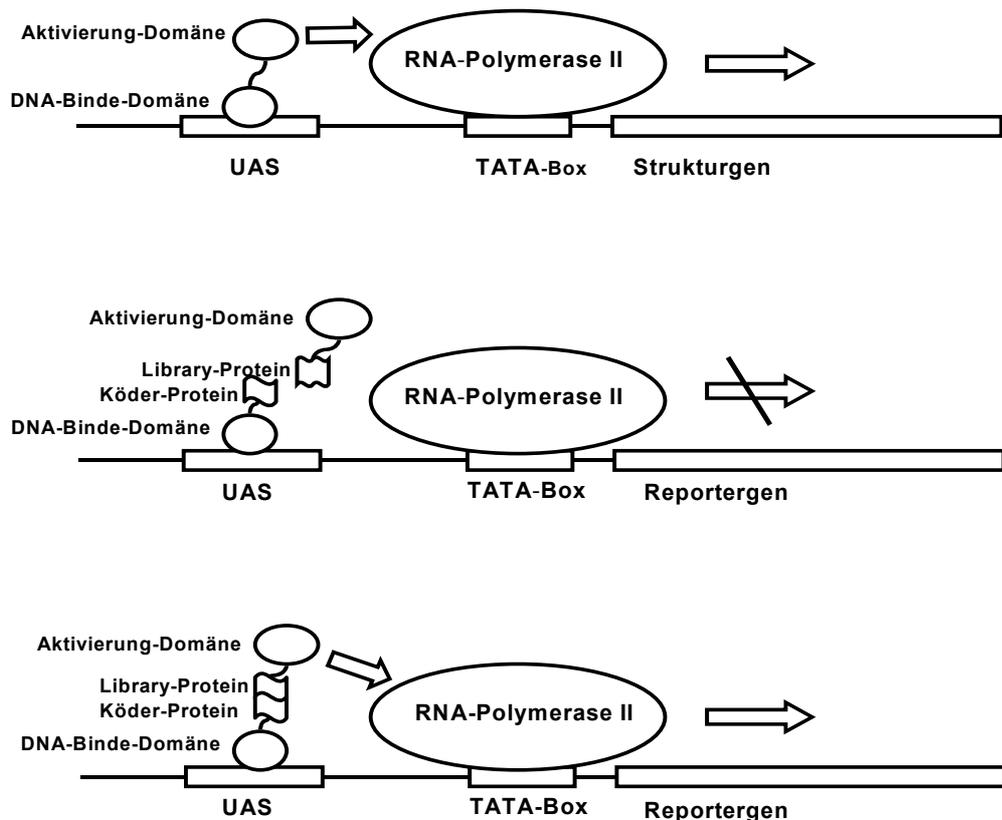


Abb. 1.2 Skizze der Mechanismen des *Yeast two-hybrid* Systems

1.4 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Die Signaltransduktion des AT₂-Rezeptors ist trotz zahlreicher biochemischer und genetischer Experimente noch immer nicht geklärt. Insbesondere die erfolglosen Versuche, durch verschiedene Deletionsmutanten des AT₂-Rezeptors die Interaktionsproteine des Rezeptors zu definieren, machen alternative Ansätze nötig. Ein möglicher Weg ist die Identifizierung von Proteinen, welche mit dem intrazellulären C-Terminus des AT₂-Rezeptors interagieren können. Diese Region des Rezeptors wurde gewählt, weil in verschiedenen Studien gezeigt wurde, dass insbesondere der C-Terminus von GPCR als Bindestelle für nicht G-Protein-Interaktoren dient. Dazu wurde in der vorliegenden Arbeit ein *Yeast Two-Hybrid* System verwendet, um eine cDNA-Bibliothek nach potenziellen AT₂-Rezeptor-Interaktoren zu durchsuchen.

Die identifizierten Interaktionen des AT₂-Rezeptors sollten daraufhin mittels alternativer experimenteller Ansätze in Säugetierzellen bestätigt werden. Des Weiteren sollten die Bindungseigenschaften und mögliche physiologische Funktionen der AT₂-Rezeptor-Interaktoren untersucht und charakterisiert werden.

2 Methoden

2.1 Das *Yeast Two-Hybrid* System

2.1.1 Arbeitsschema

Das *Yeast Two-Hybrid* System ermöglicht es, Protein-Protein-Interaktionen in einem eukaryotischen System zu untersuchen (Fields u. Song, 1998). Der Transkriptionsfaktor Gal4 der Hefe *Saccharomyces Cerevisiae* enthält zwei unterschiedliche Domänen, eine DNA-bindende Domäne und eine transaktivierende Domäne. Mit der N-terminalen, DNA-bindenden Domäne erkennt der Transkriptionsfaktor eine spezifische DNA-Sequenz im Genom. Die zweite, C-terminale Domäne, bewirkt die Initiation der Transkription. Die beiden Domänen arbeiten unabhängig voneinander, sind aber alleine nicht in der Lage, die Transkription einzuleiten. Zuerst wird die DNA-bindende Domäne mit der cDNA eines Proteins fusioniert und die transaktivierende Domäne mit der cDNA eines zweiten Proteins. Dann werden beide Konstrukte in Hefen kotransfiziert. Interagieren die beiden Proteine miteinander, so werden beide Domänen in räumliche Nähe gebracht und die Transkription eines Reportergens initiiert (Fields u. Song, 1989). In vielen Fällen codiert das Reportergen für die Aminosäure Histidin. Daher können nach der Aktivierung der Transkription die Hefen auf Histidin-freiem Nährmedium wachsen. Interagierende Moleküle der cDNA-Bibliothek können in Hefen auf Histidin-freien Nährböden selektioniert und kloniert werden. Mit dem *Yeast Two-Hybrid* System sollen neue Interaktionspartner des AT2-Rezeptors identifiziert werden.

2.1.2 Verwendeter Hefe-Stamm, Plasmide und cDNA-Bibliotheken

Die zu untersuchende Domäne des AT2-Rezeptors wird an die Gal4-DANN-Binderegion in den Vektor fusioniert. Dieser wird dafür *BamHI/XhoI* geschnitten. Bei der verwendeten cDNA-Bibliothek handelt es sich um Mausembryo 11 Tage post coitem, welche in den Hefevektor pACT2 (Clontech, Heidelberg) kloniert ist. Der verwendete Hefestamm ist *Saccharomyces Cerevisiae* AH 109.

2.1.3 Herstellung von kompetenten Hefen und Transformation

Methoden

| | | |
|-----------------------------------|-----------------------------------|------------|
| YPD-Medium: | Yeast Extract | 1 % |
| | Bacto Peptone | 2 % |
| | Ampicillin | 50 µg/ml |
| | Tetracyclin | 12,5 µg/ml |
| | Dextrose | 2 % |
| Ansatz in Aq.dest., pH-Wert 5,8 | | |
| YPD-Platten: | YPD-Medium mit 1,6% Bacto Agar | |
| TE-Puffer 10x | Tris/HCl | 0,1 M |
| | EDTA | 10 mM |
| Ansatz in Aq.dest. | | |
| LiAc 10x | Lithiumacetat | 1 M |
| Ansatz in Aq.dest., autoklavieren | | |
| PEG 50 % | PEG 4000 | 50 % |
| Ansatz in Aq.dest., autoklavieren | | |
| PEG/TE/LiAc-Lösung | 50% PEG | 112 ml |
| | 10x TE-Puffer | 14 ml |
| | 10x LiAc | 14 ml |

Eine einzelne Hefe-Kolonie wird von einer YPD-Platte abgenommen und in 20 ml YPD-Medium bei 30 °C über Nacht geschüttelt. Die Hefekultur wird auf 300 ml YPD-Medium aufgefüllt und erneut bei 30 °C schüttelnd inkubiert. Bei Erreichen der $OD_{600} = 0,6$ werden die Zellen bei 2300 rpm für 5 min bei RT pelletiert und anschließend in 50 ml Aq.dest. gewaschen. Das Hefepellet wird in 1,5 ml TE/LiAc-Lösung resuspendiert.

In einem Reaktionsgefäß werden 100 µg Lachssperma-DNA (Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen) zusammen mit 0,1 µg der Plasmid-DNA und 100 µl Hefe-Suspension gemischt. Nach Zugabe von 0,6 ml PEG/TE/LiAc-Lösung wird der Ansatz gevortext. Anschließend erfolgt eine 30-minütige Inkubation bei 30 °C und 100 rpm. Nach Zugabe von 70 µl DMSO erfolgt der Hitzeschock bei 42 °C für 15 min. Die Zellen werden nach dem Hitzeschock sofort auf Eis inkubiert und anschließend bei 10000 rpm 5 sec zentrifugiert. Das Pellet wird in 50 µl Aq.dest. resuspendiert und auf Platten ausgestrichen.

Methoden

2.1.4 Kotransformation

| | | |
|---------------------------------|---|-------|
| SD-Medium: | <i>Yeast Nitrogen Base</i> | 6,7 % |
| Ansatz in Aq.dest., pH-Wert 5,8 | | |
| SD-Platten: | SD-Medium mit 1,6% Bacto Agar | |
| YPD-Medium -THULL-Platten | Dropout-Lösung (ohne Tryptophan, Histidin, Uracil, Leucin und Lysin) mit 1,6% Bacto Agar | |

Die Hefe (AH 109) wird mit pGBKT7-AT2-Tail durch Hitzeschock transformiert und auf eine SD-Platte (-T) ausplattiert. Eine Einzelkolonie wird in 5 ml YPD-Medium vermehrt und nach zwei Verdünnungsschritten in 1000 ml bei 30 °C kultiviert. Die anschließende Kotransformation erfolgt mit 100 µg der cDNA-Bibliothek und 20 mg Lachssperma-DNA. Die Hefen werden auf ca. 80 Platten (-THULL) und einer Platte (-TL) ausplattiert und bei 30 °C für 3-4 Tage inkubiert. Das Wachstum auf der -TL-Platte zeigt die Transformationseffizienz.

2.1.5 DNA-Isolierung aus Hefen

| | | |
|--------------------|-----------------|--------|
| Hefe-Lysis-Puffer: | TritonX-100 | 2 % |
| | SDS | 1 % |
| | NaCl | 100 mM |
| | Tris/HCl pH 8,0 | 10 mM |
| | EDTA | 1 mM |

Die Kolonien der Platten (-THULL) werden in 5 ml Dropout-Medium (-THULL) bei 30 °C über Nacht kultiviert. Die Kultur wird bei 2500 rpm 5 min bei RT zentrifugiert. Das Pellet wird in 0,2 ml Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) und 0,2 ml Hefe-Lysis-Puffer resuspendiert und mit 0,3 g Glass-Beads (Sigma) versetzt. Der Ansatz wird 2 min stark gevortext und anschließend bei 14000 rpm 5 min zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen und mit 0,1 Volumen 3 M NaAc und 2,5 Volumen Ethanol präzipitiert. Das DNA-Pellet wird zweimal mit 70 %-igem EtOH gewaschen, anschließend bei RT luftgetrocknet und in 50 µl TE-Puffer aufgenommen.

Methoden

2.1.6 Transformation von DNA in *E. coli*

| | | |
|-----------------|---|--------------------|
| M9-Lösung (5x): | Na ₂ HPO ₄ /7H ₂ O | 6,4 % |
| | KPO ₄ | 1,5 % |
| | NaCl | 0,25 % |
| | NH ₄ Cl | 0,5 % |
| | | Ansatz in Aq.dest. |
| <hr/> | | |
| M9-Platten: | M9-Medium mit 1,6% Bacto Agar | |
| <hr/> | | |

40 µl des kompetenten *E. coli* Stammes (KC8, *Leu*-) werden auf Eis aufgetaut und mit 0,1 µg der Hefe-DNA gemischt. Die Elektroporation erfolgt bei 2500 Volt, 21 µF. Anschließend werden sofort 500 µl LB-Medium zugegeben. Es erfolgt eine Inkubation bei 37 °C für 1 h. Die Bakterien werden kurz abzentrifugiert, zweimal mit M9-Medium gewaschen und auf M9-Platten ausplattiert. Die Inkubationsdauer liegt bei 2-3 Tagen. Da der verwendete *E. coli* Stamm Leucin-defizient ist, können erfolgreich mit dem pACT2-Leu-Vektor transformierte Klone selektioniert werden. Einzelkolonien werden in 5 ml LB-Medium vermehrt und die Plasmid-DNA präpariert.

2.1.7 Rücktransformation von DNA in Hefen

Um die spezifische Interaktion zwischen Köder-Protein (AT2-Rezeptor C-Terminus) und dem Ziel-Protein nachzuweisen, erfolgt eine Kontrolle mit dem unspezifischen Oberflächenprotein Lamin. Dabei wird die Plasmid-DNA des zu untersuchenden Klons in Hefe rücktransformiert, die bereits mit Lamin-DNA transfiziert ist. Die transformierten Hefen werden auf –TL und –THULL Platten ausgestrichen. Das Wachstum auf –THULL Platten bedeutet eine Interaktion zwischen Lamin und dem Protein aus der cDNA Bibliothek. Daraus lässt sich schließen, dass die Interaktion zwischen dem neuen Protein und dem Köder-Protein unspezifisch ist.

2.1.8 Subklonierung der im *Yeast Two-Hybrid System* identifizierten cDNAs

Die DNA der spezifisch mit dem AT2-Rezeptor C-Terminus interagierenden Klone wird isoliert und präpariert. Sie wird mit einem pACT2 *forward* und einem pACT2 *reverse* Primer durch die Firma GATC, Konzanz, sequenziert und die Sequenzen werden zuerst auf ihr korrektes Leseraster hin überprüft. Die cDNAs in korrektem Leseraster werden durch einen *NCBI-Blast Search* identifiziert. Klone, die für ein

Protein kodieren, bei denen eine Interaktion mit dem AT2-Rezeptor möglich ist, werden in den V5-polyHis-Fusionsvektor pcDNA3.1 subkloniert und die Interaktion näher analysiert.

2.2 Molekularbiologische Methoden

Soweit nicht anders angegeben, wurden die verwendeten Methoden den Laborhandbüchern "Molecular cloning: a laboratory manual" von Sambrook et al. (1987) und "Current Protocols in Molecular Biology" von Ausubel et al. (1987) entnommen.

2.2.1 Elektrophoresetechnik zur Analyse von Nukleinsäuren

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

2.2.2 Herstellung von cDNA und 5'-RACE

Die Aufreinigung von Gesamt-RNA aus kultivierten Zellen oder Organgewebe erfolgte mit Hilfe eines RNA-Isolierungs-Kits nach Angaben des Herstellers durch Aufschluss der Zellen mittels alkalischer Lyse und anschließender Isolierung der RNA über eine positiv geladene Matrix (Qiagen, Hilden). Mit Hilfe der 5'-RACE-Technik (*5'-rapid amplification of cDNA ends*) wurde aus mRNA die entsprechende cDNA in voller Länge hergestellt. Hierbei wird ausgenutzt, dass eine Variante der MMLV-reversen Transkriptase (SuperScript™ RT) an das 5'-Ende des ersten synthetisierten cDNA-Stranges zusätzlich mehrere C-Reste anhängt. Diese hybridisieren mit den SMART IIATM-Oligonukleotiden, welche für die fortlaufende Amplifikation als erweiterte Matrize dienen. Somit wird spezifisch an 5'-Enden eine „SMARTTM“-Sequenz angefügt, die im Verlauf der anschließenden PCRs mit dem 5'-Primermix UPM hybridisiert.

2.2.3 Schema der Synthese des ersten cDNA-Stranges mit Hilfe der 5'-RACE-Technik

Die Synthese des ersten cDNA-Stranges (*first-strand cDNA synthesis*) ausgehend von Plazenta-RNA wurde wie folgt durchgeführt:

| | | |
|-----------------------------------|-------------------------------------|------|
| Für einen Ansatz wurde verwendet: | Mausembryo-RNA (1 µg/µl) | 1 µl |
| | 5'-CDS-Primer (10 µM) | 1 µl |
| | SMART IIATM-Oligonukleotide (10 µM) | 1 µl |
| | H ₂ O | 2 µl |

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

| | |
|--|------|
| 5x <i>first-strand</i> -Puffer mit 1,6% Bacto Agar | 2 µl |
| DTT (20 mM) | 1 µl |
| dNTP-Mix (je 10 mM) | 1 µl |
| MMLV-reverse Transcriptase (200 U) | 1 µl |

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

2.2.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe der PCR können in einem zyklischen Prozess, katalysiert von einer hitzestabilen DNA-Polymerase (Pfu oder Taq), DNA-Fragmente selektiv amplifiziert werden. Um die Empfindlichkeit und die Spezifität der PCR weiter zu erhöhen, wurde zur Klonierung des 5'-Endes von ATBP50 (AT2-Rezeptor Binding Protein, 50 kDa) eine verschachtelte (*nested* PCR) unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

| | | |
|--------------------------------------|--|--------|
| 1. Ansatz (<i>touch down</i> -PCR): | <i>first-strand</i> -cDNA (Mausembryo) | 2,5 µl |
| | UPM | 5 µl |
| | 25 µM 13.2n- | 1 µl |
| | 5x Pfu-Puffer | 5 µl |
| | 100 mM dNTP | 5 µl |
| | Pfu (2,5 U) | 1 µl |

Methoden

| | | |
|---------------------------------------|--|---------|
| | H ₂ O | 30,5 µl |
| PCR-Bedingungen (<i>hot start</i>): | 6 x (94 °C, 45"; 72 °C, 3') 6 x (94 °C, 45"; 70 °C, 45"; 72 °C, 3') 26 x (94 °C, 45"; 68 °C, 45"; 72 °C, 3') | |
| <hr/> | | |
| 2. Ansatz: | Produkt der 1. PCR | 2,5 µl |
| | UPM | 5 µl |
| | 25 µM bp+ | 1 µl |
| | 5x Pfu-Puffer | 5 µl |
| | 100 mM dNTP | 5 µl |
| | Pfu (2,5 U) | 1 µl |
| | H ₂ O | 30,5 µl |
| <hr/> | | |
| PCR-Bedingungen (<i>hot start</i>): | 39 x (94 °C, 45"; 65 °C, 45"; 72 °C, 3') | |
| <hr/> | | |

Alle weiteren PCRs wurden wie folgt durchgeführt:

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

Die erhaltenen PCR-Produkte wurden mittels Gelelektrophorese analysiert und zur Kontrolle sequenziert (GATC, Konstanz).

2.2.5 Klonierung von cDNA-Fragmenten

Zur Klonierung wurden die durch Restriktionsverdau bzw. PCR erhaltenen cDNA-Fragmente mit Hilfe einer T4-Ligase über Nacht bei 14 – 16 °C in den entsprechend geschnittenen Vektor ligiert. Anschließend wurden die Plasmide in kompetente *E.coli* DH5α transformiert und amplifiziert. Positive Klone wurden nach der Plasmidisolierung mittels Restriktionsanalyse identifiziert. Die Plasmidisolierung erfolgte mit Hilfe von DANN-Isolationskits (Qiagen, Hilden) nach den Angaben des Herstellers.

2.2.6 siRNA Experimente

Das Design der siRNAs basiert auf der Charakterisierung durch Elbashir et al. (Elbashir et al., 2001a, b). RNA-Interferenz von ATBP wurde mittels eines 21 Basenpaar großen siRNA Duplex, der einen d(T)d(T)-Überhang aufweist, durchgeführt (Qiagen-Xeragon, Germantown, USA). Der kodierende Strang der ATBP50 siRNA war 5'-AAAGGACTGCTTCGAAACCTCdTdT. Durch einen *BLAST search* in der EST Datenbank (NCBI database) wurde sichergestellt, dass die siRNA ausschließlich mit ATBP50 homolog ist.

RNA-Duplexe wurden in 100 mM Kaliumacetat, 30 mM HEPES-KOH (pH 7,4), 2 mM Magnesiumacetate für 1 min bei 90 °C und 1 h bei 37 °C *annealed* und anschließend bei -80 °C gelagert. Oligos wurden mit Oligofectamine (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) in die Zellen transfiziert. Typischerweise wurden sowohl 4,5 µl des 20 µM siRNA-Duplex mit 150 µl Opti-MEM (GibcoBRL, Karlsruhe, Deutschland) als auch 9 µl von Oligofectamine mit 36 µl Opti-MEM gemischt. Diese Lösungen wurden für 7–10 min inkubiert, vermischt und nochmals für 20–25 min inkubiert, bevor sie zu den Zellen gegeben wurden. Als Kontrolle diente ein fluoreszierendes *non-silencing* siRNA-Duplex (Qiagen-Xeragon, Germantown, USA; 5'-aattctccgaacgtgtcacgt).

2.2.7 Klonierung eines Golgi-Markers

Auf der Basis des EGFP- und des DsRed-Vektors (Clontech, Heidelberg) wurden zwei Zellkompartimentmarker hergestellt. Hierfür wurden in die entsprechenden Vektoren Sequenzen inseriert, die zu einer Lokalisation des EGFP- bzw. DsRed-Proteins in das Golgi-Netzwerk der Zelle führt.

Für die Herstellung des Golgi-Markers wurde die Golgi-Signal sowie die Transmembransequenz der UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,4- galactosyltransferase verwandt:

>gi|11602910|ref|NP_071641.1| UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,4-galactosyltransferase, polypeptide 1; glycoprotein galactosyltransferase beta 1, 4; galactosyltransferase 2 beta 1, 4; beta-1,4-GalT; B-1,4-GalT1; beta-1,4-GalT1 [Mus musculus]

Mittels PCR wurden 360 Basen nach dem Start Codon aus Mausembryo-cDNA amplifiziert und vor die Sequenz des Fluoreszenzproteins kloniert, dies führte zum

Einbau des Konstrukts in das Golgi-Netzwerk. Dem Startcodon wurde eine Kozak-Sequenz (CACCC) vorangestellt.

2.2.8 Herstellung eines plasmamembranständigen EGFP-gekoppelten AT2-Rezeptors

Um die Interaktion von ATBP50 mit dem AT2-Rezeptor zu untersuchen, wurde ein N-terminal EGFP-gekoppelter AT2-Rezeptor kloniert, da eine C-terminale Variante des EGFP-gekoppelten AT2-Rezeptors wegen möglicher Interaktionen des EGFP mit ATBP50 nicht in Frage kam. Da eine N-terminale EGFP-Koppelung des AT2-Rezeptors aber eine Integration des Rezeptors in das ER verhindern würde, wurde ein Signal-Peptid des IFN-gamma Rezeptors vor das EGFP zu klonieren, um so ein ER-Einbau zu sichern.

Zu diesem Zweck wurde die Sequenz für das IFN-gamma Rezeptor Signal-Peptid mit den Restriktionsschnittstellen für 5' NheI und 3' PstI versehen und vor die Sequenz des EGFP in der Vektor pEGFP-N1 kloniert.

sense

5' CTCGCTAGCCACCATGGCTCTCCTCTTTCTCCTACCCCTTGTCATGCAGGGTGTGCTACCGGTCTC

antisense

5' GAGACCGGTAGCACACCCTGCATGACAAGGGGTAGGAGAAAGAGGAGAGCCATGGTGGCTAGCGAG

Der so modifizierte Vektor wurde pEGFP-N1-SP genannt und der AT2-Rezeptor anschließend in die *Multi Cloning Side* des Vektors kloniert.

2.3 Zellbiologische Methoden

2.3.1 Zellkultur

Alle Zellen wurden bei 37 °C in Wasserdampf-gesättigter 5 %-iger (v/v) CO₂-Atmosphäre kultiviert. Als Medium diente für N1E-115-Zellen Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) mit 4,5 g/l Glukose (GibcoBRL, Eggenstein, Deutschland) ergänzt mit 10 % fötalem Kälberserum (FKS) (GibcoBRL). COS-7-Zellen wurden in DMEM mit 4,5 g/l Glukose (GibcoBRL) ergänzt mit 10 % FKS (GibcoBRL) und 5 mM Glutamin (GibcoBRL) kultiviert. N1E-115-Zellen (*mouse neuroblastoma*) wurden entsprechend kultiviert, jedoch frei von Natriumpyrovalat. Allen Medien wurde 100 U Penicillin und 100 µg Streptomycin je 500 ml beigefügt. Zur Subkultivierung wurden konfluent gewachsene Zellen 1 x mit Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (PBS) gewaschen, durch 5-minütige Behandlung mit 0,025 % (w/v) Trypsin, 0,05 % (w/v)

EDTA abgelöst und nach Verdünnung mit Kulturmedium im Verhältnis 1:2 bis 1:4 (bis 1:10 im Fall der COS-7) neu ausgesät.

2.3.2 Transfektion von Mammalia-Zellen

Bei dem Transfektionsreagenz LipofectAMINE 2000 handelt es sich um eine Liposomenformulierung eines polykationischen Lipids in Kombination mit einem neutralen Colipid (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland). Es bewirkt die Bildung kompakter Lipid/DNA-Komplexe und ermöglicht somit eine effiziente Aufnahme in Säugerzellen. Die Zellen wurden in Zellkulturschalen mit 6 Kavitäten à 9,6 cm² (6 Kammerplatten) bis zu einer Konfluenz von 40 – 60 % kultiviert. Zur Komplexbildung wurden Lösungen von 2 µg zu transfizierender DNA in 60 µl DMEM (serum- und antibiotikafrei) sowie 10 µl LipofectAMINE 2000 in 50 µl des gleichen Mediums gemischt und über 40 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und 800 µl serumhaltiges DMEM (antibiotikafrei) zugefügt. Nach Zugabe der DNA/Lipid-Komplexe und 6-stündiger Inkubation wurden 1,2 ml vollständiges Medium zugesetzt. Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt, und nach weiteren 24 h erfolgte die entsprechende Verwertung der Zellen.

2.3.3 Zellproliferationsassay

Die Zellproliferation wurde mittels CyQUANT *cell proliferation assay kit* (Molecular Probes) nach den Angaben des Herstellers in einem Fluorometer gemessen.

2.4 Proteinchemische Methoden

2.4.1 Probenaufbereitung

Zur Expressionsanalyse wurden die tiefgefrorenen Organe von männlichen C57bl6-Mäusen mechanisch zerkleinert und homogenisiert. Die Gewebe wurden in einer Konzentration von 0,2 mg/µl in Laemmli-Puffer aufgenommen.

Methoden

| | | |
|-----------------|--------------------------|---------------|
| Laemmli-Puffer: | TrisHCl, pH 6,8 | 63 mM |
| | SDS | 2,5 % (w/v) |
| | Glycerin | 5 % (v/v) |
| | β -Mercaptoethanol | 5 % (v/v) |
| | Bromphenolblau | 0,005 % (w/v) |

Nach 30-minütiger Erwärmung der Proben auf 100 °C wurden nicht gelöste Bestandteile 10 min bei 13.000 g abzentrifugiert.

2.4.2 Immunoblotting

Für einen Immunoblot wurden die Proben in Laemmli-Puffer aufgenommen und mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) entsprechend ihres Molekulargewichts aufgetrennt. Anschließend erfolgte ein Elektrotransfer der Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran nach dem *semi-dry*-Verfahren bei 1,5 mA/cm² Gelfläche über 60 min. Als Transferpuffer diente ein 12,5 mM Tris-Puffer mit 0,96 M Glycin und 10 % (v/v) Methanol. Zur Überprüfung des Proteintransfers bzw. zur Fixierung wurde die Nitrocellulosemembran nach dem Blotting mit 0,2 % (w/v) Ponceau S in 3 % (w/v) Trichloressigsäure gefärbt. Nach der Blockierung freier Bindungsstellen auf der Membran durch 60-minütige Behandlung mit Blockierungslösung bei Raumtemperatur (RT) erfolgte eine Inkubation über Nacht bei 4 °C mit dem Erstantikörper in entsprechender Verdünnung im gleichen Puffer.

Methoden

| | | |
|----------------------------|----------------------------------|--------------------------|
| 10 x TBS: | Tris-Base NaCl | 12,1 g 90 g |
| <hr/> | | |
| Ansatz in Aq.dest., pH 7,4 | | |
| <hr/> | | |
| TBS-T: | 10 x TBS Tween 20 Aq.dest. | 100 ml 1 ml 899 ml |
| <hr/> | | |
| Blockierungslösung: | Magermilchpulver | 5 % (w/v) |
| <hr/> | | |
| Ansatz in TBS-T | | |

Anschließend wurde 3 x 10 min mit TBS-T bei RT gewaschen. Die Zweitantikörper wurden 60 min mit einer Verdünnung von 1:10.000 für Anti-Maus IgG bzw. mit 1:5000 für Anti-Kaninchen IgG in Blockierungslösung bei RT inkubiert. Nach 3 x 10 min Waschen mit TBS-T bei RT erfolgte die Detektion der Meerrettich-Peroxidase gekoppelten Zweitantikörper durch Chemilumineszenz-Reaktion. Hierzu wurde die Membran 1 min in Substratlösung (100 mM TrisHCl, pH 8,5, 2,5 mM 3-Aminophthalhydrazid (Luminol), 0,4 mM p-Cumarsäure, 5 mM H₂O₂) inkubiert. Abschließend wurde ein Röntgenfilm aufgelegt und nach 0,5 bis 20 min Exposition entwickelt.

2.4.3 Coimmunpräzipitation nach Coexpression von AT2-Rezeptor und ATBP50

COS-Zellen wurden unter Verwendung von Lipofectamin 2000 mit den Expressionsvektoren pcDNA3.1-V5-polyHis-ATBP50 und p3XFlag-AT2 co-transfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen 2 x mit eiskaltem PBS gewaschen, mit dem chemischen Cross-Linker 3,3'-Dithiodipropionat in einer Endkonzentration von 2,5 mM in 10% DMSO (Sigma, Deisenhof) für weitere 30 min inkubiert und 1 h bei 4 °C in 50 mM Tris, pH 8,0, 150 mM NaCl, 0,1% Triton X-100 und *Complete protease inhibitor cocktail* (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim) lysiert. Die unlöslichen Bestandteile wurden durch 20-minütige Zentrifugation bei 13.000 g und 4 °C abgetrennt. Anschließend wurden die Proben 1:3 mit Waschpuffer verdünnt und 1 h bei 4 °C unter Rotation mit je 10 µl Flag-Antikörper inkubiert.

Methoden

| | | |
|----------------------------|---------|--------|
| Waschpuffer: | TrisHCl | 50 mM |
| | NaCl | 150 mM |
| | EDTA | 1 mM |
| <hr/> | | |
| Ansatz in Aq.dest., pH 7,4 | | |
| <hr/> | | |

Die Antikörperkomplexe wurden anschließend 3 x gewaschen, indem das Sediment in Waschpuffer resuspendiert und jeweils 2 min bei 8.000 g zentrifugiert wurde. Die copräzipitierten Proteine wurden durch Immunoblotting mit V5-Antikörper 1:5000 detektiert.

2.4.4 ELISA zur Detektion von Rezeptorexpression auf der Plasmamembran

COS-Zellen wurden transient mit dem Expressionsvektor p3XFlag-AT2 (hier trägt der AT2-Rezeptor ein Flag-Epitop an seinem extrazellulären N-Terminus) oder pcDNA3.1 ohne N-terminales Epitop transfiziert. Hierfür wurden die Zellen in 24-Kammerplatten ausgesät und mit ATBP spezifischer siRNA transfiziert. Am folgenden Tag wurden die Zellen in Polylysin-beschichteten 96-Kammerplatten in einer Dichte von 5×10^4 Zellen pro Well umgesetzt und nach 12 h mit den AT2-Rezeptor Konstrukten transfiziert. Am dritten Tag wurden die Zellen mit $1 \mu\text{g}$ Maus-M2-Flag-Antikörper in $100 \mu\text{l}$ DMEM mit 10 % FKS für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden dann mit PBS ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ gewaschen und mit 4 % Paraformaldehyd fixiert. Zum Nachweis des gebundenen Erstantikörpers wurde ein Alkalische-Phosphatase-konjugierter Schaf-anti-Maus IgG Sekundärantikörper (HRP-IgG, Amersham, Arlington Heights, IL) in einer Verdünnung 1:2500 in PBS für 2 h bei 37°C inkubiert. Die Kammern wurden zweimal mit PBS gewaschen und anschließend mit dem Substrat der Alkalischen-Phosphatase dem p-Nitrophenyl-Phosphate-Dinatrium (pNPP) inkubiert. Die Umsetzung des pNPP wurde nach beginnender Gelbfärbung mit NaOH gestoppt und photospektrometrisch bei 405 nm gemessen.

2.5 Immunfluoreszenz-Mikroskopie

N1E-115-Zellen wurden ca. 16 h auf Glasobjektträgern (18 mm Durchmesser, Assistent, Schott) in 12-Kammerplatten kultiviert und mit den gewünschten

Methoden

Expressionsvektoren transient transfiziert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und durch Zugabe von 2,5 % Paraformaldehyd in PBS in 30-minütiger Inkubation bei RT fixiert. Nach dreimaligem Waschen mit TBS wurde zur Blockierung freier Bindestellen 15 min mit Immunofluoreszenz (IF)-Blockierungslösung inkubiert.

| | | |
|------------------------|----------------------------|-----------------|
| IF-Blockierungslösung: | bovines Serumalbumin (BSA) | 5 % (w/v) |
| | | Ansatz in TBS-T |

Für Doppelfärbungen folgte eine 30-minütige Inkubation bei 37 °C mit den entsprechenden Erstantikörpern aus unterschiedlichen Spezies in einer Verdünnung von jeweils 1:100 in IF-Blockierungslösung (soweit nicht anders angegeben). Nach dreimal 5 min Waschen mit TBS wurden die Zellen 30 min bei 37 °C mit den gegen die entsprechenden Spezies gerichteten cy2- und cy3-markierten Zweitantikörpern (1:500 in IF-Blockierungslösung) inkubiert. Ab diesem Schritt wurden die Präparate möglichst vor Lichteinfluss geschützt. Dann wurden die Zellen wiederum dreimal 5 min mit TBS gewaschen und mit Slow-Fade® (Molecular Probes, Leiden, Niederlande) eingebettet. Anschließend wurden die Präparate mit einem Fluoreszenz-Mikroskop (Leica DMR) bzw. einem konfokalen Laser-Scan-Mikroskop (Carl Zeiss Laser Scanning Systems LSM-510 mit einer Zeiss 63× 1.3 NA oil Immersionslinse) analysiert; die Dokumentation und Auswertung der Fluoreszenz-Aufnahmen erfolgte mit Hilfe einer CCD-Kamera und der zugehörigen Software. Im Gegensatz zur konfokalen Laserscanning-Methode, bei der nur das Licht aus einer Ebene gesammelt wird, ist bei „normalen“ Fluoreszenz-Aufnahmen die Bildqualität durch die Fluoreszenz außerhalb der fokussierten Ebene vermindert. Um in diesen Fällen die Hintergrundstrahlung zu entfernen, wurde zunächst mit Hilfe eines Mikrofokusmotors in 1 µm Schritten durch die Z-Ebene (senkrecht zum Mikroskoptisch) eine Bildserie aufgenommen. Anschließend wurde mit einem mathematischen Verfahren, der sogenannten Dekonvolution, die Hintergrund-Fluoreszenz berechnet und von der betrachteten fokussierten Ebene substrahiert.

2.6 Datenbankanalysen

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

3 Ergebnisse

3.1 Identifikation von ATBP50 als ein AT2-Rezeptor Bindeprotein

Die zentrale Zielsetzung dieser Arbeit war die Identifizierung noch nicht bekannter Interaktionspartner des AT2-Rezeptors, die bei der Signaltransduktion, Regulation der subzellulären Lokalisation oder der Aktivität des Rezeptors eine Rolle spielen. Zu diesem Zweck kam ein Gal4-basiertes *Yeast Two-Hybrid* System zum Einsatz. Dabei wurde darauf geachtet, dass sowohl das „Köder“-Protein (im vorliegenden Fall der intrazelluläre C-Terminus des Maus-AT2-Rezeptors), als auch die „Beute“-cDNA-Bank aus der Maus stammte. Zusätzlich wurde eine cDNA-Bank aus Gewebe gewählt, in dem eine hohe AT2-Rezeptor-Expression vorliegt. Beide Voraussetzungen sind bei einer Maus-Embryo-cDNA-Bank (11 Tage post coitem) gegeben. Weitere Vorteile der Verwendung eines Maus-basierten Systems sind, dass diese Spezies anschließend sowohl für die Durchführung von Tierversuchen nutzbar ist, als auch für die Erzeugung von *knockout*-Mutanten eines gewünschten Genes herangezogen werden kann, wenn diese nicht ohnehin schon verfügbar sind.

3.1.1 „Beute“ des *Yeast Two-Hybrid* Screens

Die meisten der anfänglich β -Gal-positiven Hefe-Isolate konnten durch die durchgeführten Kontrollexperimente als Artefakte identifiziert werden. Es verblieben jedoch einige Isolate, die alle Selektionskriterien erfüllten. Die Plasmide dieser potentiellen AT2-Rezeptor-Interaktoren wurden sequenziert und einer Homologiesuche zu bekannten Proteinsequenzen in der Genbank mittels des BLAST-Algorithmus (Altschul et al., 1997) unterzogen. Die meisten der identifizierten Interaktoren sind bereits bekannte und charakterisierte Proteine. Viele von ihnen können aber der Gruppe der bekannten falsch-positiven Bindungspartner zugerechnet werden. Diese führen in Hefen häufig zur Aktivierung der Reportergene, ohne dass eine tatsächliche physiologische Interaktion mit dem Köder-Protein auftritt (Luban und Goff, 1995). So zählt TIM17 zu den mitochondrialen Proteinen, die regelmäßig in hoher Zahl im *Yeast two-hybrid* System mit ganz unterschiedlichen Köder-Proteinen isoliert werden. Auch Proteine aus dem Zitronensäurezyklus und MHC-Loci sind oft an einer unspezifischen Aktivierung des Reportergens beteiligt und wurden deswegen in den Folgeexperimenten nicht näher untersucht. Einige

Ergebnisse

weitere Proteine sind ebenfalls mit hoher Wahrscheinlichkeit keine spezifischen Interaktoren des AT2-Rezeptors, wie z.B. das Proteasomenprotein Lmp3. Proteasomen spielen zwar unter Umständen beim Abbau von AT2-Rezeptoren eine Rolle, sind aber nicht unmittelbar mit der physiologischen Funktion des Rezeptors korreliert. Das Auffinden eines Chaperones (MDJ) scheint zunächst von Interesse zu sein. Allerdings sind Heatshockproteine sehr häufig auftretende falsch positive Interaktoren in Hefen. Daher wurde dieses Protein nicht als spezifischer Interaktor des AT2-Rezeptors angesehen.

Von den gescreenten 2×10^6 Kolonien erfüllten 16 alle fünf Selektionskriterien (Phenotypen: His +, 3 ATR, Galactosidase -, Ura + und 5-Fluoro-orotic-Säure +) und zwei dieser Kolonien codierten für eine *full length*-cDNA, die wir ATBP50, für *AT2-receptor binding protein* mit einer Grösse von 50 kDa, benannten.

3.1.2 Validierung der Interaktion von ATBP50 und dem AT2-Rezeptor

Um die Interaktion, die zur Selektion von ATBP50 führte, zu bestätigen, wurde eine Co-Immunpräzipitation des ATBP50 über den AT2-Rezeptor durchgeführt. Hierzu wurde der AT2-Rezeptor mit einem N-terminalen FLAG-Tag versehen und mit ATBP50, welches am C-Terminus ein V5-Tag trägt, transient in COS-7 Zellen exprimiert. Nach 48 h wurden die Zellen in Ripa-Puffer lysiert und anschließend mit Waschpuffer 1:3 verdünnt. Aus dem Zelllysats wurde der AT2-Rezeptor mit immunspezifischen Antikörpern gegen das FLAG-Tag präzipitiert und die Copräzipitate durch Immunoblotting mit V5-Antikörper analysiert.

Da die Anwesenheit von geladenen Detergenzien nicht-kovalente Proteininteraktionen stört, könnte der Einsatz des 1:3-verdünnten Ripa-Puffers, der u.a. 0,1 % SDS enthält, ein Grund für die relativ schlechte Copräzipitierbarkeit (schwachen Proteinbanden) des AT2-Rezeptors und ATBP50 sein (Abb. 2.1). Vergleichbare Experimente wurden mit ATBP60 und ATBP135 durchgeführt. Dabei konnte weder ATBP60 noch ATBP135 Co-immunpräzipitiert werden.

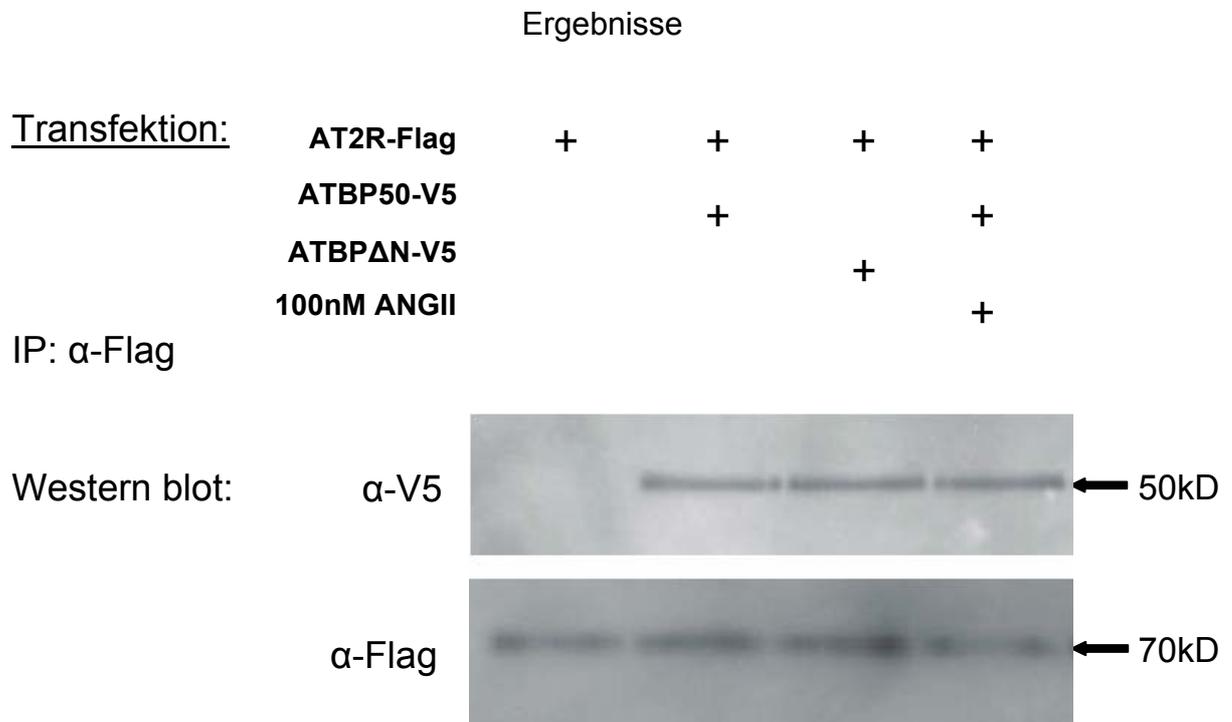


Abb 2.1 Copräzipitation von ATBP50 und AT2-Rezeptor aus Zelllysaten

Cos-7-Zellen wurden unter Verwendung von Polyfect® transient mit Flag-gekoppeltem AT2-Rezeptor und V5-gekoppeltem ATBP50 transfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen in Ripa-Puffer lysiert und anschließend 1:3 mit Waschpuffer verdünnt. Die Immunpräzipitation (IP) erfolgte mit Flag-spezifischem Antikörpern. Die Copräzipitate wurden mittels Immunoblotting (IB) analysiert.

3.2 Charakterisierung von ATBP

3.2.1 Nachweis der ATBP-mRNA durch *Northern-Blot*

Die Expression der ATBP-mRNA wurde durch *Northern blot* untersucht. Hierfür wurde mRNA aus verschiedenen Geweben im Agarosegel aufgetrennt und mit radioaktiv markierter ATBP50-cDNA als Sonde nachgewiesen. Wie in Abbildung 2.2 zu sehen, sind im Muskelgewebe alle drei Varianten der ATBP-mRNA vertreten. In Plazenta, Niere sowie Leber sind die mRNA von ATBP60 und ATBP135 detektierbar. Im Herzen sind die beiden kleinen Varianten ATBP50 und ATBP60 stark, im Gehirn und Lunge nur sehr schwach nachzuweisen. In Thymus, Testes und Milz ist keine der ATBP-Varianten zu detektieren. Als Ladungskontrolle wurde der *Northern blot* von seiner Sonde befreit und erneut mit einer Sonde gegen GAPDH gelabelt.

Ergebnisse

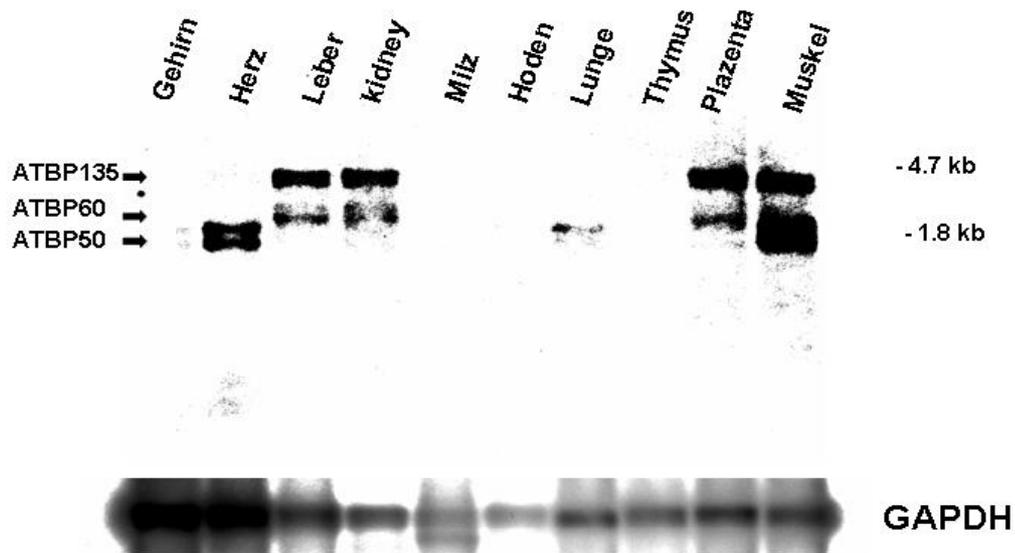


Abb. 2.2 Nachweis von ATBP-mRNA durch Northern blot

Gesamt-mRNA aus verschiedenen Geweben der Maus wurde im Agarosegel aufgetrennt und auf eine Nitocellulosemembran geblottet. ATBP-mRNA wurde anschließend auf der Membran mit radioaktiv markierter ATBP-cDNA als Sonde nachgewiesen.

3.2.2 Sequenz und Strukturanalyse der ATBP-Proteine

Die DNA-Sequenzen der ATBP-cDNAs wurden mit dem Programm Transeq des EBI in Proteinsequenzen umgeschrieben und anschließend mit SAPS - *Statistical Analysis of Protein Sequences* der Stanford University das Molekulargewicht berechnet. Die kalkulierte Länge und das Molekulargewicht der Proteine war für:

ATBP50 (GenBank accession number AY626781) 440 AS und ca. 50 kDa

ATBP60 (GenBank accession number AY626782) 520 AS und ca. 60 kDa

ATBP135 (GenBank accession number AY626781) 1210 AS und ca. 135 kDa.

Die DNA-Protein-Translation ist im Anhang dargestellt.

Eine PHI- and PSI-BLAST- (Altschul et al., 1997) Suche mit den Proteinsequenzen zeigte keine signifikanten Homologien zu bekannten Sequenzen in der NCBI-Datenbank. Eine Strukturhomologie konnte zu Proteinen nachgewiesen werden, die eine lange Coiled-coil Region wie Golgi-Matrix-Proteine besitzen. Beispiele hierfür sind z.B.: GM130/golgin-95 (Nakamura et al., 1995), GCP170 (Misumi, Y. et al., 1997), golgin-160 (Fritzler, MJ et al., 1993) und p115 (Sapperstein, SK et al., 1995). ATBP50 kann aufgrund seiner hohen Homologie zum humanen mitochondrial tumor

Ergebnisse

suppressor gene 1 (MTSG1) Protein (Seibold et al., 2003) und dem humanen ATIP (Nouet et al., 2004) als die murine Variante dieser Proteine gesehen werden.

In der Protein-Familien-Datenbank Pfam (Bateman et al., 2002) konnte eine Homologie von ATBP50 zum Pfam-Eintrag CDD:pfam05483 oder HOOK Protein gefunden werden. Es wurde gezeigt, dass Proteine, die diese Struktur aufweisen eine erhöhte Wahrscheinlichkeit zeigten, am Golgi-Apparat zu binden (Walenta et al., 2001).

Strukturell können die ATBP-Proteine in zwei Regionen geteilt werden, in eine „Kopf-Region“, die isoformspezifisch ist, und eine „Schwanz-Region“, die die C-terminalen 400 AS umfasst und bei allen drei Vairanten identisch ist (Abb.2.3.).

| | | | | |
|--------------|------------------------|----------------------|------------------|--------------------|
| p153 | | MNDDNSDRTEDGSRYVFI | RDKNSNPSEYYQ | 30 |
| p153 | TSLSAQCPSVSHGDWNSD | NPDAMVVVDYEMDPAVDS | SESVLSLHQCV | EELAYPEPSSDFMG 90 |
| p153 | KHEFTMYSELTCQSPALV | NTGKPDQLHSNCDSLEAI | QDEKFDPLKPC | ECRSDDDDYACGDS 150 |
| p153 | PEVLELKQTYGMKVDTAN | YTFIARHDIEQGQPLHAP | GGLQTTVRDRN | ALS |
| p153 | KMYVRGVNYNREN | FENLQATPSKTLN | TFTV | ISDVL |
| p153 | DGTRRGLIGEKEIQAV | TLVSDGMEVPNGSASQ | EYFCVSEDDPN | SETHSHGPYAQQ |
| p153 | LRGTLPNCHVDGEC | PVLPFAFEKSKTRVLG | SECKVTVTED | PHIDSHDNDSDI |
| p153 | LRSVSGQRGSPYEMG | WENGGAICTDKAGCM | STPVEQPPNLS | FRLEPAEVKKN |
| p153 | RDAKRAPNLKGEPT | NMPKPNLGKSATKT | TNTTVGSKVR | KEIISYPTPN |
| p153 | VLQPKDTSIMKDT | PSQVTTGGSSPSPG | PSKHLTMMNK | APRSDFKASK |
| p153 | FNKLI | TSQAAQVTT | HSKNASLGV | PRRTSATKSNQ |
| | | | | ENVDKTGS |
| | | | | PHAGSETGS |
| | | | | VAAFFQKIK 630 |
| p60 | ----- | | | M 1 |
| p153 | GILPVKMKSS | ECLEVTYVSHIDQIS | PEKGEQDGEAP | MEKQELGKQAT |
| | | | | NEIFESKSL |
| | | | | LVGS 690 |
| p60 | TIPGGFRSCTETDIS | TIFINSTLT | PPAGSERQY | DATLLALLV |
| p153 | APKTSTTPGRSS | SKPDSRSLRKT | PGLKAKVGPTA | ACLRRKSESRT |
| | | | | LGSDRALSPQR |
| | | | | IRRV 750 |
| p50 | ----- | | | MLLSPKFSLS |
| p60 | KKSGHAA | INKYEEKPPKQAF | QNGSGPLYL | KPLV |
| p153 | SGSGHAA | INKYEEKPPKQAF | QNGSGPLYL | KPLV |
| | | | | PTRAHSHLLKT |
| | | | | SPKGPSRKSL |
| | | | | FTAFNS 120 |
| | | | | FTAFNS 809 |
| p50/p60/p135 | VEKGRQKNPRSLCI | QQTAPDVLSSERTLE | LAAQYKTKCES | QSGFILHLRQL |
| p50/p60/p135 | EALTVVIQHLLS | EREEALKQHKTLSQ | ELVSLRGELVA | ASSACEKLEK |
| p50/p60/p135 | VQKLNQQHQTD | RTELENRLKDLYT | AEEKLSIYIEE | AEKYKTQLQE |
| p50/p60/p135 | KLEIEASHSEK | VELLKKTYETSLS | EIKKSHEMEKK | SLEDLLNEKQ |
| p50/p60/p135 | DALNERLKSEE | QQLSREKANSKNP | QVMYLEQELES | LKAVLEIKNE |
| p50/p60/p135 | KLVDNNTALV | DKLKRFOENEELK | ARMDKHMAISR | QLSTEQAALQ |
| p50/p60/p135 | MENEELLWKLH | NGDLCSPKRSPT | SSAIPFQSPRN | SGSFSSPSIS |
| | | | | PR 440/520/1209 |

Abb. 2.3 Alignment der ATBP-Proteine

Ergebnisse

Position der Aminosäure als Nummer am rechten Rand

Um eine Vorstellung von der Struktur der Proteine zu bekommen, wurden die Sequenzen der Proteine in verschiedene Programme zur Strukturberechnung eingegeben.

Das Programm COILS (version 2.1) vom EMBnet (Lupas A. et al., 1991) berechnete eine hohe Wahrscheinlichkeit, dass die letzten 149 AS der Proteine eine α -helikale *coiled-coil* Struktur einnehmen (Abb. 2.4). Dieses Strukturmerkmal wird durch die starken „Helix-Brecher“ Asparagin und Prolin (Tripet B. et al., 2000) in Position 260 und 261 unterbrochen. Die 38 AS des C-terminalen Endes können als eine Prolin/Serin-reiche Region beschrieben werden und bilden keine *coiled-coil* Struktur.

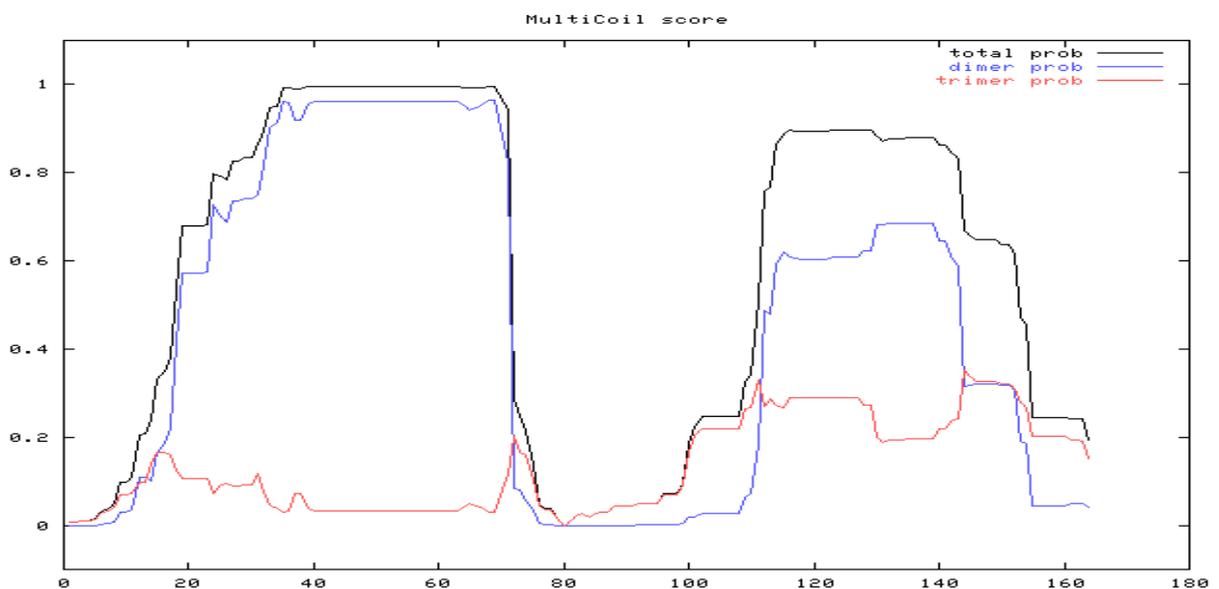


Abb. 2.4 Multicoil-Plot der 169 AS der C-terminalen Region der ATBP-Proteine

Die Sequenz der letzten 160 Aminosäuren von ATBP wurden mit dem Programm COILS vom EMBnet auf die Wahrscheinlichkeit berechnet, eine α -helikale *coiled-coil* Struktur einzunehmen.

Zudem konnte die beschriebene *coiled-coil* Struktur noch weiter klassifiziert werden. Mit dem Program 2ZIP des DKZF, Heidelberg, konnte in dieser *coiled-coil* Region ein potentieller Leucin-Zipper aufgedeckt werden, eine spezialisierte Form eines *coiled-coil* Motivs, in der jede siebte AS ein Leucin ist. Diese Struktur dient Proteinen häufig zur Dimerisierung (Lupas A, 1996; O'Shea, E. K., et al., 1989).

Ein wichtiges Indiez für die Lokalisation und Funktion eines Proteins ist die Frequenz und die Lage von hydrophoben AS. Mittels eines Hydropathie-Plots (Kyte, J. und

Doolittle, RF., 1982) konnte gezeigt werden, dass die ATBP-Proteine hoch hydrophil sind und keine längeren hydrophoben Regionen aufweisen, die zur Membraneinlagerung dienen könnten.

3.2.3 Subzelluläre Lokalisation von ATBP50

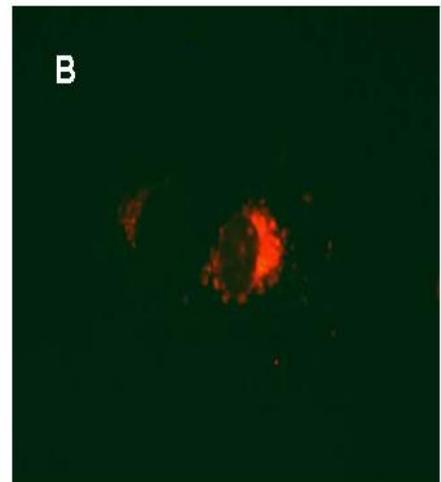
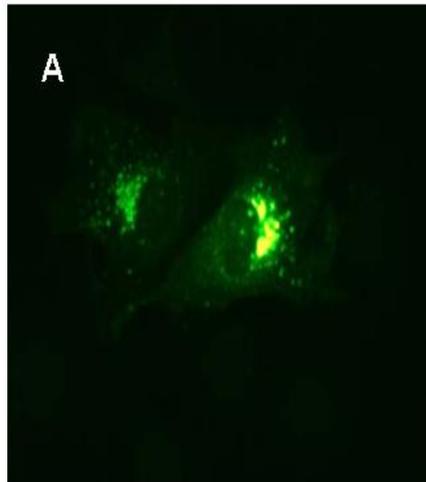
Als nächstes wurde die subzelluläre Lokalisation von ATBP50 näher untersucht. Die für ATBP50 charakteristische Lokalisation in der Zelle, sowie die Homologie zu bekannten Golgi-Proteinen wiesen auf eine Lokalisation am Golgi-Apparat hin. Aus diesem Grund wurde ein Golgi-Marker konstruiert, der in Zellen exprimiert am Golgi-Apparat akkumuliert, und diesen durch ein fluoreszierendes Fusionsprotein anfärbt. Mit diesem Marker und dem V5-Tag fusionierten ATBP50 wurden COS-7 Zellen cotransfiziert. In den Abbildungen 2.5 A und B ist zu sehen, dass ATBP50 in derselben subzellulären Region lokalisiert ist wie der Golgi-Marker und daher auf eine Lokalisation von ATBP50 am Golgi-Apparat hinweist. Da ATBP50 weder eine Signalsequenz zur Golgi-Internalisierung noch eine Transmembranregion oder Palmitoylierungs- bzw. Myristoylierungs-Sequenz aufweist, mußte die Bindung an das Golgi über eine Proteininteraktion von ATBP50 mit Golgi-residierenden Proteinen stattfinden.

Um diese Hypothese zu testen, wurden Deletionsmutanten des ATBP50 hergestellt. Zum einen wurde das N-Terminus des ATBP50 (Aminosäure 1-120) deletiert, in einem zweiten Ansatz das C-Terminus (Aminosäure 400-440). Die N-terminal deletierte Mutante von ATBP50 war in derselben Weise lokalisiert wie WT-ATBP50. Die C-terminale Mutante hingegen verlor, wie in Abbildung 2.5 C zu sehen, die charakteristische Lokalisation und wurde diffus in der gesamten Zelle einschließlich des Zellkerns gefunden. Dieses Ergebnis zeigt, dass ATBP50 über seinen C-Terminus eine Interaktion mit Golgi-residierenden Proteinen eingeht.

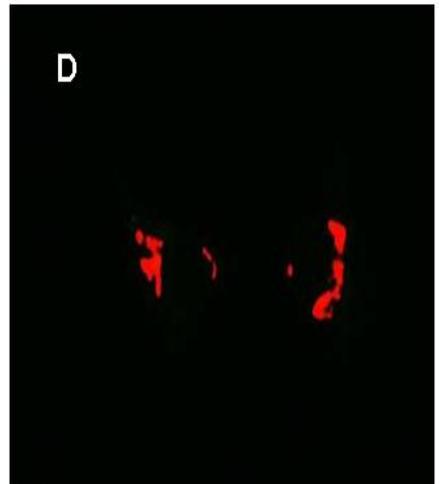
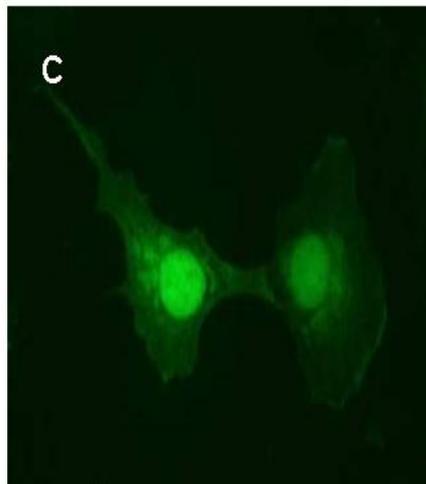
Ergebnisse

Transfection:

Flag-tagged wtATBP50
+
DsRed-tagged GM



Flag-tagged ATBP Δ C
+
DsRed-tagged GM



Filter for:

green fluorescence

red fluorescence

Abb. 2.5 Die C-terminale Trunkierung von ATBP50 führt zum Verlust der Golgi-Lokalisation

COS-7 Zellen wurden mit V5-Taged wtATBP50 und mit DsRed-tagged Golgi Marker (A, B) sowie mit V5-getaggeten ATBP Δ C und DsRed-tagged Golgi Marker (C,D) transfiziert. Die V5-getaggeten Proteine wurden mit Fitc-gekoppelten Antikörpern nachgewiesen.

3.2.4 Datenbanksuche mit ATBP50 Proteinsequenzen

Es wurde die Proteinsequenzen von ATBP50 aus der Maus genutzt, um in verschiedenen Datenbanken nach homologen Sequenzen zu suchen. Es konnten homologe Sequenzen in den Datenbanken des Menschen (hATBP50), der Ratte (rATBP50), des Krallenfrosches *Xenopus leavis* (xATBP50) sowie des Fisches *Dario rerio* (fATBP50) gefunden werden. Diese Sequenzen sind in Abb. 2.6 als ein *multiple*

Ergebnisse

sequence alignment dargestellt, dass mit dem Programm ClustalW angefertigt wurde.

Sequenzen, die für die Funktion des Proteins unmittelbar wichtig sind, sind in stärkerem Maße evolutionär konserviert. Aus diesem Grund lassen sich aus den Proteinsequenzvergleichen Rückschlüsse auf Sequenzregionen schließen, die für die Funktion der Proteine eine Rolle spielen.

In diesen Proteinsequenzvergleichen ist auffallend, dass die letzten 130 AS der Proteine nahezu identisch sind. Wie sich durch spätere Untersuchungen zeigte, ist diese Region für die Lokalisation der Proteine an den Golgi-Apparat verantwortlich. Zudem ist die *coiled-Coil* Region sowie die Leucin-Zipper, die zur Dimerisierung der Proteine beitragen, stark konserviert. Variabler erscheint die N-terminale Region, die für die Interaktion mit dem AT2-Rezeptor verantwortlich ist.

Eine Suche in den Datenbanken von *Drosophila melanogaster*, *A.thaliana*, *C.elegans* sowie *Saccharomyces* ergab keine homologen Sequenzen. Es scheint daher keine verwandten Proteine in diesen niederen Organismen zu geben. Daher scheint die Vermutung nahe zu liegen, dass es sich bei ATBP-Proteinen um eine junge Familie von Proteinen handelt.

CLUSTAL W (1.82) multiple sequence alignment

```
rATBP50      -----
mATBP50      -----
hATBP50      -----
xATBP50      -----
fATBP50      MIVKSELDIDAVIYTTSIYIDGITMWFHQHKKKNAQMRVKSLAGAVKLSMRGKSCNIRP 60

rATBP50      -----
mATBP50      -----
hATBP50      -----
xATBP50      -----
fATBP50      TLKMAVDVSRRTQAVCFLASELHEDSPVEPE SAVGNPKPHTTTTEEASNPPPPPGPVGKHGA 120

rATBP50      -----MLLSPKFSL S 10
mATBP50      -----MLLSPKFSL S 10
hATBP50      -----MLLSPKFSL S 10
xATBP50      -----MGPNKIEQKGI IQPHFDKA 19
fATBP50      APASKLPVKGLTNLSPQTLALNDNNGTMAAGICMCGKMGVGLVSRRNQSKRRTTQQKLSKA 180

. . . .
```

Ergebnisse

| | | |
|---------|---|-----|
| rATBP50 | T----- | 11 |
| mATBP50 | T----- | 11 |
| hATBP50 | T----- | 11 |
| xATBP50 | QS-----LKEAKEG | 28 |
| fATBP50 | SPPYQHQSQCYSHQCFWSSKASCDEGSCYNTSSQNFCSEKSDHDSQQTQYSQDPPSP | 240 |
| | | |
| rATBP50 | ----IHVRLTAKGLLRNLRPSG----- | 30 |
| mATBP50 | ----IHVRLTAKGLLRNLRPSG----- | 30 |
| hATBP50 | ----IHVRLTAKGLLRNLRPSG----- | 30 |
| xATBP50 | TVSADMDILANIVPLPTKLAIPSSRN-----LHK | 57 |
| fATBP50 | SQKHPCYYQAEIPAFPAKLQLSEALPGTNRVIRGILGCADSYRSCVVCNVCFNARVAMRWP | 300 |
| | : * : . . | |
| | | |
| rATBP50 | -----LRKNTVIFHT-----VEKGRQKN-PR | 50 |
| mATBP50 | -----LRKNTVIFHT-----VEKGRQKN-PR | 50 |
| hATBP50 | -----FRRSTVVFHT-----VEKSRQKN-PR | 50 |
| xATBP50 | ELILGIKNVASQPAKGRVQTTVQRRGSLGKNILTIRVSSPPREKQVTVVEKNKQKTSR | 117 |
| fATBP50 | DKSLQLQGAPHMRIHTEDLKTMRDSASSPKLFYVRYNANGAKSSIHWVVDKNKQREASR | 360 |
| | . . . : * : * : * | |
| | | |
| rATBP50 | SLCIQ-----TQTAPDVLSTERTLELAQYKTKCENQSGFILHLKQL | 91 |
| mATBP50 | SLCIQ-----TQTAPDVLSSERTLELAQYKTKCESQSGFILHLRQL | 91 |
| hATBP50 | SLCIQ-----PQTAPDALPPEKTLELTQYKTKCENQSGFILQLKQL | 91 |
| xATBP50 | GPVTQ-----AQTPP---VDPKSIELTKCKAACEQQRGVIENLKNL | 155 |
| fATBP50 | QTHCNGVSQCDGQKQKHQQISSDLNASKASAADGTVTTKHNQSKEHAEKKKQAVTQLRRM | 420 |
| | : : : * : * : * | |
| | | |
| rATBP50 | LSCGNTKFEALTVVIQHLLSREEEALKQHKTLSQELVSLRGELVAASSTCEKLEKARNDL | 151 |
| mATBP50 | LSRGNTKFEALTVVIQHLLSREEEALKQHKTLSQELVSLRGELVAASACEKLEKARTDL | 151 |
| hATBP50 | LACGNTKFEALTVVIQHLLSREEEALKQHKTLSQELVNLRGELVTASTTCEKLEKARNEL | 151 |
| xATBP50 | LSSSNQRFEALTVVVQQLINQREETLKKRKALSQELNLNRGDLVCASSTCERLEKEKNEL | 215 |
| fATBP50 | LIQGNKRVEALATVIQHIFSEREEAVKQKGEIASELANLRDELVLSTQCKKRLQKEKEEM | 480 |
| | * . * : * * * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * | |
| | | |
| rATBP50 | QTAYEGFVQKLNQQHQTDQTELENRLKEFYTAECEKLQSIYIEEAEKYKTQLQEQFDNLN | 211 |
| mATBP50 | QTAYQEFVQKLNQQHQTDRTTELENRLKDLYTAECEKLQSIYIEEAEKYKTQLQEQFDNLN | 211 |
| hATBP50 | QTVYEAFVQ----QHQAETERENRLKEFYTREYEKLRDITYIEEAEKYKMLQEQFDNLN | 207 |
| xATBP50 | LKAYEGILQKVKEEHHAEALSDLEELKQFYTGCECEKLQSIYIEEAEKYKNELQEKVDDLN | 275 |
| fATBP50 | RSSFEEAMKTLEGHQHEELVQLENRLKSFYQREWVKVHQIYQEEADKCCMLMEEQVERLR | 540 |
| | . : : : * : : * : * : * : * : * : * : * : * | |
| | | |
| rATBP50 | AAHETTKLEIEASHSEKVELLKKTYETSLSEIKKSHEMEKKLEENLLNEKQESLEKQIND | 271 |
| mATBP50 | AAHETTKLEIEASHSEKVELLKKTYETSLSEIKKSHEMEKKSLEDLLNEKQESLEKQIND | 271 |
| hATBP50 | AAHETSKLEIEASHSEKLELLKKAYEASLSEIKKGHEIEKKSLEDLLSEKQESLEKQIND | 267 |
| xATBP50 | TTHEAYRLQAETSQIETIHTLKEDYEKSLTELKDAKDKENKILEDSFKQAEVEKKILE | 335 |
| fATBP50 | KQQQAERENQEVITQRMDSLKLHYESCIEQLKRTHEKDMENLEKSLKRTETSLSDKILP | 600 |
| | : : : * : : . * * . : * * : : : * . : . . : . . . * | |

Ergebnisse

```
rATBP50      LKSENDALNERLKSEE-QKQLSREKANSK-----NPQVMYLEQELE 311
mATBP50      LKSENDALNERLKSEE-QKQLSREKANSK-----NPQVMYLEQELE 311
hATBP50      LKSENDALNEKLEKSEE-QKRRAREKANLK-----NPQIMYLEQELE 307
xATBP50      LKDVNESLKEKLYEERQRKLTKEKSVQK-----NPQVMYLEQELE 376
fATBP50      LSTEKEALYKKLKEEEDGKHTPAEKYLVGSVLSRAALQTFLLTIKMDSHVLYLEQELE 660
* . :::* ::* * * : : : : :
                                     :.::::*****

rATBP50      SLKAVLEIKNEKLHQDDLKMKMEKLVDNNTALVDKLTFRFQENEELKARMDRHMAISRQ 371
mATBP50      SLKAVLEIKNEKLHQDDMKMKMEKLVDNNTALVDKLTFRFQENEELKARMDKHMAISRQ 371
hATBP50      SLKAVLEIKNEKLHQDDIKMKMEKLVDNNTALVDKLTFRFQENEELKARMDKHMAISRQ 367
xATBP50      SLKAVLEIKNEKLHQDDKMKMQVEKLVETNTTLVERLNKCCQENEDLKARMVNHVALSRQ 436
fATBP50      SLKAVLEIRNQHLHQEKKLMEMDKLMEANIKLEECLKKVQQENEDYQARMDKYAALSQ 720
*****:.*:***: * * : * .: ***** :*** .: *:*

rATBP50      LSTEQAALQESLEKESKVNKRLSMENEELLWKLHNGDLC-SPKR-SPTSSAIPFQSPRNS 429
mATBP50      LSTEQAALQESLEKESKVNKRLSMENEELLWKLHNGDLC-SPKR-SPTSSAIPFQSPRNS 429
hATBP50      LSTEQAVLQESLEKESKVNKRLSMENEELLWKLHNGDLC-SPKR-SPTSSAIPFQSPRNS 425
xATBP50      LSTEQEVLRSLQESKANKRLSMENEELLWKLHNGDLC-SPKLSPPSPGIPFHPSPRNS 495
fATBP50      LSSEQVVLQQLQESKVNKRLSMENEELLWKLQNCDLLPSPRLSPTS---PFNSPRNS 777
**:* .**.*:*:* .*****: * * * * : **:* * :.*.***

rATBP50      GSFSSPS-ISPR 440
mATBP50      GSFSSPS-ISPR 440
hATBP50      GSFSSPS-ISPR 436
xATBP50      GSFSSPT-VSPR 506
fATBP50      AAFPTAAPLSPR 789
.*.:.: :***
```

Abb. 2.6 CLUSTAL W alignment mit den Proteinsequenzen von ATBP50

Die Proteinsequenzen von Ratte (rATBP50), Maus (mATBP50), Menschen (mATBP50), *Xenopus laevis* (xATBP50), *Dario rerio* (fATBP50) wurden mit dem Programm CLUSTAL W auf ihre Homologie untersucht.

3.2.5 Genomische Organisation des ATBP-Gens

Um die genomische Organisation des ATBP-Gens zu untersuchen, wurde die ATBP-mRNA Sequenzen für eine Suche in den Datenbanken von NCBI (*genomic BLAST*) eingesetzt. Es zeigte sich, dass das ATBP-Gen der Maus und des Menschen auf dem Chromosomen 8p21.3 lokalisiert ist. Das gesamte Gen umspannt eine Region von ca. 90 kb mit 15 Exons sowie 14 Introns, die alle eine GT-AG Konsensussequenz zeigen.

3.3 Charakterisierung der Interaktion von AT2-Rezeptor und ATBP50

3.3.1 Subzelluläre Lokalisation von AT2-Rezeptor und ATBP50

Nachdem die Interaktion zwischen dem AT2-Rezeptor und ATBP50 biochemisch verifiziert werden konnte, wurde nun mittels Immunfluoreszenzmikroskopie die relative Lokalisation und Kompartimentierung der beiden Proteine in intakten Zellen untersucht. COS-7 Zellen wurden mit dem grün fluoreszierenden N-terminal EGFP-fusionierten AT2-Rezeptor und V5-gekoppelten ATBP50 transfiziert. Wie in Abbildung 2.8 dargestellt, wurde der AT2-Rezeptor erwartungsgemäß in der Plasmamembran der Zellen exprimiert. Für ATBP50, dass mit dem rot fluoreszierenden Antikörper gegen das V5-tag nachgewiesen wurde, erwies sich ein Muster von intrazellulären, vesikulären Strukturen, die sich in der Nähe des Zellkerns gruppierten, als charakteristisch. Eine Kolokalisation des AT2-Rezeptors mit dem ATBP50 konnte nur in den vesikulären Strukturen nachgewiesen werden, nicht aber in der Plasmamembran.

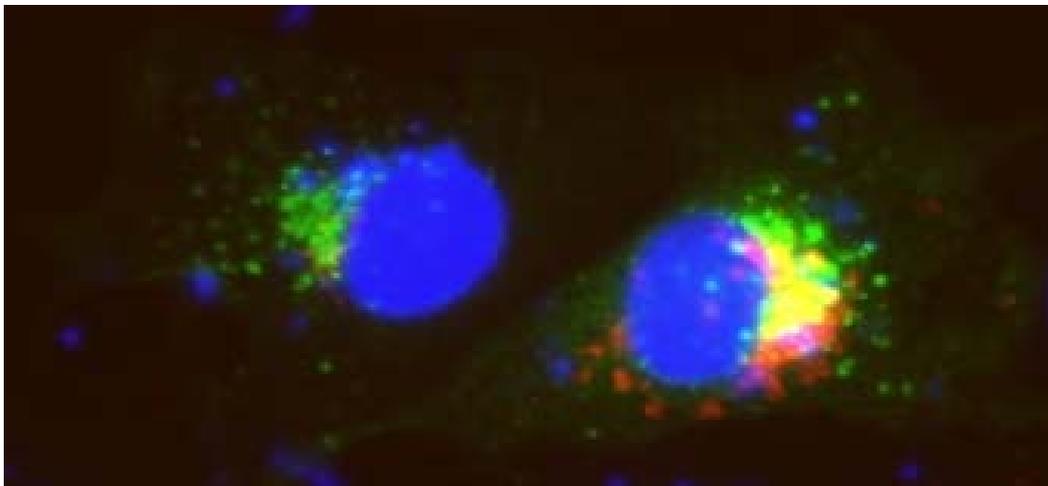


Abb. 2.8 Lokalisation von AT2-Rezeptor und ATBP50

COS-7 Zellen wurden mit N-terminal EGFP-fusioniertem AT2 Rezeptor sowie V5-gekoppelten ATBP50 transfiziert und nach 48 h fixiert. ATBP50 wurde anschließend mit Cy3-gekoppeltem Antikörper nachgewiesen. Die Aufnahmen zeigen die Verteilung von ATBP50 (rot) und AT2-Rezeptor (grün). Die Zellkerne wurden mit Höchstfarbstoff gefärbt (blau).

3.3.2 ATBP50 ist erforderlich zum AT2-Rezeptor *trafficking*

Um die physiologische Bedeutung der ATBP50/AT2-Rezeptor-Interaktion zu untersuchen, haben wir die endogene Expression von ATBP50 mittels siRNA-Technologie inhibiert. Hierfür wurden N1E-115-Zellen, die sowohl AT2-Rezeptor als auch ATBP50 exprimieren, transient mit EGFP-markiertem AT2-Rezeptor transfiziert. Wie in Abbildung 2.9 A zu sehen, konnte in der konfokalen Mikroskopie der transfizierte AT2-Rezeptor überwiegend an der Plasmamembran der Zellen nachgewiesen werden. Wurden die Zellen 48 h vor der Transfektion mit dem AT2-Rezeptor-Konstrukt mit siRNA gegen ATBP50 transfiziert, konnte der Rezeptor wie Abbildung 2.9 B zeigt nicht nur an der Zelloberfläche, sondern auch im Zytosol der Zelle nachgewiesen werden.

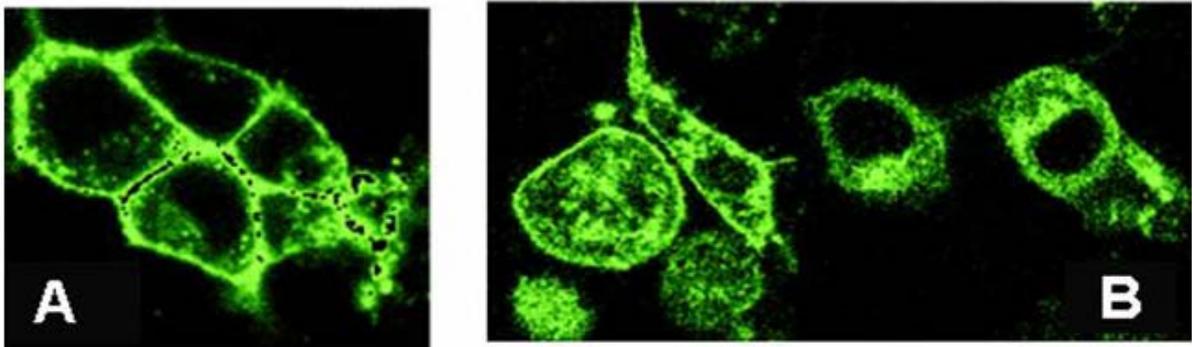


Abb. 2.9 Veränderung der Lokalisation des AT2-Rezeptors nach Transfektion von siRNA gegen die mRNA von ATBP50

A. N1E-115-Zellen auf Glasplättchen kultiviert und transient mit EGFP-markiertem AT2-Rezeptor transfiziert und nach 48 h Inkubation bei 37°C fixiert.

B. N1E-115-Zellen auf Glasplättchen kultiviert und vor der Transfektion mit EGFP-markiertem AT2-Rezeptor mit siRNA gegen mRNA von ATBP50 transfiziert. Nach 48 h Inkubation bei 37°C wurden die Zellen fixiert.

Um diese Befunde zu untermauern, haben wir ein Zelloberflächen-ELISA etabliert. Hierfür wurden N1E-115-Zellen mit siRNA gegen ATBP50 transfiziert. Nach siRNA-Transfektion wurden die Zellen mit N-terminal Flag-Tagged AT2-Rezeptor (wtAT2R) transfiziert und in 96-Well Assay-Platten kultiviert. Mit alkalischer Phosphatase konjugiertem Antikörpern gegen das extrazelluläre N-terminale Flag-tag konnte der AT2-Rezeptor an der Zelloberfläche nachgewiesen werden. Die Ergebnisse, die in Abbildung 2.10 dargestellt sind, zeigen eine signifikant verminderte

Ergebnisse

Zelloberflächenexpression des AT2-Rezeptors in Zellen, die mit siRNA gegen ATBP50, im Vergleich zu Zellen, die mit Kontroll-siRNA behandelt wurden.

Darüber hinaus konnte eine Verringerung der Zelloberflächenexpression festgestellt werden, wenn eine Flag-Tagged Mutante des AT2-Rezeptors (AT2R Δ T), dieser Mutante fehlen die letzten 65 AS des intrazellulären C-Terminus - transfiziert wurden (Abbildung 2.10).

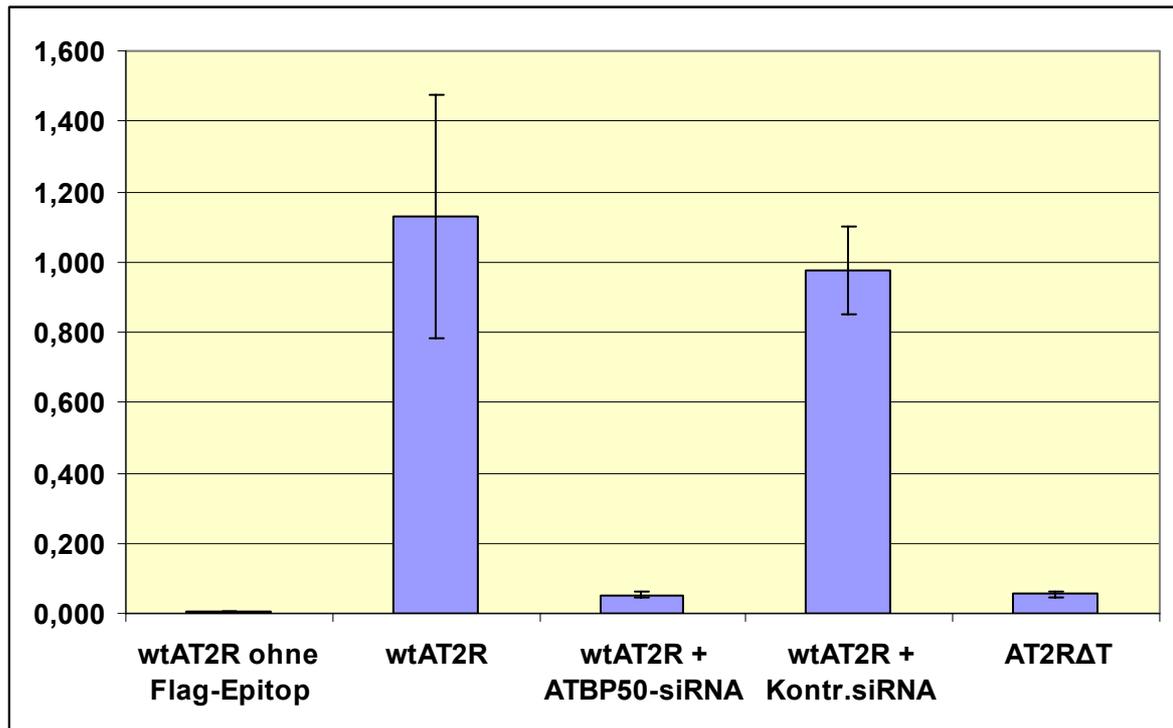


Abb. 2.10 Zelloberflächen-ELISA mit Flag-tagged AT2-Rezeptor mit und ohne siRNA gegen die mRNA von ATBP50 sowie einer AT2-Rezeptor-Mutante ohne C-terminales Ende

N1E-115-Zellen wurden wie angegeben mit AT2-Rezeptor-Konstrukten und siRNA gegen ATBP50 transfiziert. Die Menge an AT2-Rezeptor an der Zelloberfläche wurde mit Antikörpern gegen das Flag-Tag des AT2-Rezeptor-Konstrukts nachgewiesen.

Mit diesen Experimenten konnte gezeigt werden, dass die Interaktion von ATBP50 mit dem intrazellulären, C-terminalen Ende des AT2-Rezeptors für die Expression des Rezeptors an der Zelloberfläche verantwortlich ist.

3.3.3 Einfluss von ATBP50 auf die AT2-Rezeptor-Funktion in N1E-115-Zellen

Die Funktion des AT2-Rezeptors wird in der Hauptsache durch die von ihm aktivierte Phosphatase vermittelt. Diese Funktion kommt dann zum Tragen, wenn die Zellen über einen proliferativen Stimulus, wie z.B. EGF, eine Phosphorylierung und daraus resultierend eine Aktivierung der ERK1/2 erfahren. Wird in diesem Kontext der AT2-Rezeptor stimuliert, erfolgt eine Reduktion der EGF-vermittelten maximalen ERK1/2-Aktivierung.

Nachdem die Interaktion des AT2-Rezeptors und ATBP50 als wichtiger Schritt in der Rezeptorexpression an der Plasmamembran beschrieben werden konnte, wurde der Einfluss von ATBP50 auf die Funktion des AT2-Rezeptors untersucht.

Hierfür wurden N1E-115-Zellen eingesetzt, da in diesem Zellsystem der antiproliferative Effekt einer AT2-Rezeptor-Stimulation nach EGF-Rezeptor-Stimulation bereits gezeigt werden konnte (Nahmias et al., 1995).

Die Aktivierung von ERK1/2 wurde durch einen *Western blot* dargestellt, in dem der eingesetzte anti-phospho-ERK-Antikörper ausschließlich die phosphorylierte und somit aktivierte Form der ERK1/2 erkennt.

Wie erwartet wurde eine deutliche Erhöhung der ERK1/2-Aktivierung nach 4 stündiger EGF-Stimulation (50ng/ml) im Vergleich zur Kontrolle sichtbar (Abbildung 2.11 A Linie 1 und 2). Diese Aktivierung konnte durch die Gabe von 50 nM AngII inhibiert werden (Abbildung A 2.11 Linie 3). Dieser AT2-Rezeptor-Effekt konnte mit dem AT2-Rezeptor selektiven Blocker PD123319 (10 µmol/L) fast vollständig inhibiert werden (Abbildung A 2.11 Linie 4). Eine ähnliche Inhibition des Rezeptors konnte mit der siRNA gegen ATBP50 erzielt werden, nicht aber mit der Kontroll-siRNA (Abbildung 2.11 A Linie 5 und 6). Um eine Stimulation des AT1-Rezeptors zu verhindern, wurden die Zellen mit 10µm/L Losartan vorbehandelt.

Ergebnisse

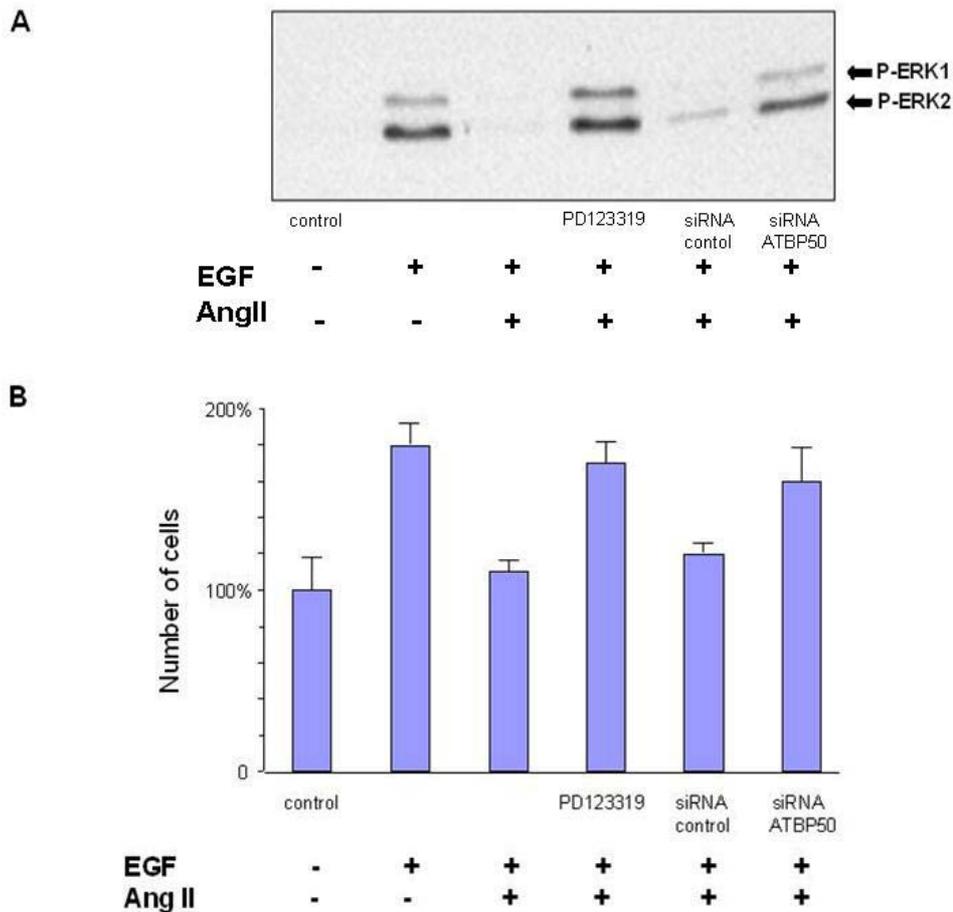


Abb. 2.11 Einfluss von siRNA gegen die mRNA von ATBP50 auf die antiproliferative Wirkung von AT2-Rezeptor-Stimulation

A. N1E-115-Zellen wurden wie beschrieben behandelt, die Zelllysate wurden immunogeblottet und die Aktivierung der ERK1/2 mittels phospho-spezifischen Antikörpern analysiert.

B. N1E-115-Zellen wurden für 48 h. bei 37°C mit (+) oder ohne (-) EGF (50ng/ml) und AngII (50 nM) behandelt. Die Proliferation wurde mittels Cyquant gemessen. Die Y-Achse zeigt die relative Fluoreszenz zur Kontrolle (100%).

Um diese Ergebnisse der ERK1/2-Inhibition zu verifizieren, wurde ein Proliferationsassay mit den gleichen Versuchsbedingungen durchgeführt. Nach zwei Tagen EGF-Stimulation (50 ng/ml) der N1E-115-Zellen hatte sich die Zellzahl im Vergleich zu den unbehandelten Zellen nahezu verdoppelt (Abbildung 2.11 B Säule 1 und 2). Diese Induktion der Proliferation konnte mit der Gabe von 50 nM AngII auf Kontrollniveau reduziert werden (Abbildung 2.11 B Säule 3). Auch in diesen Versuchen wirkte die siRNA gegen ATBP50 wie der AT2-Rezeptor-Blocker

Ergebnisse

PD123319 (Abbildung 2.11 B Säule 4 und 6). Die siRNA-Kontrolle zeigte auch hier keine inhibitorische Wirkung (Abbildung A 2.11 Säule 5).

4 Diskussion und Ausblick

Mit dem (offiziellen) Abschluss des weltweit organisierten humanen Genomprojektes gelang die Identifizierung und Kartierung aller menschlichen Gene, deren Gesamtzahl heute auf etwa 30.000 geschätzt wird (Lander et al., 2001). Während aber die Dekodierung von Nukleinsäuresequenzen ein hoch automatisierter Prozess ist, stellt die Identifizierung jedes neuen Proteins und vor allem dessen Charakterisierung noch immer ein vergleichsweise individuelles Problem dar. Hierbei können mit *large scale*-Ansätzen wichtige Informationen beispielsweise über die vielfältigen Interaktionen innerhalb von Multienzymkomplexen erhalten werden (Gavin et al., 2002). Dies kann jedoch im Einzelfall eine differenzierte Detektivarbeit zur Erforschung der speziellen Eigenschaften und der Funktion unbekannter Proteine nicht ersetzen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde mit ATBP50, ATBP60 und ATBP135 eine neue Familie von Proteinen identifiziert und charakterisiert. Es konnte ferner gezeigt werden, dass ATBP50 die subzelluläre Verteilung sowie die Aktivität des AT2-Rezeptors moduliert.

4.1 ATBP50, ATBP60 und ATBP135: eine neue Proteinfamilie

4.1.1 Identifikation von ATBP50, ATBP60 und ATBP135

Als Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit diente ein unbenannter cDNA-Klon, der mit Hilfe des *Yeast two-Hybrid* Systems unter Verwendung einer cDNA-Bibliothek aus dem Embryo der Maus als Bindungspartner des AT2-Rezeptors identifiziert worden war. Da jedoch bei der Herstellung von cDNA-Bibliotheken häufig cDNA-Fragmente resultieren, ergab sich zunächst die grundlegende Aufgabe, den potentiellen AT2-Interaktionspartner in voller Länge zu klonieren. Während das 3'-Ende des cDNA-Klons bereits durch eine Poly-A Sequenz definiert war, wurde das 5'-Ende mit Hilfe einer 5'-RACE unter Verwendung von Mausembryo-cDNA als Matrize vervollständigt. Somit gelang die Identifizierung eines neuen ca. 50 kDa großen Proteins (GenBank accession number AY626781) mit einem offenen Leserahmen von 1320 bp bzw. 440 Aminosäuren, das als ATBP50 (AT2-Rezeptor Bindeprotein von 50 kDa), bezeichnet wurde. Des Weiteren wurde im Rahmen von

Datenbankrecherchen ein cDNA-Klon mit der kompletten ATBP50-Sequenz sowie weitere 5'-terminale ESTs mit übereinstimmender Startsequenz gefunden.

Ein weiterer Beleg für die Vollständigkeit der ATBP50-cDNA ist die Tatsache, dass dem 5'-untranslatierten Bereich der ATBP50-Sequenz im Mausgenom ein Stop-Kodon vorgeschaltet ist. Mittels *Northern blot*-Analyse mit Mausembryo-mRNA konnten neben der erwarteten Bande bei ca. 2.5 kb zwei weitere Banden bei 3.6 kb und 5.9 kb detektiert werden. Dieses liess auf zwei weitere Isoformen von ATBP schließen. Durch 5'-RACE konnten auch diese beiden mRNA-Transkripte definiert werden: die 520 bzw. 1209 Aminosäure langen Proteine, welche wir ATBP60 (GenBank accession number AY626782) und ATBP135 (GenBank accession number AY626781) nannten.

Zeitgleich und unabhängig von unserer Arbeitsgruppe haben Nouet et al. ATIP1 (*AT2-interacting protein 1*) beschrieben, ein Protein das das humane Homolog zu ATBP50 darstellt, welches aus der Maus kloniert wurde. Auch ATIP1 wurde als AT2-Rezeptor-Bindeprotein beschrieben, welches die Aktivität des AT2-Rezeptors moduliert. Ein Mechanismus, mit dem ATIP1 diese Aufgabe erfüllt, wurde nicht beschrieben. Auch Nouet et al. beschrieben in ihrer Arbeit eine Familie von Proteinen, die jedoch vier Isoformen umfasst (Nouet et al., 2004). Es ist möglich, dass dieses zusätzliche Transkript nur im Menschen auftritt, nicht aber in der Maus.

4.1.2 Das ATBP-Gen

Um die genomische Organisation des ATBP-Gens zu untersuchen, wurden die ATBP-mRNA Sequenzen für eine Datenbanksuche in den Datenbanken von NCBI (*genomic BLAST*) verwendet. Es zeigte sich, dass das ATBP-Gen der Maus und des Menschen auf dem Chromosomen 8p21.3 lokalisiert ist. Das gesamte Gen umspannt eine Region von 90,5 kb mit 15 Exons sowie 14 Introns, die alle eine GT-AG Konsensussequenz zeigen.

In dieser chromosomalen Region wurde von Yakota et al. zwei verschiedene Tumorsuppressor Gene postuliert, da der Verlust dieser Region mit einem erhöhten Krebsrisiko einhergeht (Yakota et al., 1999).

Eine Analyse der Sequenzen, die sich in der Nähe der berechneten Translationsstarts befinden, zeigten für ATBP50 (5'-GAAGAGATGC) und ATBP135

(5'-TTCAGG**ATGA**), aber nicht für ATBP60 (5'-TTTTAA**ATGA**) eine Kozak-Sequenz (Kozak et al., 1989).

Das Auftreten von drei unterschiedlichen Transkripten weist auf einen Spleißprozess hin. Es ist jedoch noch nicht geklärt, ob die drei ATBP-Varianten durch Spleißen einer Prä-mRNA hervorgehen und somit eine Promotorregion aufweisen, oder ob sie jeweils eigene Transkriptionsstarts besitzen.

4.1.3 Die Expression von ATBP

Als wichtiger Hinweis auf die Bedeutung bzw. Funktion eines Proteins gilt die Konservierung der Protein-Sequenz innerhalb verschiedener Spezies bzw. das mRNA-Expressionsmuster in unterschiedlichen Geweben. Einige Beobachtungen deuten darauf hin, dass neben dem Menschen weitere Spezies ein hoch konserviertes ATBP-homologes Protein exprimieren. Mittels Datenbankrecherche konnte aus zahlreichen ESTs die Sequenz von ATBP50 aus Maus, Ratte, Mensch, Frosch und Fisch ermittelt und miteinander verglichen werden.

Sequenzen, die für die Funktion des Proteins unmittelbar wichtig sind, sind in stärkerem Masse evolutionär konserviert. Aus diesem Grund lassen sich aus den Proteinsequenzvergleichen Rückschlüsse auf Sequenzregionen schließen, die für die Funktion der Proteine eine Rolle spielen. In diesen Proteinsequenzvergleichen ist auffallend, dass die letzten 130 AS der Proteine nahezu identisch sind. Wie sich durch spätere Untersuchungen zeigte, ist diese Region für die Lokalisation der Proteine an den Golgi-Apparat verantwortlich. Zudem ist die *coiled-coil* Region, die zur Dimerisierung der Proteine beiträgt, stark konserviert. Variabler erscheint die N-terminale Region, die bei ATBP50 für Interaktion mit dem AT2-Rezeptor verantwortlich ist.

Hingegen wurde in Datenbanken, die Sequenzen von *Drosophila*, *A.thaliana* oder *C.elegans* beinhalten, kein Hinweis auf ATBP-homologe Proteine gefunden. Es scheint daher keine verwandten Proteine in diesen Organismen zu geben, und daher scheint die Vermutung nahe zu liegen, dass es sich bei den ATBP-Proteine um eine junge Familie von Proteinen handelt.

Die *Northern blot* Studien, die zur Untersuchung der Gewebsverteilung der ATBP-mRNA durchgeführt wurden, zeigten ein differenziertes Expressionsmuster. Nur im Muskelgewebe wurden alle drei Varianten der ATBP-mRNA gefunden. In Plazenta,

Niere sowie Leber wurde die mRNA von ATBP60 und ATBP135 detektiert. Im Herzen wurden nur die beiden kleineren Varianten ATBP50 und ATBP60 stark, im Gehirn und Lunge nur sehr schwach nachgewiesen. In Thymus, Testis und Milz wurde keine der ATBP-Varianten gefunden.

Um eine Funktion von ATBP50 im Zusammenhang mit dem AT₂-Rezeptor zu untersuchen, war ihre gemeinsame Gewebsverteilung ein wichtiges Kriterium. Der AT₂-Rezeptor wird wie ATBP50 stark im embryonalen Gewebe der Maus exprimiert. Während der Reifung zum adulten Tier wird die Expression des AT₂-Rezeptors auf das Gehirn, die Nebennieren, Nieren, die Ovarien, Uterus, das Gefäßendothel sowie das Herz reduziert (Unger T, 1999). Wird dieses Expressionsmuster mit dem der *Northern blot* Studie verglichen, ist eine Co-Expression im Gehirn, der Niere und dem Herzen zu finden. ATBP50 wird zudem im Muskel exprimiert, in dem der AT₂-Rezeptor in den Gefäßen exprimiert wird. Die Untersuchungen zur Co-Expression mittels *Northern blot* geben aber nur einen groben Überblick und müssen folglich auf Zellebene bestätigt werden. Dass die Expression von ATBP50 und des AT₂-Rezeptors nicht vollständig übereinstimmt, deutet darauf hin, dass ATBP50 noch weitere, AT₂-Rezeptor-unabhängige Funktionen hat.

Weiterhin lässt sich aus diesem Expressionsmuster die Schlussfolgerung ziehen, dass ATBP-Proteine wahrscheinlich keine Rolle in der Funktion von Zellen des Immunsystems haben, da sie weder in der Milz noch im Thymus exprimiert werden.

4.1.4 Die Struktur der ATBP-Proteine

Zur Charakterisierung eines neuen Proteins kann die theoretische Vorhersage von strukturellen Domänen, deren Funktion in anderen Proteinen beschrieben ist, wertvolle Hinweise auf mögliche Funktionen oder enzymatische Aktivitäten geben (Hurley et al., 2002).

Die ATBP-Proteine können in zwei Teile unterschieden werden: in eine N-terminale Kopfreion, die Isoform-spezifisch ist und eine *Random-coiled* Struktur aufweist, und in eine C-terminale Region, die bei allen Isoformen dieselbe Struktur aufweist und sich aufteilt in eine *coiled-coil* Region von ca. 360 AS und in ein 40 AS langes, unstrukturiertes, Prolin/Serin reiches Ende.

Die *coiled-coil*-Domäne ist bei vielen Proteinen beschrieben und dient zur Homo- bzw. Heterodimerisierung von Proteinen. Die durch die Sequenzvergleiche aufgestellte Hypothese der Dimerisierung konnte durch Co-Immunopräzipitation von

ATBP-Proteinen bestätigt werden. Durch die Fähigkeit der Homo- und Heterodimerisierung ergibt sich für die ATBP-Proteine die Möglichkeit, sechs verschiedene Dimere zu bilden, was die möglichen Funktionen stark erweitert.

In der Protein-Familien Datenbank *Pfam* (Bateman et al., 2002) wurde eine Homologie von der ATBP-Familie mit der HOOK-Protein Familie (CDD:pfam05483) gefunden. Die HOOK-Proteine wurden als Golgi-Bindeproteine beschrieben (Walenta et al., 2001) und stellten folglich einen Hinweis dar, der später experimentell bestätigt wurde.

4.1.5 Subzelluläre Lokalisation der ATBP-Proteine

Übereinstimmend mit unseren bioinformatischen Berechnungen konnte durch konfokale Mikroskopie eine subzelluläre Lokalisation der ATBP-Proteine am Golgi-Apparat nachgewiesen werden. Hierfür wurden die ATBP-Proteine gentechnisch mit grünen Fluoreszenzproteinen fusioniert und zusammen mit einem Golgi-Marker, der aus einem roten Fluoreszenz-Protein und einer Golgi-Lokalisationssequenz bestand, in COS-7 Zellen exprimiert. Eine Kolo-kalisation von ATBP50 und dem Golgi-Marker konnte durch eine digitale Überlagerung der konfokalen Bilder nachgewiesen werden. Seibold et al. haben eine Lokalisation des Proteins MTSG1, einem humanen Homolog zu ATBP50, in den Mitochondrien von Pankreas Tumorzellen gezeigt (Seibold et al., 2003). Dieser Befund steht im Gegensatz zu unseren Befunden und kann darauf hindeuten, dass ATBP50 in anderen Zelltypen als den von uns untersuchten neuronalen Zellen noch andere Funktionen erfüllt.

Da die ATBP-Proteine keine hydrophoben Regionen aufweisen, die als Membranverankerung dienen könnten, ist anzunehmen, dass diese Lokalisation mittels Interaktion mit Golgi-residierenden Proteinen hervorgerufen wird. Da die N-terminale Region die Interaktion mit dem AT2-Rezeptor hervorruft und die *coiled-coil*-Region zur Heterodimerisierung dient, konnte angenommen werden, dass die C-terminale Region der ATBP-Proteine zur Verankerung dient. Um diese Hypothese zu testen wurden ATBP-Mutanten kloniert, bei denen 40 AS des C-Terminus, die sich der *coiled-coil*-Region anschließen, deletiert wurden. Wurden die C-terminalen Deletionsmutanten in Zellen exprimiert, konnte eine diffuse Verteilung der Proteine in den Zellen festgestellt werden.

Obwohl die Translokation in den Zellkern ein von der Zelle hochregulierter Prozess ist, konnten die Deletionsmutanten auch im Zellkern nachgewiesen werden. Diese Translokation in den Zellkern könnte in der Apoptose von Zellen eine Rolle spielen. So ist z.B. das Golgi-residierende Protein p115 in der Apoptose ein Substrat für die Kaspasen 3 und 8. Wird p115 durch diese Kaspasen geschnitten, werden Fragmente des Proteins in den Zellkern transportiert und verstärken dort den Verlauf der Apoptose (Chiu et al. 2002).

4.2 ATBP50 - ein Interaktionspartner des AT2-Rezeptors

Der AT2-Rezeptor wird als Schlüsselrezeptor im kardiovaskulären System in vielerlei Hinsicht streng reguliert. Neben posttranslationalen Modifikationen spielen vor allem Protein-Protein-Interaktionen eine große Rolle. Mit Hilfe des *Yeast two Hybrid*-Systems wurde der intrazelluläre N-Terminus des AT2-Rezeptors als *Bait* eingesetzt und als potentieller Interaktionspartner ATBP50 identifiziert. In der vorliegenden Arbeit konnte verifiziert werden, dass die in der Hefe gefundene Bindung zwischen dem AT2-Rezeptor und ATBP50 tatsächlich in Säugerzellen stattfindet. Zunächst wurde die Interaktion zwischen dem AT2-Rezeptor und dem vollständig klonierten ATBP50 durch Co-Immunpräzipitation aus Lysaten ATBP50 und AT2-Rezeptor transfizierter COS-7 Zellen bestätigt. Diese Interaktion wurde offensichtlich über die N-terminale Domäne von ATBP50 vermittelt, da dessen Deletion die Co-Präzipitation verhinderte. Da in den Co-Präzipitationsexperimenten die korrekte Kompartimentierung außer Acht gelassen wurde, erfolgte mit Hilfe der Immunfluoreszenzmikroskopie die Untersuchung der subzellulären Verteilung von ATBP50 und dem AT2-Rezeptor in COS-7 Zellen. Mit der Co-Lokalisation der beiden Proteine in vesikelartigen Strukturen ist eine weitere Voraussetzung für eine *in-vivo*-Interaktion zwischen dem AT2-Rezeptor und ATBP50 erfüllt.

4.2.1 ATBP50 - ein Modulator der subzellulären Verteilung des AT2-Rezeptors

Es konnte für verschiedene GPCR gezeigt werden, dass ihre subzelluläre Verteilung mittels Adapterproteinen reguliert wird. Tatsächlich wurde der AT2-Rezeptor neben seiner typischen Lokalisation an der Plasmamembran, bereits am Golgi-Apparat und in zahlreichen weiteren Kompartimenten, wie dem Zellkern, detektiert. So wurde kürzlich ein AT2-Rezeptor-interagierendes Protein, der Transkriptionsfaktor *promyelocytic zinc finger protein* (PLZF) beschrieben, welches nach Überexpression

eine Translokation des AT2-Rezeptors von der Plasmamembran an perinukleäre Strukturen bewirkt (Senbonmatsu et al., 2003). Über die molekularen Mechanismen der (Trans-)Lokalisation ist jedoch bisher wenig bekannt. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass durch siRNA-induzierte Inhibition der Expression von ATBP50 die Lokalisation an die Plasmamembran des AT2-Rezeptors deutlich verringert wird.

Zusammenfassend lassen die bisherigen Ergebnisse vermuten, dass ATBP50 als *Carrier* des AT2-Rezeptors zwischen Endoplasmatischem Reticulum und Plasmamembran fungieren kann. Jedoch ist ebenfalls denkbar, dass ATBP50 der Verankerung in dem beschriebenen Kompartiment dient und aufgrund seiner Überexpression in den COS-7 Zellen eine Umverteilung des AT2-Rezeptors erzwungen wird. Des Weiteren stellt sich die Frage, ob die Bildung bzw. die Translokation des AT2-Rezeptor/ATBP50 Komplexes durch Stimulation des AT2-Rezeptors reguliert wird.

4.2.2 ATBP50 - ein Modulator der AT2-Rezeptor-Aktivität

Es stellte sich nun die Frage, ob neben der ATBP50-induzierten, subzellulären Umverteilung des AT2-Rezeptors auch dessen Aktivität durch ATBP50 beeinflusst wird. Mittels siRNA gegen die mRNA von ATBP50 konnte die endogene Expression von ATBP50 inhibiert werden. Diese Inhibition führte zu einer verminderten Lokalisation von ATBP50 an der Plasmamembran und zu einer reduzierten maximalen ERK-Inhibition durch AT2-Rezeptoraktivierung nach EGF-Rezeptor-Stimulation in der neuronalen Zelllinie N1E-115 Zellen. Dieses Ergebnis werden durch die Arbeiten von Seibold et al. und Nuoet et al. bestätigt. Auch die humanen Homologe von ATBP50, ATIP und MTSG1, werden als Zellproliferation hemmend beschrieben (Seibold et al. 2002; Nuoet et al. 2004).

Diese Befunde können zu einer Erklärung der funktionellen Zusammenhänge von AT2-Rezeptor und ATBP50 dienen. So kann die Inhibition des AT2-Rezeptors aus der reduzierten Expression des Rezeptors an der Plasmamembran herrühren, da zum einen der Rezeptor kein AngII aus dem Medium mehr binden kann. Zum anderen ist denkbar, ob die Rezeptordichte, die zu einer AngII unabhängigen Signalwirkung des AT2-Rezeptors nötig ist (Miura and Karnick, 2000), durch ATBP50-Inhibition nicht mehr erreicht wird.

Es ist aber auch möglich, dass die reduzierte Interaktion des AT₂-Rezeptors mit ATBP50 eine direkte Inhibition des Rezeptors zur Folge hat. Dies könnte auftreten, wenn ATBP50 eine Funktion als Adapterprotein für die Interaktion von AT₂-Rezeptor mit einem weiteren, noch nicht bekannten Protein einnimmt.

In diesem Zusammenhang ist interessant, dass das C-terminale Ende des AT₂-Rezeptors neben ATBP50 auch den Transkriptionsfaktor *promyelocytic zinc finger protein* (PLZF) bindet. Nach AngII-Stimulation des AT₂-Rezeptors co-lokalisiert PLZF mit dem Rezeptor an der Plasmamembran, und die Interaktionspartner werden nach Internalisation an den Zellkern translokiert. PLZF wird anschließend in den Zellkern aufgenommen und verändert die Gen-Expression der Zelle (Senbonmatsu et al., 2003). Eine Interaktion des AT₂-Rezeptors mit PLZF erfolgt erst nach AngII-Stimulation des Rezeptors, daher ist eine Wechselbeziehung mit PLZF und ATBP50 unwahrscheinlich.

4.2.3 ATBP50 - Physiologische Bedeutung und Ausblick

Wenn man bedenkt, dass der AT₂-Rezeptor ein wichtiger Bestandteil des Renin-Angiotensin Systems ist, so kommt einem Modulator dieses Rezeptors kardiovaskulär eine wichtige physiologische sowie pathophysiologische Rolle zu. Zudem ist für den AT₂-Rezeptor eine wichtige Rolle in der Entwicklung des Gehirns gezeigt worden (Vervoort et al., 2002), sodass auch hier eine Funktion für ATBP50 vermutet werden kann.

Da das Vorkommen von ATBP50 nicht streng auf AT₂-Rezeptor-exprimierende Gewebe begrenzt ist, kann postuliert werden, dass ATBP50 noch weitere Aufgaben in der Zelle erfüllt. Es ist möglich, dass ATBP50 via N-terminale Domäne auch andere Proteine als den AT₂-Rezeptor bindet und deren Translokation induziert. Die Funktion von ATBP60 und ATBP135 ist noch vollständig im Dunkeln. Der Einsatz des *Yeast Two-Hybrid* Systems mit Domänen der ATBP-Proteine als „Köderprotein“ könnte zur Identifizierung weiterer Interaktionspartner führen und den Anfang für neue spannende Projekte bilden.

5 Zusammenfassung

Entstehung und Reifung von G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCR) sind komplexe Geschehen, die einer aufwändigen Kombination von Prozessen wie Proteinfaltung, posttranslationale Modifikationen sowie den Transport zu bestimmten Zellkompartimenten bedürfen. Zurzeit ist über die Regulation des Transports von GPCR vom Endoplasmatischen Retikulum (ER) zur Plasmamembran nur verhältnismäßig wenig bekannt.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die zytoplasmatische C-terminale Domäne des AT2-Rezeptors (AT2R) unabhängig als ER-Exportsignal wirkt. Mittels *Yeast Two-Hybrid* System konnte ein Golgi-Membran-assoziiertes Protein als ein Bindeprotein dieses Motivs beschrieben werden, welches ATBP50 (*AT2R binding protein of 50 kDa*) genannt wurde. Zudem konnten ATBP60 and ATBP135 identifiziert und kloniert werden, zwei weitere Isoformen des Gens für ATBP50, welches auf dem Chromosomenabschnitt 8p21.3 lokalisiert ist.

Ferner konnte gezeigt werden, dass die Inhibition der Expression von ATBP50 mittels siRNA zur Retention des AT2-Rezeptors in Zellkompartimenten, verminderte AT2-Rezeptordichte auf der Plasmamembran und einen verminderten antiproliferativen Effekt des Rezeptors bewirkt.

Diese Daten zeigen, dass ATBP50 den Transport des AT2-Rezeptors zur Plasmamembran durch Interaktion mit der zytoplasmatischen C-terminalen Domäne des Rezeptors reguliert und dadurch den antiproliferativen Effekt des Rezeptors ermöglicht.

6 Summery

Synthesis and maturation of G protein-coupled receptors (GPCR) are complex events that require an intricate combination of processes that include protein folding, post-translational modifications, and transport through distinct cellular compartments. Little is known concerning the regulation of GPCR transport from the endoplasmic reticulum (ER) to the cell surface.

Data presented in this thesis show that the cytoplasmatic carboxy-terminal of the Angiotensin II type 2 receptor (AT2R) acts independently as an ER-export signal. Using a yeast two-hybrid system we identified a Golgi-membrane-associated protein termed ATBP50 (for AT2R binding protein of 50 kDa) that binds to this motif. We also cloned ATBP60 and ATBP135 encoded by the same gene that mapped to chromosomes 8p21.3.

Moreover downregulation of ATBP50 using siRNA leads to retention of AT2R in inner compartments, reduced cell surface expression, and decreased antiproliferative effects of the receptor.

These data indicate that ATBP50 regulates the transport of the AT2R to cell membrane by binding to a specific signal within its cytoplasmic carboxy-terminal and thereby enabling the antiproliferative effect of the receptor.

7 Literaturverzeichnis

- AbdAlla S, Lothar H, Quitterer U (2000) AT1-receptor heterodimers show enhanced G-protein activation and altered receptor sequestration. *Nature* 407, 94-8.
- AbdAlla S, Lothar H, el Massiery A, Quitterer U. (2001a) Increased AT(1) receptor heterodimers in preeclampsia mediate enhanced angiotensin II responsiveness. *Nat Med.* 9, 1003-9.
- AbdAlla S, Lothar H, Abdel-tawab AM, Quitterer U (2001b) The angiotensin II AT2 receptor is an AT1 receptor antagonist. *J Biol Chem* 276, 39721–39726.
- Abe J, Deguchi J, Matsumoto T, Takuwa N, Noda M, Ohno M, Makuuchi M, Kurokawa K, Takuwa Y. (1997) Stimulated activation of platelet-derived growth factor receptor in vivo in balloon-injured arteries: a link between angiotensin II and intimal thickening. *Circulation* 96, 1906-13.
- Ali MS, Sayeski PP, Dirksen LB, Hayzer DJ, Marrero MB, Bernstein KE. (1997) Dependence on the motif YIPP for the physical association of Jak2 kinase with the intracellular carboxyl tail of the angiotensin II AT1 receptor. *J Biol Chem.*, 272: 23382-8.
- Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. (1997) "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs." *Nucleic Acids Res.*, 25:3389-3402.
- Anderson RW. (1998) The caveolae membrane system. *Annu Rev Biochem* 67:199-225.
- Arshavsky VY, Dumke CL, Zhu Y., Artemyev NO, Skiba NP, Hamm HE and Bownds MD. (1994) Regulation of transducin GTPase activity in bovine rod outer segments. *J Biol Chem* 269: 19882-7.
- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD Smith JA, Seidman JG, Struhl K, Current Protocols in Molecular Biology. *Wiley and Sons. New York* 1987.
- Bateman A, Birney E, Cerruti L, Durbin R, Ewinger L, Eddy SR, Griffiths-Jones S, Howe KL, Marshall M, Sonnhammer EL (2002) The Pfam Protein Families Database. *Nucleic Acids Research*, 30: 276-280
- Benkirane M, Jin DY, Chun RF, Koup RA, Jeang KT. (1997) Mechanism of transdominant inhibition of CCR5-mediated HIV-1 infection by ccr5delta32. *J Biol Chem.*, 272: 30603-6.
- Berger EA, Murphy PM, Farber JM. (1999) Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease. *Annu. Rev. Immunol.* 17: 657-700.

Literaturverzeichnis

- Bermak JC, Li M, Bullock C, Zhou QY. (2001) Regulation of transport of the dopamine D1 receptor by a new membrane-associated ER protein. *Nature Cell Biol.*, 2: 492-8.
- Bermak JC, Li M, Bullock C, Weingarten P, Zhou Q-Y. (2002) Interaction of gamma-COP with a transport motif in the D1 receptor C-terminus. *Eur J Cell Biol.*, 81: 77-85.
- Berstein G, Blank JL, Jhon DY, Exton JH, Rhee SG, Ross EM. (1992) Phospholipase C-beta 1 is a GTPase-activating protein for Gq/11, its physiologic regulator. *Cell*, 70: 411-8.
- Bluml K, Schnepf W, Schroder S, Beyermann M, Macias M, Oschkinat H, Lohse M. (1997) A small region in phosphodiesterase 4 inhibits G-protein betagamma-subunit function. *Embo J*, 16: 4908-15.
- Bockaert J and Pin JP. (1999) Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *EMBO J.*, 18: 1723-9.
- Bockaert J, Marin P, Dumuis A, Fagni L. (2003) The 'magic tail' of G protein-coupled receptors: an anchorage for functional protein networks. *FEBS Lett.*, 546: 65-72.
- Brechler VP, Jones W, Levens NR, de Gasparo M, Bottari SP. (1993) Agonistic and antagonistic properties of angiotensin analogs at the AT2 receptor in PC12W cells. *Regul Pept.*, 44: 207-213
- Bumpus FM, Catt KJ, Chiu AT, de Gasparo M, Goodfriend T, Husain A, Peach JM, Taylor Jr. DG, Timmermans PB. (1991) Nomenclature for Angiotensin Receptors. A Report of the Nomenclature Committee of the Council for High Blood Pressure Research. *Hypertension*, 17: 720-721.
- Bünemann M, and Hosey MM. (1999) G-protein coupled receptor kinases as modulators of G-protein signalling. *J Physiol.*, 15. 5-23.
- Cao TT, Mays RW, Zastrow M, (1998) Regulated endocytosis of G-protein-coupled receptors by a biochemically and functionally distinct subpopulation of clathrin-coated pits. *J Biol Chem.*, 273: 24592-24602.
- Casey PJ. (1995) Mechanisms of protein prenylation and role in G protein function. *Biochem Soc Trans.*, 23: 161-6.
- Chiu R, Novikov L, Mukherjee S, Shields D. (2002) A caspase cleavage fragment of p115 induces fragmentation of the Golgi apparatus and apoptosis. *J Cell Biol.*, 159:637-48.
- Clapham DE. (1994) Direct G protein activation of ion channels. *Annu Rev Neurosci.*, 17: 441-64.

Literaturverzeichnis

- Conklin BR and Bourne HR. (1993) Structural elements of G alpha subunits that interact with G beta gamma, receptors, and effectors. *Cell*, 73: 631-41.
- Cornea A, Janovick, JA., Lin, X. & Conn, M. (1999) Simultaneous and independent visualization of the gonadotropin-releasing hormone receptor and its ligand: evidence for independent processing and recycling in living cells. *Endocrinology*, 140: 4272-4280.
- Daaka Y., Luttrell, L.M., Ann, S., Della Rocca, G.J., Ferguson, S.S., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J. (1998) Essential role for G protein-coupled receptor endocytosis in the activation of mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem*. 273: 685-8.
- Dale LB, Seachrist JL, Babwah AV, Ferguson SS. (2004) Regulation of angiotensin II type 1A receptor intracellular retention, degradation and recycling by Rab5, Rab7 and Rab11 GTPases. *J Biol Chem*. 279:13110-8.
- Daub H, Weiss FU, Wallasch C, Ullrich, A. (1996) Role of transactivation of the EGF receptor in signalling by G-protein-coupled receptors. *Nature*, 379: 557-60.
- Daub H, Wallasch C, Lankenau A, Herrlich A, Ullrich A. (1997) Signal characteristics of G protein-transactivated EGF receptor. *Embo J.*, 16: 7032-44.
- Dean MK, Higgs C, Smith RE, Bywater RP, Snell CR, Scott PD, Upton GJ, Howe TJ, Reynolds CA. (2001) Dimerization of G-protein-coupled receptors. *J Med Chem.*, 44: 4595-614.
- de Gasparo M, Catt KJ, Inagami T, Wright JW, Unger T. (2000) International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol Rev.*, 52: 415-72.
- Dennis, EA. (1997) The growing phospholipase A2 superfamily of signal transduction enzymes. *Trends Biochem Sci.*, 22: 1-2.
- De Vries L, Zheng B, Fischer T, Elenko E, Farquhar MG. (2000) The regulator of G-protein signaling family. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 40: 235-71.
- Dimmeler S, Rippmann V, Weiland U, Haendeler J, Zeiher AM (1997) Angiotensin II induces apoptosis of human endothelial cells: protective effect of nitric oxide. *Circ Res.*, 81:970-976.
- Dulin NO, Alexander LD, Harwalkar S, Falck JR, Douglas JG. (1998) Phospholipase A2-mediated activation of mitogen-activated protein kinase by angiotensin II. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 95:8098-102.
- Eguchi S, Dempsey PJ, Frank GD, Motley ED, Inagami T. (2001) Activation of MAPKs by angiotensin II in vascular smooth muscle cells. Metalloprotease-

Literaturverzeichnis

- dependent EGF receptor activation is required for activation of ERK and p38 MAPK but not for JNK. *J Biol Chem.*, 276: 7957-62.
- Feng YH, Noda K, Saad Y, Liu XP, Husain, A, Karnik SS. (1995) The docking of Arg2 of angiotensin II with Asp281 of AT1 receptor is essential for full agonism. *J Biol Chem.*, 70:12846-50.
- Feral C, Le Gall S, Leymarie P. (1995) Angiotensin II modulates steroidogenesis in granulosa and theca in the rabbit ovary: its possible involvement in atresia. *Eur J Endocrinol.* 133:747-53.
- Ferguson SS, Zhang J, Barak LS, Caron MG. (1998) Molecular mechanisms of G protein-coupled receptor desensitization and resensitization. *Life Sci.*, 1561-1565.
- Ferguson SS. (2001) Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling. *Pharmacol Rev.*, 53: 1-24.
- Fields S and Song O. (1989) A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature*, 340: 245-6.
- Gallinat S, Busche S, Schutze S, Kronke M, Unger T (1999) AT2 receptor stimulation induces generation of ceramides in PC12W cells. *FEBS Lett.*, 443(1):75-9.
- Gantz I, DelValle J, Wang LD, Tashiro T, Munzert G, Guo YJ, Konda Y, Yamada T. (1992) Molecular basis for the interaction of histamine with the histamine H2 receptor. *J Biol Chem.*, 267: 20840-3.
- Gavin AC et al. (2002) Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. *Nature*, 415:141-7.
- Garcia-Higuera I, Gaitatzes C, Smith TF, Neer EJ. (1998) Folding a WD repeat propeller. Role of highly conserved aspartic acid residues in the G protein beta subunit and Sec13. *J Biol Chem.*, 273: 9041-9.
- Gether U. (2000) Uncovering molecular mechanisms involved in activation of G protein-coupled receptors. *Endocr Rev.*, 21:90-113.
- Gluzman Y (1981) SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell*, 175-182.
- Goto M, Mukoyama M, Suga S, Matsumoto T, Nakagawa M, Ishibashi R, Kasahara M, Sugawara A, Tanaka I, Nakao K. (1997) Growth-dependent induction of angiotensin II type 2 receptor in rat mesangial cells. *Hypertension*, 30:358-62.
- Gouldson PR and Reynolds CA. (1997) Simulations on dimeric peptides: evidence for domain swapping in G- protein-coupled receptors. *Biochem Soc Trans*, 25:1066-71.

Literaturverzeichnis

- Hall R, Premont RT, Chow CW, Blitzer JT, Pitcher JA, Claing A, Stoffel RH, Barak, LS, Shenolikar S, Weinman EJ, Grinstein S. (1998) The β 2-adrenergic receptor interacts with the Na⁺/H⁺-exchanger regulatory factor to control Na⁺/H⁺ exchange. *Nature*, 392:626-630.
- Hamm HE. (1991) Molecular interactions between the photoreceptor G protein and rhodopsin. *Cell Mol Neurobiol.*, 11: 563-78.
- Hamm HE. (1998) The many faces of G protein signaling. *J Biol Chem.*, 273: 669-72.
- Heerding JN, Yee DK, Jacobs SL, Fluharty SJ. (1997) Mutational analysis of the angiotensin II type 2 receptor: contribution of conserved extracellular amino acids. *Regul Pept.*, 72: 97-103.
- Hein L, Barsk GS, Pratt RE, Dzau VJ, Kobilka BK (1995) Behavioral and cardiovascular effects of disruption the angiotensin II type-2 receptor gene in mice. *Nature*, 377:744-747
- Hein L, Meinel L, Pratt RE, Dzau VJ, Kobilka BK (1997) Intracellular trafficking of angiotensin II and its AT1 and AT2 receptors: evidence for selective sorting of receptor and ligand. *Mol Endocrinol.*, 11:1266-77
- Hepler JR. and Gilman AG. (1992) G proteins. *Trends Biochem Sci*, 17: 383-7.
- Hébert TE and Bouvier M. (1998) Structural and functional aspects of G protein-coupled receptor oligomerization. *Biochem Cell Biol.*, 76: 1-11.
- Horiuchi M, Akishita M, Dzau VJ. (1998) Molecular and cellular mechanism of angiotensin II-mediated apoptosis. *Endocr Res.*, 24: 307-14.
- Horn F, Weare J, Beukers MW, Hörsch S, Bairoch A, Chen W, Edvardsen Ø, Campagne F, Vriend G. (1998) GPCRDB: an information system for G protein-coupled receptors. *Nucleic Acids Res.*, 26: 277-281.
- Hughes J, Smith TW, Kosterlitz HW, Fothergill, L. A., Morgan, B. A. und Morris, H. R. (1975) Identification of two related pentapeptides from the brain with potent opiate agonist activity. *Nature*, 258: 577-80.
- Hurley JH, Anderson DE, Beach B, Canagarajah B, Ho YS, Jones E, Miller G, Misra S, Pearson M, Saidi L, Suer S, Trievel R, Tsujishita Y. (2002) Structural genomics and signaling domains. *Trends Biochem Sci.*, 27:48-53.
- Hjorth SA, Schambye HT, Greenlee WJ, Schwartz TW. (1994) Identification of peptide binding residues in the extracellular domains of the AT1 receptor. *J Biol Chem.*, 269: 30953-9.

Literaturverzeichnis

- Ichiki T, Labosky PA, Shiota C, Okuyama S, Imagawa Y, Fogo A, Niimura F, Ichikawa I, Hogan BLM, Inagami T (1995) Effects on blood pressure and reduced exploratory behavior in mice lacking angiotensin II type 2 receptor. *Nature*, 377:748-750.
- Inglese J, Koch WJ, Touhara K, Lefkowitz RJ. (1995) G beta gamma interactions with PH domains and Ras-MAPK signaling pathways. *Trends Biochem Sci.*, 20: 151-6.
- Iniguez-Lluhi JA, Simon MI, Robishaw JD, Gilman AG. (1992) G protein beta gamma subunits synthesized in Sf9 cells. Functional characterization and the significance of prenylation of gamma. *J Biol Chem.*, 267: 23409-17.
- Iyengar R. (1993) Molecular and functional diversity of mammalian Gs-stimulated adenylyl cyclases. *Faseb J.*, 7: 768-75.
- Jones KA, Borowsky B, Tamm JA, Craig DA, Durkin MM, Dai M, Yao, W, Johnson M, Gunwaldsen C, Huang LY, Tang C, Shen Q, Salon JA, Morse K, Laz T, Smith KE, Nagarathnam D, Noble SA, Branchek TA, Gerald C. (1998) GABA(B) receptors function as a heteromeric assembly of the subunits GABA(B)R1 and GABA(B)R2. *Nature*, 396: 674-9.
- Jordan BA and Devi LA. (1999) G-protein-coupled receptor heterodimerization modulates receptor function. *Nature*, 399: 697-700.
- Kai H, Alexander RW, Ushio-Fukai M, Lyons PR, Akers M, Griendling KK (1998) G-Protein binding domains of the angiotensin II AT1A receptors mapped with synthetic peptides selected from the receptor sequence. *Biochem J.*, 332, 781-7.
- Kang J, Posner P, Sumners C (1994) Angiotensin II type 2 receptor stimulation of neuronal K⁺ currents involves an inhibitory GTP binding protein. *Am J Physiol.*, 267:C1389-97
- Kaschina E, and Unger T. (2003) Angiotensin AT1/AT2 receptors: regulation, signalling and function. *Blood Press.*, 12: 70-88.
- Kaupmann K, Malitschek B, Schuler V, Heid J, Froestl W, Beck P, Mosbacher J, Bischoff S, Kulik A, Shigemoto R, Karschin A, Bettler B. (1998) GABA(B)-receptor subtypes assemble into functional heteromeric complexes. *Nature*, 396: 683-7.
- Knall C and Johnson GL. (1998) G-protein regulatory pathways: rocketing into the twenty-first century. *J Cell Biochem Suppl.*, 31: 137-46.
- Kobilka B. (1992) Adrenergic receptors as models for G protein-coupled receptors. *Annu Rev Neurosci.*, 15: 87-114.

Literaturverzeichnis

- Koike G, Horiuchi M, Yamada T, Szpirer C, Jacob HJ, Dzau VJ. (1994) Human type 2 angiotensin II receptor gene: cloned, mapped to the X chromosome, and its mRNA is expressed in the human lung. *Biochem Biophys Res Commun.*, 203: 1842-1850
- Kudoh S, Komuro I, Mizuno T, Yamazaki T, Zou Y, Shiojima I, Takekoshi N, Yazaki Y. (1997) Angiotensin II stimulates c-Jun NH2-terminal kinase in cultured cardiac myocytes of neonatal rats. *Circ Res.*, 80: 139-46.
- Kuida TS, Zheng Na S. (1996) Decreased apoptosis in the brain and premature lethality in CPP32deficient mice. *Nature* 384: 368-372.
- Kuner R, Kohr G, Grunewald S, Eisenhardt G, Bach A, Kornau HC. (1999) Role of heteromer formation in GABAB receptor function. *Science*, 283: 74-7.
- Kyte J, Doolittle RF. (1982) A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol.* 157: 105-32.
- Laflamme L, de Gasparo M, Gallo JM, Payet MD, Gallopayet N (1996) Angiotensin II induction of neurite outgrowth by AT₂ receptors in NG108-15 cells - effect counteracted by the AT₁ receptors. *J Biol Chem.*, 271:22729-22735.
- Lander ES et al. (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, 409:860-921.
- Lehtonen JY, Horiuchi M, Daviet L, Akishita M, Dzau VJ (1999) Activation of the de novo biosynthesis of sphingolipids mediates angiotensin II type 2 receptor-induced apoptosis. *J Biol Chem.*, 274(24):16901-6.
- Leong SR, Kabako RC, Hébert CA. (1994) Complete mutagenesis of the extracellular domain of interleukin-8 (IL- 8) type A receptor identifies charged residues mediating IL-8 binding and signal transduction. *J Biol Chem.*, 269: 19343-8.
- Linder ME, Kleuss C, Mumby SM. (1995) Palmitoylation of G-protein alpha subunits. *Methods Enzymol.*, 250: 314-30.
- Linseman DA, Benjamin CW, Jones DA. (1995) Convergence of angiotensin II and platelet-derived growth factor receptor signaling cascades in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem.*, 270: 12563-8.
- Lokuta AJ, Cooper C, Gaa ST, Wang HE, Rogers TB. (1994) Angiotensin II stimulates the release of phospholipid-derived second messengers through multiple receptor subtypes in heart cells. *J Biol Chem.*, 269: 4832-8.
- Luban J, Goff SP. (1995) The yeast two-hybrid system for studying protein-protein interactions. *Curr Opin Biotechnol.* 6:59-64

Literaturverzeichnis

- Lupas A, Van Dyke M, Stock J. (1991) Predicting coiled coils from protein sequences. *Science*, 252: 1162-4.
- Lupas A. (1996) Prediction and analysis of coiled-coil structures. *Methods Enzymol.* 266:513-25.
- Luttrell LM, Della Rocca GJ, van Biesen, T, Luttrell DK, Lefkowitz RJ. (1997) Gbetagamma subunits mediate Src-dependent phosphorylation of the epidermal growth factor receptor. A scaffold for G protein-coupled receptor-mediated Ras activation. *J Biol Chem.*, 272: 4637-44.
- Luttrell L. (1999) Regulation of tyrosine kinase cascades by G-protein-coupled receptors. *Curr Opin Cell Biol.*, 11:177-183.
- Luttrell LM, Roudabush FL, Choy EW, Miller WE, Field ME, Pierce KL, Lefkowitz RJ. (2001) Activation and targeting of extracellular signal-regulated kinases by beta-arrestin scaffolds. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98: 2449-54.
- Luttrell LM, Lefkowitz RJ. (2002) The role of beta-arrestins in the termination and transduction of G-protein-coupled receptor signals. *J Cell Sci.*, 115: 455-65.
- Malapert MH, Guizouarn B, Fievet R, Jahns F, Garcia-Romeu R, Motais F, Borgese F (1997) Regulation of Na⁺/H⁺ antiporter in trout red blood cells. *J Exp Biol.*, 200: 353-560.
- Mansour A, Meng F, Meador-Woodru JH, Taylor LP, Civelli O, Akil H. (1992) Site-directed mutagenesis of the human dopamine D2 receptor. *Eur J Pharmacol.*, 227: 205-14.
- Margeta-Mitrovic M, Jan Y-N, Jan LY. (2000) A trafficking checkpoint controls GABAB receptor heterodimerization. *Neuron*, 27: 97-106.
- Marrero MB, Schieffer B, Paxton WG, Heerdt L, Berk BC, Delafontaine P, Bernstein KE. (1995) Direct stimulation of Jak/STAT pathway by the angiotensin II AT1 receptor. *Nature*, 375: 247-250.
- Martin MM, Su B, Elton TS. (1996) Molecular cloning of the human AT2 receptor. *Adv Exp Med Biol.*, 396: 153-65.
- Matsubara H (1998) Pathophysiological role of angiotensin II type 2 receptor in cardiovascular and renal diseases. *Circ Res.*, 83(12):1182-91
- McDonald PH, Chow CW, Miller WE, Laporte SA, Field ME, Lin FT, Davis RJ, and Lefkowitz RJ. (2000) Beta-arrestin 2: a receptor-regulated MAPK scaffold for the activation of JNK3. *Science*, 290: 1574-7.
- Meffert S, Stoll M, Steckelings UM, Bottari SP, Unger T (1996) The angiotensin AT₂ receptor inhibits proliferation and promotes differentiation in PC12W cells. *Mol Cell Endocrinol.*, 122:59-67

Literaturverzeichnis

- Milligan G, Ramsay D, Pascal G, Carrillo JJ. (2003) GPCR dimerisation. *Life Sci.*, 5: 181-188.
- Miura S and Karnik SS (2000) Ligand-independent signals from angiotensin II type 2 receptor induce apoptosis. *EMBO J.*, 19:4026-4035.
- Morris AJ and Malbon CC. (1999) Physiological regulation of G protein-linked signaling. *Physiol Rev.*, 79: 1373-430.
- Mumby SM and Linder ME. (1994) Myristoylation of G-protein alpha subunits. *Methods Enzymol.*, 237: 254-68.
- Mukoyama M, Nakajima M, Horiuchi M, Sasamura H, Pratt RE, Dzau VJ. (1993) Expression cloning of type 2 angiotensin II receptor reveals a unique class of seven-transmembrane receptors. *J Biol Chem.*, 268:24539-42.
- Munzenmaier DH und Greene AS. (1996) Opposing actions of angiotensin II on microvascular growth and arterial blood pressure. *Hypertension*, 27: 760-5.
- Nahmias C, Cazaubon SM, Briend-Sutren MM, Lazard D, Villageois P, Strosberg AD. (1995) Angiotensin II AT2 receptors are functionally coupled to protein tyrosine dephosphorylation in N1E-115 neuroblastoma cells. *Biochem J.*, 306: 87-92.
- Neer EJ and Clapham DE. (1988) Roles of G protein subunits in transmembrane signalling. *Nature*, 333: 129-34.
- Nouet S and Nahmias C (2000) Signal transduction from the angiotensin II AT2 receptor. *Trends Endocrinol Metab.*, 11:1-6.
- Nouet S, Amzallag N, Li JM, Louis S, Seitz I, Cui TX, Alleaume AM, Di Benedetto M, Boden C, Masson M, Strosberg AD, Horiuchi M, Couraud PO, Nahmias C. (2004) Trans-inactivation of receptor tyrosine kinases by novel angiotensin II AT2 receptor-interacting protein, ATIP. *J Biol Chem.*, 9;279:28989-97.
- Oakley RH, Laporte SA, Holt JA, Barak LS, Caron MG (1999) Association of β -arrestin with G protein-coupled receptors during clathrin-mediated endocytosis dictates the profile of receptor resensitization. *J Biol Chem.*, 274: 32248-32257.
- Ohkubo N, Matsubara H, Nozawa Y, Mori Y, Murasawa S, Kijima K, Maruyama K, Masaki H, Tsutumi Y, Shibasaki Y, Iwasaka T, Inada M. (1997) Angiotensin Type 2 Receptors Are Reexpressed by Cardiac Fibroblasts From Failing Myopathic Hamster Hearts and Inhibit Cell Growth and Fibrillar Collagen Metabolism. *Circulation*, 96: 3954-3962.
- O'Shea EK, Rutkowski R, Kim PS. (1989) Evidence that the leucine zipper is a coiled coil. *Science*, 243: 538-42

Literaturverzeichnis

- Pagano A, Rovelli G, Mosbacher J, Lohmann T, Duthey B, Stauffer D, Ristig D, Schuler V, Meigel I, Lampert C, Stein T, Prézeau L, Blahos J, Pin JP, Froestl W, Kuhn R, Heid J, Kaupmann K, Bettler B. (2001) C-terminal interaction is essential for surface trafficking but not for heteromeric assembly of GABAB receptors. *J. Neurosci.*, 21: 1189-1202.
- Pals DT, Masucci FD, Denning GS Jr, Sipos F and Fessler DC. (1971) Role of the pressor action of angiotensin II in experimental hypertension. *Circ Res.*, 29, 673-81.
- Pucell AG, Bumpus FM, Husain A. (1987) Rat ovarian angiotensin II receptors. Characterization and coupling to estrogen secretion. *J Biol Chem.*, 262: 7076-80.
- Pucell AG, Hodges JC, Sen I, Bumpus FM, Husain A. (1991) Biochemical properties of the ovarian granulosa cell type 2-angiotensin II receptor. *Endocrinology*, 128: 1947-59.
- Rao GN, Delafontaine P, Runge MS. (1995) Thrombin stimulates phosphorylation of insulin-like growth factor-1 receptor, insulin receptor substrate-1, and phospholipase C-gamma 1 in rat aortic smooth muscle cells. *J Biol Chem.*, 270: 27871-5.
- Rattner A, Sun H, Nathans J. (1999) Molecular genetics of human retinal disease. *Annu. Rev. Genet.*, 33: 89-131.
- Rhee SG and Choi KD. (1992) Multiple forms of phospholipase C isozymes and their activation mechanisms. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res.*, 26: 35-61.
- Reinecke K, Lucius R, Reinecke A, Rickert U, Herdegen T, Unger T. (2003) Angiotensin II accelerates functional recovery in the rat sciatic nerve in vivo: role of the AT2 receptor and the transcription factor NF-kappaB. *FASEB J.*, 17: 2094-6.
- Richelson E (1973) Regulation of tyrosine hydroxylase activity in mouse neuroblastoma clone N1E-115. *J Neurochem.*, 21: 1139-1145.
- Roche KW, Tu JC, Petralia RS, Xiao B, Wenthold RJ, Worley PF. (1999) Homer 1b regulates the trafficking of group I metabotropic glutamate receptors. *J Biol Chem.*, 274: 5953-7.
- Rockman HA, Koch WJ, Lefkowitz RJ. (2002) Seven transmembrane-spanning receptors and heart function, *Nature*, 415: 206-212.
- Rodriguez-Frade JM, Vila-Coro AJ, de Ana AM, Albar JP, Martinez AC, Mellado M. (1999) The chemokine monocyte chemoattractant protein-1 induces functional responses through dimerization of its receptor CCR2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96: 3628-33.

Literaturverzeichnis

- Rohrer SP, Birzin ET, Mosley RT, Berk SC, Hutchins SM, Shen DM, Xiong Y, Hayes EC, Parmar RM, Foor F, Mitra SW, Degrado SJ, Shu M, Klopp JM, Cai SJ, Blake A, Chan WW, Pasternak A, Yang L, Patchett AA, Smith RG, Chapman KT, Schaeffer JM. (1998) Rapid identification of subtype-selective agonists of the somatostatin receptor through combinatorial chemistry. *Science*, 282: 737-40.
- Roettger BF, Rentsch RU, Pinon D, Holicky E, Hadac E, Larkin JM, Miller LJ. (1995) Dual pathways of internalization of the cholecystokinin receptor. *J Cell Biol*, 1995. 128: 1029-1041.
- Rosenstiel P, Gallinat S, Arlt A, Unger T, Sievers J, Lucius R. (2002) Angiotensin AT2 receptor ligands: do they have potential as future treatments for neurological disease? *CNS Drugs.*, 16: 145-53.
- Sakmar TP. (1998) Rhodopsin: a prototypical G protein-coupled receptor. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.*, 59: 1-34.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2 Auflage.
- Sano T, Ohyama K, Yamano Y, Nakagomi Y, Nakazawa S, Kikyo M, Shirai H, Blank JS, Exton JH, Inagami T.J (1997) A domain for G protein coupling in carboxyl-terminal tail of rat angiotensin II receptor type 1A. *Biol Chem.*, 272; 23631-6.
- Sautel M and Milligan G. (2000) Molecular manipulation of G-proteincoupled receptors: a new avenue into drug discovery, *Curr Med Chem.*, 7, 889-896.
- Savarese TM and Fraser CM. (1992) In vitro mutagenesis and the search for structure-function relationships among G protein-coupled receptors. *Biochem J*, 283: 1-19.
- Schöneberg T, Schulz A, Gudermann T. (2002) The structural basis of G-protein-coupled receptor function and dysfunction in human diseases. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.*, 144: 143-227.
- Schwalbe H and Wess G. (2002) Dissecting G-protein-coupled receptors: structure, function, and ligand interaction. *Chembiochem.*, 3, 915-919.
- Schwartz TW, Gether U, Schambye HT, Hjorth SA. (1995) Molecular mechanism of action of non-peptide ligands for peptide receptors. *Curr Pharm Design.*, 1: 325-42.
- Schwartz TW and Rosenkilde MM. (1996) Is there a 'lock' for all agonist 'keys' in 7TM receptors? *Trends Pharmacol Sci.*, 17: 213-6.

Literaturverzeichnis

- Seachrist JL, Laporte SA, Dale LB, Babwah AV, Caron MG, Anborgh PH, and Ferguson SS. (2002) Rab5 association with the angiotensin II type 1A receptor promotes Rab5 GTP binding and vesicular fusion. *J Biol Chem.*, 277: 679-85.
- Seachrist JL and Ferguson SS. (2003) Regulation of G protein-coupled receptor endocytosis and trafficking by Rab GTPases. *Life Sci.*, 74: 225-35.
- Seibold S, Rudroff C, Weber M, Galle J, Wanner C, Marx M. (2003) Identification of a new tumor suppressor gene located at chromosome 8p21.3-22. *FASEB J.*, 17: 1180-2.
- Seifert R and Wenzel-Seifert K. (2002) Constitutive activity of G-protein-coupled receptors: cause of disease and common property of wild-type receptors, *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, 366: 381-416.
- Senbonmatsu T, Ichihara S, Price E Jr., Gaffney FA, Inagami T. (2000) Evidence for Angiotensin II Type 2 Receptor-mediated Cardiac Myocyte Enlargement During In Vivo Pressure Overload. *J Clin Invest*, 106: 25-29.
- Sexton PM, Albiston A, Morfis M, Tilakaratne N. (2001) Receptor activity modifying proteins. *Cell Signal.*, 13: 73-83.
- Shanmugam S, Sandberg K (1996) Ontogeny of angiotensin II receptors. *Cell Biol Int.*, 20(3):169-76
- Shenoy SK, McDonald PH, Kohout TA, Lefkowitz RJ. (2001) Regulation of receptor fate by ubiquitination of activated β 2-adrenergic receptor and β -arrestin. *Science*, 294: 1307-1313.
- Shirai H, Takahashi K, Katada T, Inagami T. (1995) Mapping of G protein coupling sites of the angiotensin II type 1 receptor. *Hypertension*, 25: 726-30.
- Siragy HM, Carey RM (2001) Angiotensin type 2 receptors: potential importance in the regulation of blood pressure. *Curr Opin Nephrol Hypertens.*, 10: 99-103
- Stoll M, Steckelings UM, Paul M, Bottari SP, Metzger R, Unger T (1995) The angiotensin AT₂-receptor mediates inhibition of cell proliferation in coronary endothelial cells. *J Clin Invest* 95:651-657.
- Stoll M and Unger T (2001) Angiotensin and its AT₂ receptor: new insights into an old system. *Regul Pept.*, 99:175-82.
- Stous GJ and Govers R. (1999) The ubiquitin-proteasome system and endocytosis. *J Cell Sci.*, 112: 1417-1423.
- Strader CD, Fong TM, Graziano MP, Tota MR. (1995) The family of G-protein-coupled receptors. *FASEB J.*, 9: 745-54.

Literaturverzeichnis

- Stroth U, Blume A, Mielke K, Unger T. (2000) Angiotensin AT(2) receptor stimulates ERK1 and ERK2 in quiescent but inhibits ERK in NGF-stimulated PC12W cells. *Brain Res Mol Brain Res.*, 78: 175-80.
- Thomas WG, Qian H. Arresting angiotensin type 1 receptors. (2003) *Trends Endocrinol Metab.*, 14: 130-6.
- Timmermans PB, Wong PC, Chiu AT, Herblin WF, Benfield P, Carini DJ, Lee RJ, Wexler RR, Saye JA, Smith RD. (1993) Angiotensin II receptors and angiotensin II receptor antagonists. *Pharmacol Rev.* 45: 205-51.
- Tohgo A, Pierce KL, Choy EW, Lefkowitz RJ, and Luttrell LM (2002) β -Arrestin Scaffolding of the ERK Cascade Enhances Cytosolic ERK Activity but Inhibits ERK-mediated Transcription following Angiotensin AT1a Receptor Stimulation *J Biol Chem.*, 277: 9429-9436.
- Touyz RM, He G, El Mabrouk M, Diep Q, Mardigyan V, Schiffrin EL. (2001) Differential activation of extracellular signal-regulated protein kinase 1/2 and p38 mitogen activated-protein kinase by AT1 receptors in vascular smooth muscle cells from Wistar-Kyoto rats and spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens.*, 19: 553-9.
- Tripet B, Wagschal K, Lavigne P, Mant CT, Hodges RS. (2000) Effects of side-chain characteristics on stability and oligomerization state of a de novo-designed model coiled-coil: 20 amino acid substitutions in position "d". *J Mol Biol.* 300: 377-402.
- Tsai W, Morielli, A. D. und Peralta, E. G. (1997) The m1 muscarinic acetylcholine receptor transactivates the EGF receptor to modulate ion channel activity. *Embo J.*, 16: 4597-605.
- Tsutsumi Y, Matsubara H, Ohkubo N, Mori Y, Nozawa Y, Murasawa S, Kijima K, Maruyama K, Masaki H, Moriguchi Y, Shibasaki Y, Kamihata H, Inada M, Iwasaka T. (1998) Angiotensin II Type 2 Receptor Is Upregulated in Human Heart With Interstitial Fibrosis, and Cardiac Fibroblasts are the Major Cell Type for Its Expression. *Circulation Research*, 83: 1035-1046.
- Tsuzuki S, Eguchi S, Inagami T. (1996) Inhibition of cell proliferation and activation of protein tyrosine phosphatase mediated by angiotensin II type 2 (AT2) receptor in R3T3 cells. *Biochem Biophys Res Commun.*, 228: 825-30.
- Tu JC, Xiao B, Naisbitt S, Yuan JP, Petralia RS, Brakeman P, Doan A, Aakalu VK, Lanahan AA, Sheng M, Worley PF. (1999) Coupling of mGluR/Homer and PSD-95 complexes by the Shank family of postsynaptic density proteins. *Neuron*, 23: 583-592.
- Turcatti G, Zoffmann S, Lowe JA 3rd, Drozda SE, Chassaing G, Schwartz TW, Chollet A. (1997) Characterization of non-peptide antagonist and peptide agonist binding sites of the NK1 receptor with fluorescent ligands. *J Biol Chem.*, 272: 21167-75.

Literaturverzeichnis

- Unger T, Chung O, Csikos T, Culman J, Galliant S, Gohlke P, Hohle S, Meffert S, Stoll M, Stroth U, Zhu YZ. (1996) Angiotensin Receptors, *Journal of Hypertension*, 14: 95-103.
- Unger T (1999) The angiotensin type 2 receptor: Variations on an enigmatic theme. *J Hypertens.*, 17:1775-1786
- Unger T (2002) The role of the renin-angiotensin system in the development of cardiovascular disease. *Am J Cardiol.*, 89: 3A-9A
- Van Corven EJ, Hordijk PL, Medema RH, Bos JL, Moolenaar WH. (1993) Pertussis toxin-sensitive activation of p21ras by G protein-coupled receptor agonists in fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90: 1257-61.
- Van Crielinge W and Beyaert R. (1999) Yeast Two-Hybrid: State of the Art. *Biol Proced Online*. 2: 1-38.
- Vanhaesebroeck B, Leervers, SJ, Panayotou G, Waterfield MD. (1997) Phosphoinositide 3-kinases: a conserved family of signal transducers. *Trends Biochem Sci.*, 22: 267-72.
- Venema RC, Ju H, Venema VJ, Schieffer B, Harp JB, Ling BN, Eaton DC, Marrero MB. (1998) Angiotensin II-induced association of phospholipase Cgamma1 with the G-protein-coupled AT1 receptor. *J Biol Chem.*, 273: 7703-8.
- Vervoort VS, Beachem MA, Edwards PS, Ladd S, Miller KE, de Mollerat X, Clarkson K, DuPont B, Schwartz CE, Stevenson RE, Boyd E, Srivastava AK. (2002) AGTR2 mutations in X-linked mental retardation. *Science*, 296:2401-3.
- Walenta JH, Didier AJ, Liu X, Kramer H (2001) The Golgi-associated hook3 protein is a member of a novel family of microtubule-binding proteins. *J Cell Biol.*, 152: 923-34
- Wang CD, Gallaher TK, Shih JC. (1993) Site-directed mutagenesis of the serotonin 5-hydroxytryptamine2 receptor identification of amino acids necessary for ligand binding and receptor activation. *Mol Pharmacol*, 43: 931-40.
- Wharton J, Morgan K, Rutherford RA, Catravas JD, Chester A, Whitehead BF, De Leval MR, Yacoub MH, Polak JM. (1998) Differential Distribution of Angiotensin AT2 Receptors in the Normal and Failing Human Heart, *J Pharm ExperThera.*, 284: 323-336.
- White JH, Wise A, Main MJ, Green A, Fraser NJ, Disney GH, Barnes AA, Emson P, Foord SM, Marshall FH. (1998) Heterodimerization is required for the formation of a functional GABA(B) receptor. *Nature*, 396: 679-82.

Literaturverzeichnis

- Wilkie TM, Gilbert DJ, Olsen AS, Chen XN, Amatruda TT, Korenberg JR, Trask BJ, de Jong P, Reed RR, Simon MI, et al. (1992) Evolution of the mammalian G protein alpha subunit multigene family. *Nat Genet*, 1: 85-91.
- Xie YW, Shen W, Zhao G, Xu X, Wolin MS, Hintze TH (1996) Role of endothelium-derived nitric oxide in the modulation of canine myocardial mitochondrial respiration in vitro. Implications for the development of heart failure. *Circ Res.*, 79: 381-7.
- Yamada T, Horiuchi M, Dzau VJ. (1996) Angiotensin II type 2 receptor mediates programmed cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93: 156-60.
- Yamada H, Akishita M, Lto M, Tamura K, David L, Lehtonen JYA, Dzau VJ, Horiuchi M (1999) AT2 receptor and vascular smooth muscle cell differentiation in vascular development. *Hypertension*, 33:1414-1419.
- Yokota T, Yoshimoto M, Akiyama F, Sakamoto G, Kasumi F, Nakamura Y, Emi M. (1999) Localization of a tumor suppressor gene associated with the progression of human breast carcinoma within a 1-cM interval of 8p22-p23.1. *Cancer*, 85: 447-452.
- Yoshimura Y, Karube M, Aoki H, Oda T, Koyama N, Nagai A, Akimoto Y, Hirano H, Nakamura Y. (1996) Angiotensin II induces ovulation and oocyte maturation in rabbit ovaries via the AT2 receptor subtype. *Endocrinology*, 137: 1204-11.
- Zoffmann S, Gether U, Schwartz TW. (1993) Conserved HisVI-17 of the NK-1 receptor is involved in binding of non- peptide antagonists but not substance P. *FEBS Lett*, 336: 506-10.
- Zhu M, Gelband CH, Moore JM, Posner P, Sumners C (1998) Angiotensin II type 2 receptor stimulation of neuronal delayed-rectifier potassium current involves phospholipase A₂ and arachidonic acid. *J Neurosci.*, 18:679-686
- Zhu YZ, Chimon GN, Zhu YC, Lu Q, Li B, Hu HZ, Yap EH, Lee HS, Wong PT. (2000) Expression of angiotensin II AT2 receptor in the acute phase of stroke in rats. *Neuroreport.*, 11: 1191-1194.

8 Abbildungsverzeichnis

| | | |
|-----------|---|-------|
| Abb. 1.1 | Zusammenfassung der AT2-vermittelten Signalwege und Effekte des AngII | S. 23 |
| Abb. 1.2 | Skizze der Mechanismen des <i>Yeast two-hybrid</i> Systems | S. 25 |
| Abb 2.1 | Copräzipitation von ATBP50 und AT2-Rezeptor aus Zelllysaten | S. 44 |
| Abb. 2.2 | Nachweis von ATBP-mRNA durch <i>Northern blot</i> | S. 45 |
| Abb. 2.3 | Alignment der ATBP-Proteine | S. 46 |
| Abb. 2.4 | Multicoil-Plot der 169 AS der C-terminalen Region der ATBP-Proteine | S. 47 |
| Abb. 2.5 | Die C-terminale Trunkierung von ATBP50 führt zum Verlust der Golgi-Lokalisation | S. 49 |
| Abb. 2.6 | CLUSTAL W <i>alignment</i> mit den Proteinsequenzen von ATBP50 | S.52 |
| Abb. 2.7 | A: Skizze der genomische Organisation des ATBP-Gens, B: Strukturelle Organisation der ATBP-Proteine | S. 53 |
| Abb. 2.8 | Lokalisation von AT2-Rezeptor und ATBP50 | S. 54 |
| Abb. 2.9 | Veränderung der Lokalisation des AT2-Rezeptors nach Transfektion von siRNA gegen die mRNA von ATBP50 | S. 55 |
| Abb. 2.10 | Zelloberflächen-ELISA mit Flag-tagged AT2-Rezeptor mit und ohne siRNA gegen die mRNA von ATBP50 sowie einer AT2-Rezeptor-Mutante ohne C-terminales Ende | S. 56 |
| Abb. 2.11 | Einfluss von siRNA gegen die mRNA von ATBP50 auf die antiproliferative Wirkung von AT2-Rezeptor-Stimulation | S. 58 |

9 Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-----------------------|---|
| cAMP..... | zyklisches AMP |
| Abb..... | Abbildung |
| ACE..... | ‚angiotensin converting enzyme‘ |
| A.d..... | destilliertes Wasser |
| AMP..... | Adenosinmonophosphat |
| AngII..... | Angiotensin II |
| AT1/AT2-Rezeptor..... | Angiotensin II-Rezeptorsubtyp 1/2 |
| ATP..... | Adenosintriphosphat |
| bp..... | Basenpaare |
| BSA..... | bovines Serumalbumin |
| cDNA..... | komplementäre DANN |
| DAG..... | Diacylglycerin |
| DEPC..... | Diethylpyrocarbonat |
| DMEM..... | Dulbecco’s modified Eagle Medium |
| DNA..... | Desoxyribonukleinsäure |
| dNTP..... | 2’-Deoxynukleosid-5’-triphosphat |
| ECL..... | enhanced chemiluminescence‘ |
| EDTA..... | Ethylendiamintetraessigsäure |
| EGFP..... | Enhanced Green Fluorescent Protein |
| ER..... | Endoplasmatisches Reticulum |
| EST..... | Expressed sequence tags |
| FKS..... | fötales Kälberserum |
| GAP..... | GTPase aktivierende Proteine |
| GDP..... | Guanosindiphosphat |
| GEF..... | ‚guaninenucleotide exchange factors‘ |
| G-Protein..... | Guanosintriphosphat bindendes Protein |
| GPCR..... | G-protein coupled receptor‘ |
| GRK..... | G-Protein gekoppelte Rezeptor-Kinasen |
| GTP..... | Guanosintriphosphat |
| HEPES..... | N-2-Hydroxyethylpiperazin-N’-2-ethansulfonsäure |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|----------------|--|
| Ig | Immunglobulin (z.B. IgG) |
| IP3 | Inositol-1,4,5-trisphosphat |
| JAK | Januskinase |
| kDa | Kilodalton |
| MAP | „mitogen-activated protein“ |
| MAPK | „mitogen-activated protein kinase“ |
| MEK | „mitogen-activated protein / extracellular signal-regulated kinase kinase“ |
| MEKK | „mitogen-activated protein / extracellular signal-regulated kinase kinase kinase“ |
| MOPS | Morpholinopropansulfonsäure |
| PAGE | Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese |
| PBS | Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung |
| PCR | Polymerase Kettenreaktion |
| PIP2 | Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat |
| PKA | Proteinkinase A |
| PKC | Proteinkinase C |
| PLC | Phospholipase C |
| PMSF | Phenylmethylsulfonylfluorid |
| pNPP | p-Nitrophenyl-Phosphate-Disodium |
| PTK | Protein-Tyrosin-Kinasen |
| PVDF | Polyvinylidendifluorid |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| rpm | rounds per minute |
| rRNA | ribosomale RNA |
| RT | Raumtemperatur |
| RTK | Rezeptor-Tyrosin-Kinase |
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| SDS-PAGE | Natriumdodecylsulfat Polyacrylamid-Gel- Elektrophorese |
| STAT | „signal transducer and activator of transcription“ |
| TMD | Transmembrandomäne |
| VSMC | „vascular smooth muscle cell“ |

10 Anhang

10.1 Translation der ATBP-cDNA Sequenzen

ATBP50-mRNA Translation

```

DNA: GGAACCACAACAACCCGGCATGCAGTGTGATGGAATTCAGGCTGCTTG
+3: E P Q Q P A A C S V M E F R L L A
DNA: CTTCTGAGCTGCTCCTCACAGATCTTGCTCAGACGAAGGGCATTGTTTGT
+3: S * A A P H R S C S D E G H C L L
DNA: TAGCAACATCTGGAAGAGCAAACGGAAGCCTGGAGCTCTGGATAGCTAAC
+3: A T S G R A N G S L E L W D S * L
DNA: TCTAGCTACCCCCCCCCACGCACCCCCCAATCTGGGTGGCCTGGCATTAA
+3: * L P P P P R T P Q S G W P G I S
DNA: GCATGTAAGCTTGTTTTCTCTGGCTGTATCTTTGGCCTGGAAGAACCCC
+3: M * A C F S L A V S L G L E E P R
DNA: GAGTTGCCAAGAGACACAGTATGTGATGGTCCCTGGAAGAGCTGTTCCRC
+3: V A K R H S M * W S L E K L L P L
DNA: TCGAAGTTCTCCACTGGCTTCGAAGACATGCTGTTGTCTCCAAATTCT
+3: R S S P T G F E D M L L S P K F S
DNA: CCTTATCCACCATCCACGTCCGCCTAACCGCCAAAGGACTGCTTCGAAACC
+3: L S T I H V R L T A K G L L R N L
DNA: TCCGGCTTCTTCGGGGCTCAGGAAAACACTGTCATTTTCCACAGTTG
+3: R L P S G L R K N T V I F H T V E
DNA: AAAAGGGCAGGCAGAAGAATCCAGGAGCCTGTCATCCAGACCCAGACAG
+3: K G R Q K N P R S L C I Q T Q T A
DNA: CTCCAGATGTGCTGTCTCCGAGAGAACGCTTGAGTTGGCCCAATACAAGA
+3: P D V L S S E R T L E L A Q Y K T
DNA: CAAAATGTGAAAGCCAAAGTGGATTTCATCCTGCACCTCAGGCAGCTTCTTT
+3: K C E S Q S G F I L H L R Q L L S
DNA: CCCGTGGTAACAACAAGTTTGAAGCGCTGACAGTTGTGATCCAGCACCTCC
+3: R G N N K F E A L T V V I Q H L L
DNA: TGTCTGAGCGGGAGGAAGCACTGAAGCAACAAAAACCTCTCTCAAGAAC
+3: S E R E E A L K Q H K T L S Q E L
DNA: TTGTCAGCCTCCGGGGAGAGCTAGTTGCTGCTTCAAGCGCCTGTGAGAAGC
+3: V S L R G E L V A A S S A C E K L
DNA: TAGAAAAGGCTAGGGCTGACTTACAGACAGCGTATCAAGAATTTGTCCAGA
+3: E K A R A D L Q T A Y Q E F V Q K
DNA: AACTAAACCAGCAGCATCAGACAGACCCGACGGAAGTGGAGAACCAGGCTGA
+3: L N Q Q H Q T D R T E L E N R L K
DNA: AGGACTTATACACCGCAGAGTGTGAGAAGCTTCAAGAGCATTACATTGAGG
+3: D L Y T A E C E K L Q S I Y I E E
DNA: AGGCAGAAAAATATAAACTCAACTGCAAGAGCAGTTTGACAACCTTAAACG
+3: A E K Y K T Q L Q E Q F D N L N A
DNA: CCGCCATGAGACCACTAAGCTTGAGATTGAAGCTAGCCACTCGGAGAAGG
+3: A H E T T K L E I E A S H S E K V
DNA: TGAATTTGCTGAAGAAGACCTATGAAACCTCCCTTTAGAAAATCAAGAAGA
+3: E L L K K T Y E T S L S E I K K S
DNA: GCCATGAGATGGAGAAGAAGTCACTGGAGGATCTGCTTAATGAGAAGCAGG
+3: H E M E K K S L E D L L N E K Q E
DNA: AATCGCTGGAGAAAACAAATCAATGATCTGAAGAGTGAAGAACGATGCTTTAA
+3: S L E K Q I N D L K S E N D A L N
DNA: ACGAAAGGTTGAAATCAGAGGAGCAAAGCAACTGTCAAGAGAGAAGGCCGA
+3: E R L K S E E Q K Q L S R E K A N
DNA: ATTCAAAAACCTCAGGTATGTATCTGGAGCAAGAACTAGAAAAGCCTGA
+3: S K N P Q V M Y L E Q E L E S L K
DNA: AGGCTGTGTTAGAGATCAAGAATGAGAAGCTGCACCAGCAGGACATGAAGC
+3: A V L E I K N E K L H Q Q D M K L
DNA: TAATGAAGATGGAAGGCTGGTGGACAATAACACAGCATTGGTTGACAAGC
+3: M K M E K L V D N N T A L V D K L
DNA: TGAAGGATTCCAGCAGGAAAACGAGGAGTTAAAAGCTCGCATGGACAAAAC
+3: K R F Q Q E N E E L K A R M D K H
DNA: ACATGGCAATTTCAAGGCAACTTTCACCGAGCAGGCCGCGCTGCAAGAGT
+3: M A I S R Q L S T E Q A A L Q E S
DNA: CCCTTGAGAAGGAGTCAAAGTCAACAAGAGACTGTCCATGGAGAACGAGG
+3: L E K E S K V N K R L S M E N E E
DNA: AACTTCTGTGAAAACCTGCACAACGGAGACCTGTGCAGCCCCAAGAGATCCC
+3: L L W K L H N G D L C S P K R S P
DNA: CCACCTCCTCGGCCATCCCTTCCAGTCCCCCAGGAATTCTGGTTCTTCT

```

Anhang

+3: T S S A I P F Q S P R N S G S F S
DNA: CCAGCCCCAGCATCTCACCCAGATGACGGCTTCTGAACGCAGGAGACTCTC
+3: S P S I S P R * R L L N A G D S L
DNA: TGAAGGCACTGAGGTGCGCTTCTGCGGGACTGACCCTAAGTTCAGAGCTCA
+3: K A L R C A S A G L T L S S E L M
DNA: TGGGAACCTCGAGTTGCTGCGTTAGCTCTCTGGAATATCCCCAGGATATCGG
+3: G T R V A A L A L W N I P R I S G
DNA: GAGAGCAGCGCCAACCGTATCAGCTACGTACGAATAGAGAGCTCCAATAG
+3: E Q P P T V S A T Y E * R A P I E
DNA: AAGACTTTTAACTTGGTCCAAAAGCCTCCTCCAAAACAGATTTCCGAACT
+3: D F * L G P K A S S K N R F R N *
DNA: GAAGTGGACATAGTTGCACAAAAGCACTTACGGAACGAGGGAACCTTGTTC
+3: S G H S C T K H L R N E G T L F F
DNA: TTGCCTTCTTACCTAAGCATAGGGGAAAACCTCAGGGCCCTATTAAGA
+3: A F L H L S I G E N S Q G P I K I
DNA: TAAAGATTTATAACCTTTATAATGTTCTTACCAGAGACACCTTCTTGTGA
+3: K I Y N L Y N V L H Q R H L L V I
DNA: TTTTATTTTCACTGACTGTGGCAAGGGGGTGTGTGTGTGAGTGAAAT
+3: F I S V * L W A R G V C V * V K W
DNA: GGGTGTACTGGCGTGTACGTACTGTATAGCCCCGCCCTGCTGTGTA
+3: V Y W R V T * L S * P R P L L C I
DNA: TTAAAAGTCAACAGCTGTATATAGCTTGGCCTGTATTAACCAAGTCATAAT
+3: K S Q Q L Y I A W P V L T K S * S
DNA: CGGCACACGAGCGTCAACAAAAGCCATAGAAGAGAAAGCAATAGTGTGTA
+3: A H E R Q Q K P * K R K Q * C L N
DNA: ATTTCCCCCAACTCATCTCAGCACTGTGCCACGGCAGGGCTCGGGCAAGA
+3: F P P T H L S T V P R Q G S G K T
DNA: CAGGAAAAGCCTTTGGTTTCTTGATGACCGTACATTTATTTCTGTTGTT
+3: G K A F G F L M T V H L F L C C *
DNA: AGTTTTTCCATGTTTCGGCATTATCCGTTGATAGCAGTTTTTTTTTCCCCT
+3: F F H V R H Y P L I A V F F S P C
DNA: GTAGATTTTACGAGCCTAATGCTATACTCTGATTCAATTTTCTCAGGTA
+3: R F S R A * L L Y S D S F S Q A M
DNA: TGAGCAAATGTAGTTCCTAATTTTTCTAAATACAAATCTGTATAAAGAGT
+3: S K C S S L I F L N T N L Y K E *
DNA: AAGGGGGCAGTACCAATGGATGTTTCTGGTTTATTTTTTCCCCTTGAACCC
+3: G G S T N G C F W F I F F P * T Q
DNA: AAGCTAGCTTCATAGCGCTAATCCTCCGTCTACCCTCCTGTTGTTCTAACC
+3: A S F I A L I L R L P S C C S N L
DNA: TCCGCCTTGCCTTCTCCTCCATGTAGAGCCACGGAAGCAAAGCGCCCTCCT
+3: R L A F S S M * S H G S K A P S F
DNA: TCCTACCACAGAGTGTGCTTTTCCAGGGCCAGTTTATCTTGGAGGTGCTG
+3: L P T E C A F P G P V Y L G G A E
DNA: AACCTGTTTCCCAAATAAGCTAAGCTCTGGTCTGACACTACACAATTTTA
+3: P V S Q I S * A L V L T L H N F R
DNA: GAAACCCCGGGGGAAACCAGTAAAGGCATTTTAGCATGTACTAATCCAC
+3: N P G G E T S K G I L A C T N P H
DNA: ATGAGCACAGAGTTAAGCCACAGTTCTGTGTTGAGTAGATCCAAGAGCGG
+3: E H R V K P T V L C * V D P R A G
DNA: GAATGCTGACTTGGGCCCCCTGAGCATTCTCCAGCCACTGGAATGGAAC
+3: M L T W A P L S I L P A T G M E Q
DNA: AGAGTGGCCAAAGAGTGAGAGGTATGGCTTCTGCAGCTCCTTCACACTGCA
+3: S G Q R V R G M A S A A P S H C I
DNA: TTCAAATTCAGATCTTCGCTTACCATCTCCCTAGGCTCCAAGCTCTGTG
+3: Q N S D L R L P S P * A P R L C E
DNA: AAAGTTAGAAGGATAGCTGTGGCTCCCCACCACCCAACCCACAAACTTCCC
+3: S * K D S C G S P P P N P Q T S L
DNA: TGTGCATGCCGGCATTGCGATGTCAGTATTTACTAATTCATGGTCAATGCT
+3: C M P A L R C Q Y L L I H G Q C C
DNA: GCTCAGATAACCCCTATAGCGAGGACAGATTCAGGATACTAGAGGTGAGTC
+3: S D N P Y S E D R F R I L E V S H
DNA: ATCCTAGACTTCTGCACTACAGAGCTAACTGATAGTCATGATGATGCTTT
+3: P R L L H Y R A N * * S * C M L F
DNA: TTATTAGGGTGTGTTTGAAGTCTCTTATCTCCAATAGTTTATGATGTAT
+3: I R G C V * S L L S P I V Y D V C
DNA: GTAACCTACCATGTTTGGCTCCCGATAAATAGGAATGATTGCAGCTTTCAGT
+3: N L P C L L P I N R N D C S F T A
DNA: CCACCTCCTGGAATAGCTCTGCTCCTGGTCCCAAGTTGTTCTCAATGATGT
+3: T S W N S S A P G P K L F S M M L
DNA: TAGCCAAAGTCAGGTTTGTCAATTTATGCCCTAGTTATGGTAAAGCTCAAGT
+3: A K V R F V I Y A L V M V K L C C
DNA: GTTGACCTGCCATCCCTCATAACCAGTAGATGTCTGGGAAGTCAAATCTTA
+3: * P A I P H T T * M S G K S N L T

Anhang

```
DNA: CAGCAATTAAAATGCCTAGAGAGCATTTAAGGGTTTTTTTTGTTTGTTTTT
+3:  A I K M P R E H L R V F L F C F L
DNA: TAAACCAAACATTTTATGTACAATACAAAATTGTTGACACATCGTTTAAAA
+3:  N Q T F Y V Q Y K I V D T S F K K
DNA: AAAATGTGGGTGTGTGAACAACCTGTAGTTTATAGCAATGGGAAAGTGTATT
+3:  N V G V * T T V V Y S N G K V Y F
DNA: TTA CTTTGATCAAATAAATAATGCTGGAATATTCAATGTAAAAAAAAAAAA
+3:  T L I K * I M L E Y S M * K K K K
DNA: AAA
+3:
```

Anhang

ATBP60-mRNA Translation

DNA: GAACATGGCTGCAGCTTTTTCCTGCCTGAGCTTGCTTTGTTTCCTTTTAAAT
+2: N M A A A F P A * A C F V P F * M
DNA: GACTATACCAGGAGGATTTTCGAGTTGTACAGAACTGATATTTCTTCAAC
+2: T I P G G F R S C T E T D I S S T
DNA: GATCTTTATCAATTCTACACTCACACCCCGCGGCTCAGAAAGGCAGTA
+2: I F I N S T L T P P A G S E R Q Y
DNA: TGATGCTACCTTACTGGCACTGCTTGTCTGGGATCCTACAGCCTTTGTAT
+2: D A T L L A L L V V G S Y S L C I
DNA: AATTCCTTTGTTAGCCACGCTTACTAGGAAAAAAGTGGTCATGCTGCCAT
+2: I P L L A T L T R K K S G H A A I
DNA: CAACAAATATGAAGAGAACTCCCAAACAAGCATTTCAGAATGGGTGAGG
+2: N K Y E E K P P K Q A F Q N G S G
DNA: ACCCTTGTATCTGAAGCCTTTGGTACCCAGAGCTCACTCGCACTTGTCAA
+2: P L Y L K P L V P R A H S H L L K
DNA: AACTTCTCCAAAGGTCCTTCAAGGAAGAGTCTGTTTACAGCTTTTAATT
+2: T S P K G P S R K S L F T A F N S
DNA: AGTTGAAAAGGGCAGGCAGAAAGATCCAGGAGCCTATGCATCCAGACCCA
+2: V E K G R Q K N P R S L C I Q T Q
DNA: GACAGCTCCAGATGTGCTGCTCCGAGAGAACGCTTGAGTTGGCCCAATA
+2: T A P D V L S S E R T L E L A Q Y
DNA: CAAGACAAAATGTGAAAGCCAAAGTGGATTTCATCCTGCACCTCAGACAGCT
+2: K T K C E S Q S G F I L H L R Q L
DNA: TCTTTCCCGTGGTAACACCAAGTTTGAAGCGCTGACCGTTGTGATCCAGCA
+2: L S R G N T K F E A L T V V I Q H
DNA: CCTCTGTCTGAGCGGGAGGAGCACTGAAGCAACACAAAACCTCTCTCA
+2: L L S E R E E A L K Q H K T L S Q
DNA: AGAACTTGTACGCTCCGGGAGAGCTAGTTGCTGCTTCAAGCGCCTGTGA
+2: E L V S L R G E L V A A S S A C E
DNA: GAAGCTAGAAAAGGCTAGGACTGACTTACAGACAGCGTATCAAGAATTTGT
+2: K L E K A R T D L Q T A Y Q E F V
DNA: CCAGAACTAAACCAGCAGCATCAGACAGACCCGACGGAAGTGGAGAACCG
+2: Q K L N Q Q H Q T D R T E L E N R
DNA: GCTGAAGGACTTATACACCGCAGAGTGTGAGAAGCTTCAAGCATTACAT
+2: L K D L Y T A E C E K L Q S I Y I
DNA: TGAGGAGGCAGAAAAATATAAACTCAACTGCAAGAGCAGTTTGCACACTT
+2: E E A E K Y K T Q L Q E Q F D N L
DNA: AAACGCCGCCATGAGACCACTAAGCTTGAGATTGAAGCTAGCCACTCGGA
+2: N A A H E T T K L E I E A S H S E
DNA: GAAGGTGGAATGTGTAAGAAGACCTATGAAACCTCCCTTTCAGAAATCAA
+2: K V E L L K K T Y E T S L S E I K
DNA: GAAGAGCCATGAGATGGAGAAGAAGTCACTGGAGGATCTGCTTAATGAGAA
+2: K S H E M E K K S L E D L L N E K
DNA: GCAGGAATCGCTGGAGAAACAAATCAATGATCTGAAGAGTGAAGACGATGC
+2: Q E S L E K Q I N D L K S E N D
DNA: TTTAAACGAAAGGTTGAAATCAGAGGAGCAAAAGCAACTGTCAAGAGAGAA
+2: L N E R L K S E E Q K Q L S R E K
DNA: GGCGAATTCAAAAACCTCAGGTCATGTATCTGAGCAAGAACTAGAAAG
+2: A N S K N P Q V M Y L E Q E L E S
DNA: CCTGAAGGCTGTGTTAGAGATCAAGAATGAGAAGCTGCACCAGCAGACAT
+2: L K A V L E I K N E K L H Q Q D M
DNA: GAAGCTAATGAAGATGGAAAAGCTGGTGGACAATAACACAGCATTGGTTGA
+2: K L M K M E K L V D N N T A L V D
DNA: CAAGCTGAAGCATTCCAGCAGGAAAACGAGGAGTTAAAAGCTCGCATGGA
+2: K L K R F Q Q E N E E L K A R M D
DNA: CAAACACATGGCAATTTCAAGGCACTTTCCACCGAGCAGGCCGCGCTGCA
+2: K H M A I S R Q L S T E Q A A L Q
DNA: GGAGTCCCTTGAAGGAGTCAAGGTCACAAAGAGACTGTCCATGGAGAA
+2: E S L E K E S K V N K R L S M E N
DNA: CGAGGAACTTCTGTGGAACCTGCACAACGGAGACCTGTGCAGCCCAAGAG
+2: E E L L W K L H N G D L C S P K R
DNA: ATCCCCACCTCCTCGGCCATCCCTTTCAGTCCCCAGGAATTTCTGGTTC
+2: S P T S S A I P F Q S P R N S G S
DNA: CTTCTCCAGCCCAGCATCTCACCAGATGACGGCTTCTGAACGCAGGAGA
+2: F S S P S I S P R * R L L N A G D
DNA: CTCTCTGAAGGCACTGAGGTGCGCTTCTGCGGGACTGACCCGAAGTTGAGA
+2: S L K A L R C A S A G L T R S S E
DNA: GTTCATGGGAACTCGAGTTGCTGCGTTAGCTCTCTGGAATATCCCCAGGAT
+2: F M G T R V A A L A L W N I P R I
DNA: ATCGGAGAGCAGCCGCAACCGTTTCAGCTACGTACGAATAGAGGCTCC
+2: S G E Q P P T V S A T Y E * R A P
DNA: AATAGGAGACTTTTAACTTGGTCCAAAAGCCTCCTCCAAAAACAGATTTGC

Anhang

+2: I G D F * L G P K A S S K N R F R
DNA: GAACTGAAGTGGACATAGTTGCACAAAGCACTTACGGAACGAGGGAACCTT
+2: N * S G H S C T K H L R N E G T L
DNA: GTTCTTTGCCTTCCTTCACCTAAGCATAGGGGAAAACCTCTCAGGGCCCTAT
+2: F F A F L H L S I G E N S Q G P I
DNA: TAAGATAAAGATTTATAACCTTTATAATGTTCTTCACCAGAGACACCTTCT
+2: K I K I Y N L Y N V L H Q R H L L
DNA: TGTGATTTTTTATTTTCAGTCTGACTGTGGCAAGGGGGTGTGTGTGAGT
+2: V I F I S V * L W A R G V C V * V
DNA: GAAATGGGTGTACTGGCGTGTACGTGACTGTCATAGCCCCGCCCTGCT
+2: K W V Y W R V T * L S * P R P L L
DNA: GTGTATTAAGTCAACAGCTGTATATAGCTTGGCCTGTATTAACCAAGTC
+2: C I K S Q Q L Y I A W P V L T K S
DNA: ATAATCGGCACACGAGCGTCAACAAAAGCCATAGAAGAGAAAGCAATAGTG
+2: * S A H E R Q Q K P * K R K Q * C
DNA: CTTGAATTTCCCCCAACTCATCTCAGCACTGTGCCACGGCAGGGCTCGGG
+2: L N F P P T H L S T V P R Q G S G
DNA: CAAGACAGGAAAAGCCTTTGGTTTCTTGATGACTGTACATTTATTTCTCTG
+2: K T G K A F G F L M T V H L F L C
DNA: TTGTTAGTTTTTCCATGTTTCGGCATTATCCGTTGATAGCAGTTTTTTTTTC
+2: C * F F H V R H Y P L I A V F F S
DNA: CCCCTGTAGATTTTCACGAGCCTAATTGCTATACTCTGATTCATTTCTCA
+2: P C R F S R A * L L Y S D S F S Q
DNA: GGCTATGAGCAAATGTAGTCCCTAATTTTTCTAAATACAAATCTGTATAA
+2: A M S K C S S L I F L N T N L Y K
DNA: AGAGTAAGGGGGCAGTACCAATGGATGTTTCTGGTTATTTTTTCCCTTG
+2: E * G G S T N G C F W F I F F P *
DNA: AACCCAAGCTAGCTTCATAGCGCTAATCCTCCGTCTACCCTCCTGTTGTTT
+2: T Q A S F I A L I L R L P S C C S
DNA: TAACCTCCGCTTGCCTTCTCCTCCATGTAGAGCCACGGAAGCAAAGCGCC
+2: N L R L A F S S M * S H G S K A P
DNA: CTCCTTCCCTACCACAGAGTGTGCTTTTCCAGGCCAGTTTATCTGGAGG
+2: S F L P T E C A F P G P V Y L G G
DNA: TGCTGAACCTGTTTCCCAAATAAGCTAAGCTCTGGTTCTGACACTACACAA
+2: A E P V S Q I S * A L V L T L H N
DNA: TTTTAGAAACCCCGGGGGGAAACCAGTAAAGGCATTTTAGCATGTACTAA
+2: F R N P G G E T S K G I L A C T N
DNA: TCCACATGAGCACAGAGTTAAGCCAACAGTCTGTGTTGAGTAGATCCAAG
+2: P H E H R V K P T V L C * V D P R
DNA: AGCGGGAATGCTGACTTGGGCCCTCTGAGCATTCTCCAGCCACTGGAAT
+2: A G M L T W A P L S I L P A T G M
DNA: GGAACAGAGTGGCCAAAGAGTGAGAGGTATGGCTTCTGCAGCTCTTCACA
+2: E Q S G Q R V R G M A S A A P S H
DNA: CTGCATTCAAATTCAGATCTTCGCTTACCATCTCCCTAGGCTCCAAGGCT
+2: C I Q N S D L R L P S P * A P R L
DNA: CTGTGAAAGTTAGAAGGATAGCTGTGGCTCCCCACCACCCAACCCACAAC
+2: C E S * K D S C G S P P P N P Q T
DNA: TTCCCTGTGCATGCCGGCATTGCGATGTCAGTATTTACTAATTCATGGTCA
+2: S L C M P A L R C Q Y L L I H G Q
DNA: ATGCTGCTCAGATAACCCCTATAGCGAGGACAGATTCCAGGATACTAGAGGT
+2: C C S D N P Y S E D R F R I L E V
DNA: GAGTCATCCTAGACTTCTGCACTACAGAGCTAACTGATAGTCATGTCAT
+2: S H P R L L H Y R A N * * S * C M
DNA: GCTTTTTATTAGGGTGTGTTGAAGTCTCTTATCTCCAATAGTTTATGA
+2: L F I R G C V * S L L S P I V Y D
DNA: TGTATGTAACCTACCATGTTTGCTCCCGATAAATAGGAATGATGTCAGCTT
+2: V C N L P C L L P I N R N D C S F
DNA: CACTGCCACCTCCTGGAATAGCTCTGCTCCTGGTCCAAGTTGTTCTCAAT
+2: T A T S W N S S A P G P K L F S M
DNA: GATGTTAGCCAAAGTCAGGTTTGTCAATTTATGCCCTAGTTATGGTAAAGCT
+2: M L A K V R F V I Y A L V M V K L
DNA: CAAGTGTGACCTGCCATCCCTCATAACCACGTAGATGTCTGGGAAGTCAAA
+2: K C * P A I P H T T * M S G K S N
DNA: TCTTACAGCAATTAATGCCTAGAGAGCATTAAAGGGTTTTTTTGTTTTTG
+2: L T A I K M P R E H L R V F L F C
DNA: TTTTTTAAACCAACATTTTATGTACAATACAAAATTGTTGACACATCGTT
+2: F L N Q T F Y V Q Y K I V D T S F
DNA: TAAAAAAATGTGGGTGTGTGAACAACCTGTAGTTTATAGCAATGGGAAAGT
+2: K K N V G V * T T V V Y S N G K V
DNA: GTATTTTACTTTGATCAAATAAATAATGCTGGAATATTCATGTAAAAAAA
+2: Y F T L I K * I M L E Y S M * K K

Anhang

ATBP135-mRNA Translation

DNA: AACTAATTAAGGAGTGAGCTGTAAATTTTTCTAACATTTATTTGAGTTTAC
+1: N * L R S E L * I F L T F I * V Y
DNA: TGTTTTGCTTCTTCCAGGGAACGACAAGTCATTTTCAGCTTTGGAGCATCTC
+1: C F A S S R E R Q V I S A L E H L
DNA: AGACTACAGTTGTGGAAGCCGCTGAAAGCAATAGAAAGGGGAGGAGCTGG
+1: R L Q L W K P A E S N R K G R S W
DNA: ACCATTTTTCTATTTACTCTCATTAAAAAGGAATTTGAAGAGAAGATAAAAT
+1: T I F H L L S L K R N L K R R * N
DNA: GGCAGAGTTTTGAGGTTAATATTCAGGATGAATGATGATAAATTCAGATAGG
+1: G R V L R L I F R **M** N D D N S D R
DNA: ACAGAAGATGGATCGCGTTATGTATTTATCCGAGATAAAAACTCGAATCCA
+1: T E D G S R Y V F I R D K N S N P
DNA: TCTGAATACTACCAACATCGCTATCTGCCAGTGCCCTTCAGTGAGTCAC
+1: S E Y Y Q T S L S A Q C P S V S H
DNA: GGGGATTGGAACCTGACAACCCAGATGCCATGGTGGTCGATTATGAAATG
+1: G D W N S D N P D A M V V D Y E M
DNA: GATCCTGCGTGGACAGTAGTGAAAGTGTATCTTTAAGCCATCAGTGTGTT
+1: D P A V D S S E S V S L S H Q C V
DNA: GAAGAACTTGCTTACCCAGAGCCTTCAAGTGATTTTCATGGGGAAGCATGAG
+1: E E L A Y P E P S S D F M G K H E
DNA: TTTACAATGTACAGTGAGCTTACCTGCCAGTCTCCTGCACTTGTGAACACA
+1: F T M Y S E L T C Q S P A L V N T
DNA: GGGGAAGCCCCAAGACCTGCACAGTAACTGTGACTCCCTAGAGGCAATCCAG
+1: G K P Q D L H S N C D S L E A I Q
DNA: GATGAGAAGTTTGATCCCCCTAAGCCCTGTGAGTGCAGGTCTGATGACGAT
+1: D E K F D P L K P C E C R S D D D
DNA: TATGCTTGTGGAGATTCCCCTGAAGTTTTGGAGCTAAAACAACATATGGC
+1: Y A C G D S P E V L E L K Q T Y G
DNA: ATGAAAGTGGACACGGCTAACTACACCTTTATAGCACGCCATGATATGAA
+1: M K V D T A N Y T F I A R H D I E
DNA: CAGGGTCAGCCTTTGCATGCTCCTGGAGGTTTGCAGACAACAGTGAGAGAC
+1: Q G Q P L H A P G G L Q T T V R D
DNA: AGAAATGCTTTGTCTCCTGCGGTGGACACCACCCCATTCCTCTAAGATG
+1: R N A L S S C G R T P P H S C K M
DNA: TATGTGAGAGGGTTAATTATAATCGAGAGAAGTTTAAAACTCCAAGCC
+1: Y V R G V N Y N R E N F E N L Q A
DNA: ACACCATCCAAGACCCTAAACACAACCTTTACAGTGATCTCTGATGTGCTG
+1: T P S K T L N T T F T V I S D V L
DNA: ATGCAAACCTGACAGTCCAGACGTTGGAGTTCAGGGTCAGAATCTTTAGGA
+1: M Q T D S P D V G V Q G Q N S L G
DNA: AATGTCACCAAAGAGTACACAGATGGGACAAGCGGAGGACTCATTGGAGAA
+1: N V T K E Y T D G T R R G L I G E
DNA: AAAGAGATACAAGCTGTGACACTGGTTTTCCGGATGGCATGGAGGTCCCCAAC
+1: K E I Q A V T L V S D G M E V P N
DNA: GGATCTGCATCACAGGAGTTCTATTGTGTATCTGAAGATGACCCAAACAGT
+1: G S A S Q E F Y C V S E D D P N S
DNA: GAGACACATTCACACGGCCCGTATGCTCAACAGGAAATGGGCCAAAATTTA
+1: E T H S H G P Y A Q Q E M G Q N L
DNA: AGAGGAACACTGCCAAGTGTATGTCGATGGTGAATGCCAGTACTGGTG
+1: R G T L P N C H V D G E C P V L V
DNA: CCAGCTTTTGAGAAGAGTAAAACCAGAGTCTGGGCTCTGAGTGTAAAGTC
+1: P A F E K S K T R V L G S E C K V
DNA: ACTGTGACTGAAGACCCACACATCGATTCCCACGACAATGACTCAGACATC
+1: T V T E D P H I D S H D N D S D I
DNA: CAAAGTAGTACTGAAGAGCTGACCCTGAGAAGTGTTCAGGGCAGAGGGGT
+1: Q S S T E E L T L R S V S G Q R G
DNA: TCACCTTATGAAATGGGTTGGGGCGAGAACGGCGGAGCCATTTGCACAGAT
+1: S P Y E M G W G E N G G A I C T D
DNA: AAAGCAGGTTGCATGTCAACACCAGTTGAGCAACCCCCCAATCTGAGCTTC
+1: K A G C M S T P V E Q P P N L S F
DNA: AGACTTGAACCTGCTGAAGTGAAGAAGTACAATAATGTGGAGAAATGGACCA
+1: R L E P A E V K K Y N N V E N G P
DNA: AGAGATGCTAAACGTGCACCAAACTTGAAGGGGAACCAACAATATGCCA
+1: R D A K R A P N L K G E P T N M P
DNA: AAACCTAATTTGGGAAAATCAGCTACCAAAACAATACCACTGTAGGCAGT
+1: K P N L G K S A T K T N T T V G S
DNA: AAAGTCAGGAAGACAGAAATTATAAGTTATCTACACCAAACTTCAAAAAC
+1: K V R K T E I I S Y P T P N F K N
DNA: ATTAAAGCCAAAAGTTATATCCAGATCAGTGTGCAACCCAAAGACACTTCC
+1: I K A K V I S R S V L Q P K D T S
DNA: ATAATGAAGGACACACCCAGCCCTCAGGTAACAGGGGCTCTTCACCATCA

Anhang

+1: I M K D T P S P Q V T G G S S P S
DNA: CCAGGGCCTTCTAAACACTTGACAATGATGAACAAAGCACCAAGATCTGAC
+1: P G P S K H L T M M N K A P R S D
DNA: TTTAAAGCCAGCAAAAAAGCAGAAATCCCAATTAACAAGACACACAAGCAA
+1: F K A S K K A E I P I N K T H K Q
DNA: CAGTTTAATAAACTCATTACCAGCCAGGCTGCGCAAGTTACAACTCATTCT
+1: Q F N K L I T S Q A A Q V T T H S
DNA: AAAAAATGCTTCACTCGGGTTCCAAGAACAACATCTGCCACGAAATCGAAT
1: K N A S L G V P R T T S A T K S N
DNA: CAGGAGAATGTGACAAGACAGGTTCTCCTCATGCAGGGAGTGAGACCGGG
+1: Q E N V D K T G S P H A G S E T G
DNA: TCTGTAGCTGCCTTCTTCCAGAAGATCAAAGGCATTCTCCCCGTGAAAATG
+1: S V A A F F Q K I K G I L P V K M
DNA: AAAAGCTCAGAGTGTGGAAAGTGAATTACGTTTCCACATCGATCAGATT
+1: K S S E C L E V T Y V S H I D Q I
DNA: AGCCCTGAAAAGGGTGAGCAGGACGGTGAGGCTCCCATGAAAAGCAAGAG
+1: S P E K G E Q D G E A P M E K Q E
DNA: CTGGGAAAACAAGCCACGAATGAGATTTTTGAATCCAAGTCTCTATTGGTG
+1: L G K Q A T N E I F E S K S L L V
DNA: GGCTCTGCACCCAAAACCTCCACCACGCCAGGAAGGAGCAGTTCCAAGCCA
+1: G S A P K T S T T P G R S S S K P
DNA: GACTCGCGGAGCCTGAGGAAAACACCAGGCTAAAAGCCAAAGTGGGTCCC
+1: D S R S L R K T P G L K A K V G P
DNA: ACTGCTGCCTGCCTGAGGAGGAAGAGTGAGAGTAGAACCCCTAGGCTCCGAC
+1: T A A C L R R K S E S R T L G S D
DNA: AGGGCCTTATCGCCTCAGAGGATCAGGCGCGTGTCCGGCTCTGGTGGTCA
+1: R A L S P Q R I R R V S G S G H
DNA: GCTGCCATCAACAAATATGAAGAGAAACCTCCAAAACAAGCATTTTCAGAAT
+1: A A I N K Y E E K P P K Q A F Q N
DNA: GGGTCAGGACCTTGTATCTGAAGCCTTTGGTACCCAGAGCTCACTCGCAC
+1: G S G P L Y L K P L V P R A H S H
DNA: TTGCTCAAACTTCTCCAAAAGTCTTCAAGGAAGAGTCTGTTTACAGCT
+1: L L K T S P K G P S R K S L F T A
DNA: TTTAATTCAGTTGAAAAGGGCAGGCAGAAGAATCCCAGGAGCCTATGCATC
+1: F N S V E K G R Q K N P R S L C I
DNA: CAGACCCAGACAGCTCCAGATGTGCTGTCCCTCCGAGAGAACGCTTGAGTTG
+1: Q T Q T A P D V L S S E R T L E
DNA: GCCAATACAAGACAAAATGTGAAAGCCAAAGTGGATTCACTCTGCACCTC
+1: A Q Y K T K C E S Q S G F I L H L
DNA: AGACAGCTTCTTTCCCGTGGTAACACCAAGTTTGAAGCGCTGACCGTTGTG
+1: R Q L L S R G N T K F E A L T V V
DNA: ATCCAGCACCTCCTGTCTGAGAGAGGAAGCACTGAAGCAACACAAAACC
+1: I Q H L L S E R E E A L K Q H K T
DNA: CTCTCTCAAGAACTTGTACAGCTCCGGGGAGAGCTAGTTGCTGCTTCAAGC
+1: L S Q E L V S L R G E L V A A S S
DNA: GCCTGTGAGAAGCTAGAAAAGGCTAGGACTGACTTACAGACAGCGTATCAA
+1: A C E K L E K A R T D L Q T A Y Q
DNA: GAATTTGTCCAGAACTAAACCAGCAGCATCAGACAGACCGGACGGAAGT
+1: E F V Q K L N Q Q H Q T D R T E L
DNA: GAGAACCAGGCTGAAGGACTTATACACCGCAGAGTGTGAGAAGCTTACAGAGC
+1: E N R L K D L Y T A E C E K L Q S
DNA: ATTTACATTGAGGAGGCAGAAAAATATAAACTCAACTGCAAGAGCAGTTT
+1: I Y I E E A E K Y K T Q L Q E Q F
DNA: GACAACCTTAAACGCCGCCATGAGACCACTAAGCTTGTGATTGAAGCTAGC
+1: D N L N A A H E T T K L E I E A S
DNA: CACTCGGAGAAGGTGGAATTGCTGAAGAAGACCTATGAAACCTCCCTTTCA
+1: H S E K V E L L K K T Y E T S L S
DNA: GAAATCAAGAAGAGCCATGAGATGGAGAAGAAGTCACTGGAGGATCTGCTT
+1: E I K K S H E M E K K S L E D L L
DNA: AATGAGAAGCAGGAATCGCTGGAGAAAACAATCAATGATCTGAAGAGTGAA
+1: N E K Q E S L E K Q I N D L K S E
DNA: AACGATGCTTTAAACGAAAGGTTGAAATCAGAGGAGCAAAAAGCAACTGTCA
+1: N D A L N E R L K S E E Q K Q L S
DNA: AGAGAGAAGGCGAATTCAAAAACCCCTCAGGTCATGTATCTGGAGCAAGAA
+1: R E K A N S K N P Q V M Y L E Q E
DNA: CTAGAAAGCCTGAAGGCTGTGTTAGAGATCAAGAATGAGAAGCTGCACCAG
+1: L E S L K A V L E I K N E K L H Q
DNA: CAGGACATGAAGCTAATGAAGATGGAAAAGCTGGTGGACAATAACACAGCA
+1: Q D M K L M K M E K L V D N N T A
DNA: TTGGTTGACAAGCTGAAGCGATTCCAGCAGGAAAACGAGGAGTTAAAAGCT
+1: L V D K L K R F Q Q E N E L K A
DNA: CGCATGGACAAAACATGGCAATTTCAAGGCAACTTTCCACCGAGCAGGCC
+1: R M D K H M A I S R Q L S T E Q A

Anhang

DNA : GCGCTGCAGGAGTCCCTTGAGAAGGAGTCAAGGTCAACAAGAGACTGTCC
+1: A L Q E S L E K E S K V N K R L S
DNA : ATGGAGAACGAGGAACCTCTGTGAAACTGCACAACGGAGACCTGTGCAGC
+1: M E N E E L L W K L H N G D L C S
DNA : CCCAAGAGATCCCCACCTCCTCGGCCATCCCTTTCCAGTCCCCAGGAAT
+1: P K R S P T S S A I P F Q S P R N
DNA : TCTGGTTCCTTCTCCAGCCCCAGCATCTCACCCAGATGACGGCTTCTGAAC
+1: S G S F S S P S I S P R * R L L N
DNA : GCAGGAGACTCTCTGAAGGCACTGAGGTGCGCTTCTGCGGGACTGACCCGA
+1: A G D S L K A L R C A S A G L T R
DNA : AGTTCAGAGTTCATGGGAACCTCGAGTTGCTGCGTTAGCTCTCTGGAATATC
+1: S S E F M G T R V A A L A L W N I
DNA : CCCAGGATATCGGGAGAGCAGCCGCAACCGTTTCAGCTACGTACGAATAG
+1: P R I S G E Q P P T V S A T Y E *
DNA : AGAGCTCCAATAGGAGACTTTTAACTTGGTCCAAAAGCCTCCTCCAAAAC
+1: R A P I G D F * L G P K A S S K N
DNA : AGATTTCCGAACTGAAGTGGACATAGTTGCACAAAGCACTTACGGAACGAG
+1: R F R N * S G H S C T K H L R N E
DNA : GGAACCTTGTCTTTGCCTTCCCTTACCTAAGCATAGGGGAAAACCTCTCAG
+1: G T L F F A F L H L S I G E N S Q
DNA : GGCCCTATTAAGATAAAGATTATAACCTTTATAATGTTCTTACCAGAGA
+1: G P I K I K I Y N L Y N V L H Q R
DNA : CACCTTCTTGTGATTTTTATTTCAGTCTGACTGTGGCAAGGGGGTGTGT
+1: H L L V I F I S V * L W A R G V C
DNA : GTGTGAGTAAAATGGGTGTACTGGCGTGTACGTGACTGTCATAGCCCCGC
+1: V * V K W V Y W R V T * L S * P R
DNA : CCCCTGCTGTGATTTAAAAGTCAACAGCTGTATATAGCTTGGCCTGTATTA
+1: P L L C I K S Q Q L Y I A W P V R
DNA : ACCAAGTCATAATCGGCACACGAGCGTCAACAAAAGCCATAGAAGAGAAAAG
+1: T K S * S A H E R Q Q K P * K R K
DNA : CAATAGTGTGAATTTCCCCCAACTCATCTCAGCACTGTGCCACGGCAG
+1: Q * C L N F P P T H L S T V P R Q
DNA : GGCTCGGGCAAGACAGGAAAAGCCTTTGGTTTCTTGATGACTGTACATTTA
+1: G S G K T G K A F G F L M T V H L
DNA : TTTCTCTGTTGTTAGTTTTTCCATGTTTCGGCATTATCCGTTGATAGCAGTT
+1: F L C C * F F H V R H Y P L I A V
DNA : TTTTTCCTCCCTGTAGATTTTCACGAGCCTAATTGCTATACTCTGATTCA
+1: F F S P C R F S R A * L L Y S D T
DNA : TTTTCTCAGGCTATGAGCAAATGTAGTTCCCTAATTTTTCTAAATACAAAT
+1: F S Q A M S K C S S L I F L N T N
DNA : CTGTATAAAGAGTAAGGGGGCAGTACCAATGGATGTTTCTGGTTTATTTTT
+1: L Y K E * G G S T N G C F W F I F
DNA : TTCCCTTGAACCCAAGCTAGCTTCATAGCGCTAATCCTCCGTCTACCTCC
+1: F P * T Q A S F I A L I L R L P S
DNA : TGTTGTTCTAACCTCCGCCTTGCCTTCTCCTCCATGTAGAGCCACGGAAGC
+1: C C S N L R L A F S S M * S H G S
DNA : AAAGCGCCCTCCTTCCACACAGAGTGTGCTTTTCCAGGGCCAGTTTAT
+1: K A P S F L P T E C A F P G P V Y
DNA : CTTGGAGGTGCTGAACCTGTTTCCCAAATAAGCTAAGCTCTGGTCTGACA
+1: L G G A E P V S Q I S * A L V L T
DNA : CTACACAATTTAGAAAACCCGGGGGGAAACCAGTAAAGGCATTTTAGCA
+1: L H N F R N P G G E T S K G I F
DNA : TGTACTAATCCACATGAGCACAGAGTTAAGCCAACAGTTCTGTGTTGAGTA
+1: C T N P H E H R V K P T V L C * V
DNA : GATCCAAGAGCGGAATGCTGACTTGGGCCCTCTGAGCATTCTTCCAGCC
+1: D P R A G M L T W A P L S I L P A
DNA : ACTGGAATGGAACAGAGTGGCCAAAGAGTGAGAGGTATGGCTTCTGCGAGCT
+1: T G M E Q S G Q R V R G M A S A A
DNA : CCTTCACTGCATTCAAATTCAGATCTTCGCTTACCATCTCCCTAGGCT
+1: P S H C I Q N S D L R L P S P * A
DNA : CCAAGGCTCTGTGAAAGTTAGAAGGATAGCTGTGGCTCCCCACCACCCAAC
+1: P R L C E S * K D S C G S P P N
DNA : CCACAACTTCCCTGTGCATGCCGGCATTGCGATGTCAGTATTTACTAATT
+1: P Q T S L C M P A L R C Q Y L L I
DNA : CATGGTCAATGCTGCTCAGATAACCCCTATAGCGAGGACAGATTCAGGATA
+1: H G Q C C S D N P Y S E D R F R I
DNA : CTAGAGGTGAGTCACTCCTAGACTTCTGCACTACAGAGCTAACTGATAGTCA
+1: L E V S H P R L L H Y R A N * * S
DNA : TGATGCATGCTTTTTATTAGGGTGTGTTTGAAGTCTCTTATCTCCAATA
+1: * C M L F I R G C V * S L L S P I
DNA : GTTTATGATGATGTAACCTACCATGTTTGGCTCCCGATAAATAGGAATGAT
+1: V Y D V C N L P C L L P I N R N D
DNA : TGCAGCTTCACTGCCACCTCCTGGAATAGCTCTGCTCCTGGTCCCAAGTTG

Anhang

```
+1: C S F T A T S W N S S A P G P K L
DNA: TTCTCAATGATGTTAGCCAAAGTCAGGTTTGCATTTATGCCCTAGTTATG
+1: F S M M L A K V R F V I Y A L V M
DNA: GTAAAGCTCAAGTGTGACCTGCCATCCCTCATACCACGTAGATGTCTGGG
+1: V K L K C * P A I P H T T * M S G
DNA: AAGTCAAATCTTACAGCAATTAAAATGCCTAGAGAGCATTAAAGGGTTTTT
+1: K S N L T A I K M P R E H L R V F
DNA: TTGTTTTGTTTTTTAAACCAAACATTTTATGTACAATACAAAATTGTTGAC
+1: L F C F L N Q T F Y V Q Y K I V D
DNA: ACATCGTTTAAAAAAAATGTGGGTGTGTGAACAACACTGTAGTTTATAGCAAT
+1: T S F K K N V G V * T T V V Y S N
DNA: GGGAAAGTGTATTTTACTTTTGATCAAATAAATAATGCTGGAATATTCAATG
+1: G K V Y F T L I K * I M L E Y S M
DNA: TAAAAAAAAAAAAAAAAA
+1: * K K K K
```

10.2 Bezugsnachweis der verwendeten Materialien

10.2.1 Geräte

| Gerät | Hersteller / Lieferant |
|--|---|
| Elektroporationsapparatur <i>Gene pulser</i> | Bio-Rad Laboratories GmbH, München |
| Elektrotransferapparatur, Typ Trans Blot SD | Bio-Rad Laboratories GmbH, München |
| Gelanalysegerät Gel Doc 2000 inkl. | Bio-Rad Laboratories GmbH, München |
| Optima™ MAX Ultrazentrifuge | Beckman Coulter, Fullerton, USA |
| Thermocycler, TRIO-Thermoblock | Biometra, Göttingen |
| Bakterienschüttler, New Brunswick Scientific G24 Environmental Incubator Shaker | New Brunswick Scientific GmbH, Nürtingen |

10.2.2 Yeast Two-Hybrid System

| Bakterienstämme | Hersteller / Lieferant |
|--|-----------------------------|
| DH5 α ' <i>deoR</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>hsdR17</i> (rk-mk+), <i>recA1</i> , <i>relA1</i> , <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , (<i>lacZYAargFV169</i>), 80 <i>lacZ</i> M15, F- | Clontech, Palo Alto, USA |
| KC8 <i>hsdR</i> , <i>leuB600</i> , <i>trpC9830</i> , <i>pyrF::Tn5</i> , <i>hisB463</i> , <i>lac74</i> , <i>strA</i> , <i>galU</i> ,K | Clontech, Palo Alto, USA |

| Hefestämme | Hersteller / Lieferant |
|--|-----------------------------|
| AH 109 MATa, <i>trp</i> 1-901, <i>leu</i> 2-3, 112, <i>ura</i> 3-52, <i>his</i> 3-200, <i>gal4</i> , <i>gal</i> 80, <i>LYS2:: GAL1 UASGAL1TATA-HIS3</i> , <i>GAL2UAS- GAL2TATA-ADE2</i> , <i>ura3:: MEL1UAS-</i> <i>MEL1TATA-lacZ</i> Reportergene: <i>HIS3</i> , <i>ADE2</i> , <i>lacZ</i> ; Auxotrophiemarker: <i>trp1</i> , <i>ura3</i> , <i>leu2</i> | Clontech, Palo Alto, USA |

10.2.3 Zellkultur

| Material | Hersteller / Lieferant |
|--|--|
| COS-7 [ATCC Number: CRL-1651] <i>Cercopithecus aethiops</i> ; Morphologie: Fibroblastenartig Gewebe: Nierenepitel SV-40 transzformiert (Gluzman Y, 1981) | LGC Promochem 46485 Wesel |
| N1E-115 [ATCC Number: CRL-2263] <i>Mus musculus</i> ; Morphologie: Fibroblastenartig Gewebe: Hirn; Neuroblastoma (Richelson, 1973) | LGC Promochem 46485 Wesel |
| Neuro2A | LGC Promochem 46485 Wesel |
| PC12W | LGC Promochem 46485 Wesel |
| DMEM, | Invitrogen GmbH, Karlsruhe |
| Fetales Kälberserum (FKS), | GibcoBRL jetzt Invitrogen GmbH, Karlsruhe |
| L-Glutamin (200mM) | Invitrogen GmbH, Karlsruhe |
| Penicillin (10 000 IE)/ Streptomycin (10 000 µg/ml)-Lösung | Invitrogen GmbH, Karlsruhe |
| PBS, Katalognummer: 14190-094 | Invitrogen GmbH, Karlsruhe |
| Trypsin | SERO-Med, Wien, Österreich |

10.2.4 Antikörper

| Material | Hersteller / Lieferant |
|--|---|
| Anti-FGF basic polyclonaler Antikörper | R&D Systems GmbH, Wiesbaden |
| Anti-human PDGF polyclonaler Antikörper | R&D Systems GmbH, Wiesbaden |
| Fitc-gekoppeltem Antikörper | Sigma-Aldrich Chemie GmbH München |
| Cy3-gekoppeltem Antikörper | Sigma-Aldrich Chemie GmbH München |
| Goat-anti mouse IgG, Peroxidase-gekoppelt | Vector Laboratories, Burlingham, USA |
| Normal goat IgG | R&D Systems GmbH, Wiesbaden |
| Anti-polyHis | Sigma-Aldrich Chemie GmbH München |
| Anti-Flag | Sigma-Aldrich Chemie GmbH München |

Anhang

10.2.5 Feinchemikalien

| Material | Hersteller / Lieferant |
|--|---|
| Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (40%) | Bio-Rad Laboratories GmbH, München |
| Ammoniumpersulfat | Bio-Rad Laboratories GmbH, München |
| CAP (m7G(5')ppp(5')G) | Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, England |
| Chaps | Sigma, Deisenhof |
| 100 bp DNA-Ladder | Invitrogen GmbH, Karlsruhe |
| ECL-Plus Western Blotting Detection Reagents | Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, England |
| Ethidiumbromid-Lösung (10 mg/ml) | Invitrogen GmbH, Karlsruhe |
| β -Mercaptoethanol | Bio-Rad Laboratories GmbH, München |
| NG-Nitro-L-Arginin (L-NNA) | Alexis, Gruenberg |
| Octyl- β -D-glycopyranosid (OG) | Fluka Chemie, Buchs, Schweiz |
| Pansorbin | Calbiochem, Nottingham, England |
| Pefabloc SC | Carl Roth GmbH, Karlsruhe |
| Lipofectamine | Invitrogen GmbH, Karlsruhe |
| RNasin | Boehringer Ingelheim GmbH, Ingelheim |
| Slow Fade® Light Antifade Kit | Molecular Probes, Leiden, Niederlande |
| Temed | Bio-Rad Laboratories GmbH, München |

Alle weiteren Chemikalien waren von höchstem Reinheitsgrad und wurden von den Firmen E. Merck, Darmstadt, und Sigma, Deisenhof, bezogen.

Anhang

10.2.6 Enzyme und Kits

| Material | Hersteller / Lieferant |
|--|---|
| DNA-Polymerasen Taq, Pfu | Stratagene, Heidelberg |
| Nucleo Spin® nucleic acid purification kit | Clontech, Palo Alto, USA |
| Nucleo Trap® mRNA purification kit | Clontech, Palo Alto, USA |
| PowerScript™ | Clontech, Palo Alto, USA |
| Retikulozytenlysat (Kaninchen) | Promega, Madison, USA |
| Restriktionsendonukleasen | Biolabs, Beverly, USA |
| RNA-Polymerasen T7, SP6 | Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, England |
| SMART™ RACE cDNA amplification kit | Clontech, Palo Alto, USA |
| SuperScript II | Invitrogen GmbH, Karlsruhe |

10.2.7 Vektoren

| Material | Hersteller / Lieferant |
|---------------------|---------------------------------------|
| pcDNA3.1-V5-polyHis | Invitrogen, Groningen, Niederlande |
| p3XFlag-CMV | Sigma, Deisenhof |
| pEGFP-C3 | Clontech, Heidelberg |
| pDsRed-C3 | Clontech, Heidelberg |
| pGBKT7 | Clontech, Heidelberg |
| pACT2 | Clontech, Heidelberg |
| pGADT7 | Clontech, |

Anhang

| | |
|---------------------------|-------------------------|
| pGBKT7-53 Control Vector | Clontech, Heidelberg |
| pGBKT7-Lam Control Vector | Clontech, Heidelberg |
| pGADT7-T Control Vector | Clontech, Heidelberg |

10.2.8 Verbrauchsmaterialien

| Material | Hersteller / Lieferant |
|--|---|
| BioMax Folie | Kodak GmbH, Stuttgart |
| Elektroporationsküvetten | Bio-Rad Laboratories GmbH, München |
| Röntgenfilm, Typ New RX | Fuji, Tokyo, Japan |
| Hyperfilm ECL | Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, England |
| Immobilon™ P | Millipore Corporation, Bedford, USA |
| 24-Kammer-Platten | Sarstedt AG&Co, Nümbrecht |
| Nitrocellulose-Transfermembran | Sartorius, Göttingen |
| Zellkulturschalen (56,2 cm ²) | Greiner, Frickenhausen |
| Zellkulturschale mit 6 Kavitäten à 9,6 cm ² | Greiner, Frickenhausen |

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

10.2.9 Liste der Primersequenzen

| Primer | Sequenz (Erst Sense, dann Antisense Primer) |
|---|---|
| Klonierung vom AT2-Rezeptor in EGFP und p3xFlag | 5' GACAAGCTTATGAAGGACAACCTTCAGTTTTGC |
| | 5' CTTAGAGAAATGGACACCTTTGTGTCT |
| Klonierung von Gass50 in pcDNA3.1-V5 poly His | 5' CACCATGCTGTTGTCTCCCAAATTCTCCTTATC |
| | 5' CCTTCTCCAGCCCCAGCATCTCACCCAGA |
| Klonierung von Gass50 ohne tail in pcDNA3.1-V5 poly His | 5' CTCGGTACCAGACATGCTGTTGTCTCCCAAATTCTCC |
| | 5' GAGGGATCCACAGAAGTTCCTCGTTCTCCATGGACAGTCT |
| Klonierung von Gass60 in pcDNA3.1-V5 poly His | 5' CACCAGATCTCATGACTATAACCAGGAGGATTTTCGCAGTTG |
| | 5'-CCTTCTCCAGCCCCAGCATCTCACCCAGACCGGTCGC |
| Klonierung von Gass135 in pcDNA3.1-V5 poly His | 5' CACCTCTAGAATGAATGATGATAATTCAGATAGGACAG |
| | 5'-CCTTCTCCAGCCCCAGCATCTCACCCAGA |
| Klonierung der AT2-Rezeptor-Tails in pGBKT7 | 5' CTCGAATTCAACCGCTTCCAACAG |
| | 5' CTCGTGCGACTTAAGACACAAATGG |
| Klonierung des Golgi-Markers | 5'CTCGCTAGCCATGAGGTTTCGTGAGCAGTTCCTGGGCGG |
| | 5'GAGGGTACCGCACCCCGCGGCCGCTGCTCTCCTGGGGG |

Alle Primer wurden von der Firma Tib-MolBiol, Berlin, als Lyophilisat bestellt.

11 Kongressbeiträge und Publikationen

11.1 Vorträge

- 05.05.2002 Gordon Research Conference on Angiotensin, Il Giocco, Italien.
Christoph J. Wruck, Thomas Pufe, Monika Stoll, Marie L. Kruse and Thomas Unger. Role of the cytoplasmatic tail of AT1- and AT2 receptors in internalization and signal transduction.
- 02.10.2002 Tagung des Deutschen Instituts für Bluthochdruckforschung, Potsdam.
Christoph J. Wruck, Thomas Pufe, Monika Stoll, Marie L. Kruse und Thomas Unger.
Ein neues Bindeprotein für den AT2-Rezeptor.
- 12.10.2002 7th Annual Meeting of the European Council for Blood Pressure and Cardiovascular Reseache (ECCR), Seeheim.
Christoph J. Wruck, Thomas Pufe, Monika Stoll, Marie L. Kruse and Thomas Unger. Cloning and Characterization of a Novel 49 kDa Protein Interacting with the Angiotensin AT2 Receptor.
- 15.11.2002 Deutsche Liga zur Bekämpfung des hohen Blutdrucks und die Deutsche Hypertonie Gesellschaft, Hypertonie 2002, Dresden.
Christoph J. Wruck, Thomas Pufe, Monika Stoll, Marie L. Kruse und Thomas Unger.
Interaktion des AT2 Rezeptors mit einem neuen 49 kDa Protein, welches eine Rolle in der Signaltransduktion und Gen-Expression spielen kann.

11.2 Posterpräsentationen

- 12.10.2002 7th Annual Meeting of the European Council for Blood Pressure and Cardiovascular Reseache (ECCR), Seeheim.
Christoph J. Wruck, Thomas Pufe, Monika Stoll, Marie L. Kruse and Thomas Unger.
The Function of the C-Terminal Cytoplasmic Tail of the Angiotensin AT1 and AT2 Receptor in Internalization and Signal Transduction.
- 15.11.2002 Deutsche Liga zur Bekämpfung des hohen Blutdrucks und die Deutsche Hypertonie Gesellschaft, Hypertonie 2002, Dresden.
Christoph J. Wruck, Thomas Pufe, Monika Stoll, Marie L. Kruse und Thomas Unger.
Die Rolle der C-terminalen intrazellulären Domäne der Angiotensin AT1 und AT2 Rezeptoren in Internalisation und Signal-Übertragung.
- 02.10.2005 9th Annual Meeting of the European Council for Cardiovascular Research (ECCR), La Colle sur Loup, Nice, France.
Christoph J. Wruck, Thomas Pufe, Heike Kusserow, Mario Menk, Heiko Funke-Kaiser, Jan Schefe, Marie L. Kruse, Monika Stoll and Thomas Unger.
Regulation of transport of the angiotensin AT2 receptor by a novel membrane-associated Golgi protein.

11.3 Publikationen

Zitierfähige Abstrakte:

Christoph J. Wruck, Thomas Pufe, Monika Stoll, Marie L. Kruse and Thomas Unger. Abstracts from the 7th Annual Meeting of the European Council for Blood Pressure and Cardiovascular Research (ECCR): The Lufthansa Training Centre, Seeheim, Germany, 11-13 October 2002 Hypertension 2002 40: 568

Buchartikel:

Christoph J. Wruck, Monika Stoll and Thomas Unger. AT 2 receptor function and target genes. Handbook of Experimental Pharmacology, Volume: Angiotensin, Chapter 20: AT2 receptor; Springer-Verlag, Heidelberg. 2004.

Originalarbeit:

Wruck CJ, Funke-Kaiser H, Pufe T, Kusserow H, Menk M, Schefe JH, Kruse ML, Stoll M, Unger T. (2005) Regulation of transport of the angiotensin AT2 receptor by a novel membrane-associated Golgi protein. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2005; 25:57-64.

12 Danksagung

Ich danke Prof. Dr. Thomas Unger für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, für hilfreiche und richtungsweisende Diskussionen sowie für die Schaffung eines großzügigen und konstruktiven wissenschaftlichen Umfeldes. Zudem möchte ich mich bei ihm für die Möglichkeiten bedanken, meine Ergebnisse auf hochrangigen Kongressen vorzustellen.

Prof. Dr. Roeder danke ich für die freundliche Bereitschaft, die Betreuung dieser Arbeit innerhalb des Fachbereiches Zellbiologie zu übernehmen.

Weiterhin danke ich Prof. Dr. Monika Stoll Ihre Unterstützung und Diskussionsbereitschaft.

Mein Dank gilt auch Herrn PD Dr. Thomas Pufe, der mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand.

Für die engagierte Hilfe beim Verfassen der Publikation möchte ich Herrn Dr. Funke-Kaiser danken.

Frau Dr. Karen Tiede danke ich für ihre moralische Unterstützung, der immer währenden Diskussionsbereitschaft sowie der Hilfe beim „Layout“ und das sorgfältige Korrekturlesen dieser Arbeit.

Ich danke allen Laborkollegen für ihre Hilfsbereitschaft und ein gutes Arbeitsklima. Besonders bedanke ich mich bei Silke Horn und Micheline Neubert für ihre Hilfe bei Problemen des Laboralltages. Bei Frau Dr. Kruse möchte ich mich für die Unterstützung bei der Durchführung der konfokalen Immunfluoreszenzmikroskopie bedanken.

Vor allem und ganz besonders danke ich meiner Frau und meinen Kindern für ihre Unterstützung, ihr Verständnis und ihre Toleranz, wenn es mal wieder etwas später wurde als geplant.

13 Lebenslauf

| | |
|---------------|--|
| Name | Christoph Jan Wruck, geb.: Chmurzynski |
| Anschrift | Wilhelmshavener Str. 27 24105 Kiel Tel.: 0431/8888310 Mobil: 0177/4005887 Email: c.wruck@pharmakologie.uni-kiel.de |
| Geburtsdatum | 10.12.1964 |
| Geburtsort | Osnabrück |
| Familienstand | verheiratet, drei Kinder |

Schulbildung

| | |
|-------------------|--|
| 08.1971 – 06.1974 | Sankt Antonius Grundschule Osnabrück |
| 08.1974 – 06.1983 | Käthe Kollwitz Gymnasium Osnabrück |
| 08.1988 – 12.1990 | Abitur an dem Comenius-Kolleg in Mettingen |

Berufsausbildung

| | |
|-------------------|--|
| 07.1983 – 08.1985 | Ausbildung zum Industriekaufmann bei der Reichenbächer GmbH, Osnabrück |
| 08.1985 – 12.1986 | Tätig als Industriekaufmann bei der Karmann AG, Osnabrück |

Zivildienst

| | |
|-------------------|--|
| 01.1987 – 07.1988 | Zivildienst als Rettungssanitäter bei der Johanniter Unfall Hilfe, Osnabrück |
|-------------------|--|

Studium

| | |
|-------------------|--|
| 09.1991 – 09.1994 | Studium der Biologie an der Universität zu Osnabrück |
| 09.1994 – 07.1999 | Studium der Biologie an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel |
| 01.1999 – 07.1999 | Diplom am Institut für Immunologie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel bei Prof. Dr. Krönke |
| 07.1999 - heute | Doktorarbeit an dem Institut für Pharmakologie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel bei Prof. Dr. Unger |

14 Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass diese Dissertation, abgesehen von der Beratung durch meine akademischen Lehrer, nach Inhalt und Form meine eigene Arbeit ist. Sie wurde bisher an keiner anderen Stelle im Rahmen eines Promotionsverfahrens vorgelegt. Ein Teil der Ergebnisse dieser Arbeit wurde bereits in Form von Kongressbeiträgen und Publikationen veröffentlicht.

Kiel, den 23.05.2005