

Aus dem Institut für Pharmakologie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

## DISSERTATION

**Molekularbiologische Identifizierung und Charakterisierung des  
Transkriptionsfaktors *promyelocytic zinc finger protein*  
als direkten Protein-Interaktionspartner  
des Renin/Prorenin-Rezeptors**

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Jan Hendrik Schefe  
aus Braunschweig

Gutachter:

1. Herr Prof. Dr. med. Thomas Unger
2. Frau Prof. Dr. rer. nat. Monika Stoll
3. Herr Prof. Dr. rer. nat. A. H. Jan Danser

Datum der Promotion: 30. Januar 2009

# ZUSAMMENFASSUNG

“Education is an admirable thing.  
But it is well to remember from time to time,  
that nothing that is worth knowing can be taught.”

*Oscar Wilde*

## Inhaltsverzeichnis

Publikationen und Anteilserklärung.....	1
Abstract .....	2
Einleitung .....	3
Zielstellung.....	3
Methodik und Ergebnisse.....	4
Diskussion .....	8
A. Identifizierung und Charakterisierung eines direkten Protein-Interaktionspartners des Renin/Prorenin-Rezeptors.....	8
B. Datenanalytik von quantitativen <i>real-time</i> PCR-Daten .....	11
Literaturverzeichnis.....	13
Publikation 1: Wruck et al., Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005. ....	P1
Publikation 2: Scheffe et al., Circ Res, 2006. ....	P2
Publikation 3: Scheffe et al., J Mol Med, 2006. ....	P3
Lebenslauf .....	Z1
Erklärung.....	Z2
Danksagung.....	Z3

## Publikationen und Anteilserklärung

- [P1] Wruck CJ, Funke-Kaiser H, Pufe T, Kusserow H, Menk M, Scheffe JH, Kruse ML, Stoll M, Unger T. Regulation of transport of the angiotensin AT2 receptor by a novel membrane-associated Golgi protein. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005 Jan;25:57-64. (IF<sub>2005</sub> = 7,1)

*Der experimentelle Anteil des Promovenden innerhalb dieser Publikation bestand in der Klonierung von diversen Plasmiden, ihrer Transfektion und der Durchführung von Koimmunpräzipitations-Experimenten. Die Anfertigung des Manuskripts wurde zu einem Drittel vom Promovenden übernommen.*

[Gesamt-Arbeitsanteil des Promovenden: 20%]

- [P2] Scheffe JH, Menk M, Reinemund J, Effertz K, Hobbs R, Pandolfi PP, Ruiz P, Unger T, Funke-Kaiser H. A novel signal transduction cascade involving direct physical interaction of the renin/ prorenin receptor with the transcription factor PLZF. *Circ Res* 2006;99:1355-1366. (IF<sub>2005</sub> = 9,4)

*Die Experimente dieser Publikation wurden ausschließlich vom Promovenden durchgeführt. Die konzeptionelle Planung dieses Projektes sowie die Anfertigung des Manuskriptes wurden gleichberechtigt von Letztautor und Promovend vorgenommen.*

[Gesamt-Arbeitsanteil des Promovenden: 80%]

- [P3] Scheffe JH, Lehmann KE, Buschmann IR, Unger T, Funke-Kaiser H. Quantitative real-time RT-PCR data analysis: current concepts and the novel "gene expression's C<sub>T</sub> difference" formula. *J Mol Med* 2006 Nov;84:901-10. (IF<sub>2005</sub> = 4,7)

*Die konzeptionelle Planung sowie die mathematischen Berechnungen (einschließlich ihrer experimentellen Verifikation) dieser Publikation wurden zum überwiegenden Teil vom Promovenden durchgeführt. Das Manuskript wurde arbeitsteilig mit dem Letztautor angefertigt.*

[Gesamt-Arbeitsanteil des Promovenden: 70%]

## Abstract

*Ad [P1]* – Das Renin-Angiotensin-System (RAS) ist in ein großes Spektrum an physiologischen und pathophysiologischen Prozessen im Organismus involviert, wobei es seine Effekte ausschließlich über zwei Rezeptoren, den Angiotensin-AT1- und AT2-Rezeptor, vermittelt. Innerhalb von [P1] konnte mittels *yeast two-hybrid screening* (Y2H) gezeigt werden, dass der C-Terminus des AT2-Rezeptors mit dem Golgi-Apparat-assoziierten Protein ATBP50 interagiert. Dieser neue Protein-Interaktionspartner konnte als notwendiges Protein für den Export des AT2-Rezeptors aus dem endoplasmatischen Retikulum (ER) charakterisiert werden: Eine durch siRNA induzierte Suppression von ATBP50 resultierte in einer Retention des Rezeptors im ER und seiner reduzierten Detektierbarkeit an der Zellmembran. Darüber hinaus wurde innerhalb dieses Experimentes eine Aufhebung der antiproliferativen Effekte der AT2-Rezeptor-Aktivierung unter Verwendung von siRNA gegen ATBP50 beobachtet.

*Ad [P2]* – Eine der jüngsten Entdeckungen innerhalb des RAS stellt der Renin/Prorenin-Rezeptor (RER) dar. An diesem Rezeptor wirken Renin und Prorenin als Liganden, wobei ihre enzymatische Aktivität im Sinne einer Prozessierung von Angiotensinogen zu Angiotensin I um ein Mehrfaches ansteigt. Darüber hinaus initiieren diese Liganden eine Signaltransduktionskaskade, deren Erforschung Gegenstand von [P2] war. Mittels Y2H wurde der Transkriptionsfaktor *promyelocytic zinc finger protein* (PLZF) als direkter Interaktionspartner des RER identifiziert und mittels Koimmunpräzipitation bestätigt. Eine Homodimerisierung des RER konnte ebenfalls nachgewiesen werden. Nach Aktivierung des RER mit Renin transloziert PLZF in den Nukleus, um dort die Transkription des RER selbst zu reprimieren, bzw. die Transkription von PI3K-p85 $\alpha$  zu aktivieren. Diese Effekte waren durch siRNA gegen den RER aufhebbar. *Site-directed mutagenesis* von Promotorkonstrukten sowie *electrophoretic mobility shift-assay* (EMSA) konnten ein PLZF-*cis*-Element innerhalb des RER-Promotors nachweisen. Chromatin-Immunpräzipitations-Experimente wiesen eine 6-fach gesteigerte Rekrutierung von PLZF auf diesen Promotorabschnitt unter Renin-Stimulation nach. Renin-Stimulation verursachte ebenfalls eine Zunahme der Zellzahl sowie eine Abnahme der Apoptose, wobei diese Effekte durch PI3K-Inhibition partiell und durch siRNA gegen PLZF vollständig aufgehoben werden konnten. mRNA-Expressionsuntersuchungen von RER und PI3K-p85 $\alpha$  in Geweben von PLZF-*knockout*-Mäusen bestätigten die Signifikanz von PLZF als übergeordneten Regulator der Transkription dieser beiden Gene. Zusammenfassend konnte hiermit erstmalig eine Signaltransduktionskaskade des RER beschrieben und charakterisiert werden.

*Ad [P3]* – Quantitative Real-time PCR ist das mittlerweile am meisten verbreitete Verfahren zur Bestimmung von Genexpressionsleveln. [P3] fokussiert auf die Analyse und Auswertung der hierbei akquirierten Daten. Beide derzeit am häufigsten hierfür verwandten Verfahren, die  $\Delta\Delta C_T$ - und die Standardkurven-Methode, sind als unbefriedigend einzuschätzen. Aus diesem Grunde wurde innerhalb dieser Veröffentlichung eine Formel abgeleitet – die *Gene expression's C<sub>T</sub> difference (GED) formula* –, die eine effiziente, schnelle und präzise Berechnung von Genexpressionsleveln unter Berücksichtigung der individuellen Amplifikationseffizienzen jedes einzelnen PCR-Ansatzes ermöglicht.

## **Einleitung**

*Die im Rahmen der Koautorenschaft an [P1] gewonnenen, insbesondere methodischen Kenntnisse dienten im Wesentlichen der inhaltlichen und experimentellen Vorbereitung des Hauptprojektes [P2]. Aus diesem Grund und der gegebenen Umfangsrestriktion wird sich die folgende Zusammenfassung der Publikationen auf den Inhalt eben dieses Projektes sowie in kleineren Anteilen auf [P3] beschränken.*

Das Renin-Angiotensin-System (RAS) ist ein Hormonsystem, dessen Effektorpeptid Angiotensin II über den Angiotensin-AT1- und AT2-Rezeptor vielfältige zelluläre Effekte vermittelt, die in zahlreiche physiologische und pathophysiologische Prozesse innerhalb des Organismus involviert sind (de Gasparo, 2000). Renin und Prorenin sind klassischerweise (Pro-) Enzyme innerhalb des RAS, die die Umwandlung von Angiotensinogen zum Decapeptid Angiotensin I enzymatisch vermitteln. Im Jahre 2002 wurde ein Renin/Prorenin-Rezeptor (RER) kloniert, der Renin und Prorenin spezifisch bindet und offenbar eine duale molekulare Funktion besitzt: (1.) Rezeptor-gebundenes Renin zeigt eine ca. 5-fach erhöhte katalytische Aktivität; das nativ enzymatisch inaktive Prorenin gewinnt (an den RER gebunden) eine katalytische Aktivität, die vergleichbar zu frei in Lösung befindlichem Renin ist; (2.) Renin und Prorenin initiieren in ihrer Funktion als Ligand am RER jeweils auch eine Signaltransduktionskaskade, die eine Phosphorylierung des Rezeptors sowie eine Aktivierung der *MAP (mitogen-activated protein) kinases* ERK1 und ERK2 involvieren sollen (Nguyen, 2002). Die Expression von mRNA des RER wurde im Rahmen der genannten Studie auf hohem Niveau in Hirn, Herz und Plazenta nachgewiesen, während eine niedrigere Expression in Niere, Leber und Pankreas detektiert wurde.

## **Zielstellung**

Der wissenschaftliche Erkenntnisstand über die Signaltransduktion des RER und insbesondere deren Mechanismen war zu Beginn dieses Projektes rudimentär. Initial sollten deshalb die genetischen und molekularen Eigenschaften dieses Proteins (sein grundlegendes Expressionsmuster, seine Promotorarchitektur sowie seine intrazelluläre Lokalisation) untersucht werden. Der Schwerpunkt dieses Projektes sollte jedoch auf der Identifikation von direkten Protein-Interaktionspartnern des RER (mittels *yeast two-hybrid screening* und Ko-Immunpräzipitation) liegen, deren mechanistische und funktionelle Bedeutung im Rahmen sich anschließender Experimente weitergehend analysiert werden sollte.

Die im Rahmen dieses Projektes unter anderem angewandte Methode der quantitativen Real-time PCR (qPCR) stellt sich insbesondere in Bezug auf deren übliche Datenanalytik als logisch bzw. ökonomisch unbefriedigend dar. In diesem Zusammenhang sollte zusätzlich eine Methode der Datenanalyse entwickelt werden, die den Maßstäben der Präzision, Validität und Ökonomie in höherem Maße Rechnung tragen kann.

## Methodik und Ergebnisse

Zur Analyse des Expressionsmusters des RER wurde Gesamt-RNA mittels Silica-Membran-Säulen aus diversen humanen Zelllinien (neuronal, glial, epithelial und endothelial) sowie humanem Nieren- und Herzgewebe präpariert. Die cDNA-Synthese wurde im Rahmen einer reversen Transkription unter Benutzung einer M-MLV-RT nach Standard-Protokoll durchgeführt. Alle Proben wurden schließlich durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR) bezüglich ihrer Expression diverser Gene des RAS [RER, Angiotensin-AT1- und AT2-Rezeptor, Angiotensinogen, Renin und *angiotensin-converting enzyme* (ACE)] sowie dreier sog. *housekeeping*-Gene zur Standardisierung [Hypoxanthin-Phosphoribosyltransferase (HPRT), Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) und  $\beta$ -Actin] untersucht. Im Gegensatz zu allen anderen genannten Komponenten des RAS, die hier untersucht wurden, konnte eine zwar quantitativ variable, jedoch ubiquitäre Expression des RER nachgewiesen werden (P2, Fig. 1A). Dieser Befund wurde im Rahmen eines *Northern blots* auf den RER unter Benutzung von  $\beta$ -Actin zur Standardisierung bestätigt (P2, Fig. 1B). Hierfür wurde Gesamt-RNA in einem SDS-Gel aufgetrennt, auf eine Nitrocellulose-Membran geblottet und die genannten mRNAs mittels einer radioaktiven genspezifischen DNA-Sonde detektiert. Auf diesem Wege konnte nicht nur die breite Expression des RER, sondern auch sein quantitativ hohes Expressionsniveau demonstriert werden.

Die Erklärung für diese Expressionseigenschaften lieferten anschließende Studien des RER-Promotors. Im Rahmen einer RNA-Ligase-vermittelten 5'-RACE wurden die transkriptionellen Startpunkte des RER-Promotors determiniert. Hierbei wurde auf mit einem *cap* versehene RNA – somit mRNA – selektiert und innerhalb zweier sog. *nested PCRs* mit Primer-Spezifität für den RER-Promotor amplifiziert. Diese PCR-Produkte wurden subkloniert und sequenziert. Im Resultat ergab dies multiple transkriptionelle Startpunkte zwischen 76 und 125 bp *upstream* des translationalen Startpunktes (P2, Fig. 2A). Diese Ergebnisse sind konsistent mit der TATA-Box-freien Architektur dieses Promotors.

Im Anschluss wurden Abschnitte des RER-Promotors unterschiedlicher Längen in einen *firefly*-Luziferase-exprimierenden Vektor kloniert, die 165 [-165;-1], 500 [-500;-1] bzw. 1100 bp [-1100;-1] unmittelbar *upstream* des translationalen Startpunktes überspannen. Diese Plasmide wurden in drei verschiedene, humane Zelllinien transfiziert und im Rahmen eines entsprechenden Luziferase-Assays (unter Benutzung einer kotransfizierten Renilla-Luziferase zur Standardisierung) untersucht. Hierbei zeigte sich, dass der RER in allen drei benutzten humanen Zelllinien eine ausgesprochen hohe Promotoraktivität besitzt, die die des ECE-1c-Promotors, der als starker *housekeeping*-Promotor bereits bekannt ist (Funke-Kaiser, 2000), um ein Vielfaches übertrifft. Maximale relative Luziferase-Aktivität wurde ab dem 500 bp überspannenden Promotor-Konstrukt beobachtet, wohingegen das 126 bp-Konstrukt noch eine deutlich geringere Aktivität aufwies; zwischen 500 bp- und 1100 bp-Konstrukt bestanden keine signifikanten Unterschiede (P2, Fig. 2B).

Im Rahmen der basalen Charakterisierung des RER sollte auch seine subzelluläre Lokalisation bestimmt werden. Hierfür wurde die vollständige *coding sequence* (CDS) des RER mit C-terminalem

FLAG- bzw. c-myc-tag in den Expressionsvektor pCEP4 subkloniert und in HeLa-S3-Zellen transfiziert. In der nachfolgend durchgeführten Immunzytologie wurden die fusionierten tags mittels Epitop-spezifischem Primärantikörper und fluoreszenzmarkiertem Sekundärantikörper detektiert und der Zellkern mit DAPI angefärbt. Im Rahmen der Fluoreszenzmikroskopie konnte ein perinukleäres Verteilungsmuster des RER ohne detektierbare Akkumulationen in der Zytoplasmamembran nachgewiesen werden (P2, Fig. 3B). Für detailliertere Studien der subzellulären Lokalisation wurden die komplette CDS (RER full) sowie zwei Mutanten des RER in N- bzw. C-terminal EGFP-exprimierende Plasmide (pEGFP-N1 und -C3) subkloniert. Die erste Mutante (RER K/R mut) entsprach der kompletten CDS des RER, wobei die terminalen 5 Aminosäuren (aa) der Sequenz KXXXX – entsprechend eines putativen Retentionssignals für das endoplasmatische Retikulum (ER) – zu RXXXX punktmultiert wurden. Die zweite Mutante (RER ATPase) bestand aus den C-terminalen 69 aa des RER, die im Rahmen einer Vorpublikation als Komponente einer lysosomalen V-ATPase beschrieben wurden (Ludwig, 1998). Alle drei Konstrukte wurden erneut in HeLa-S3-Zellen transfiziert, wobei vor der fluoreszenzmikroskopischen Auswertung der Zellkern, das ER bzw. die Lysosomen mit spezifischen Farbstoffen markiert wurden. Die komplette CDS des RER (RER full) kolokalisierte mit dem ER-Marker, wobei die Punktmutation des putativen ER-Retentionssignals zu einem Verlust der beschriebenen perinukleären ER-Lokalisation des RER führte. Die Mutante „RER ATPase“ zeigte eine gänzlich differente subzelluläre Lokalisation, die erwartungsgemäß mit dem lysosomalen Marker übereinstimmte (P2, Fig. 3C).

Neben diesen Experimenten, die der grundsätzlichen molekularen Charakterisierung des RER dienen sollten, lag der Fokus vor allem auf der Signaltransduktion des RER und insbesondere der Identifikation direkter Protein-Interaktionspartner. Hierfür wurde ein *yeast two-hybrid screening* durchgeführt. In diesem Rahmen wurde die vollständige CDS des RER in den *bait*-Vektor pBTM117c kloniert, der das *insert* in Fusion mit einer LexA-DNA-Bindungsdomäne exprimiert. Dieses Konstrukt wurde in Hefezellen (*Saccharomyces cerevisiae*, Typ L40) mit einer cDNA-Bibliothek aus humanem Herzgewebe, die an eine GAL4-Aktivierungsdomäne fusioniert war, kotransformiert. Positive Klone wurden auf einem Minimalmedium ohne Histidin, Leucin und Tryptophan sowie mittels eines anschließenden  $\beta$ -Galaktosidase-Assays selektiert und im Rahmen einer Re-Transformation bestätigt. Die positiven Klone wurden sequenziert und mittels BLASTn-Analysen identifiziert. Hierbei wurde das C-terminale Drittel von PLZF (*promyelocytic zinc finger protein*) in vier Klonen, von denen drei unabhängig voneinander waren, als putativer Interaktionspartner des RER identifiziert. Diese putative Interaktion wurde durch Ko-Transfektion von C-terminal FLAG-getagtem RER und C-terminal c-myc-getagtem PLZF in HEK293-Zellen untersucht. Mit diesen Zellen wurde eine Ko-Immunpräzipitation durchgeführt, die sowohl durch FLAG-tag-, als auch c-myc-tag-spezifische Antikörper eine Kopräzipitation beider transfizierter Proteine im *Western blot* detektierbar machte, wobei alle durchgeführten Kontrollen entsprechend negativ waren (P2, Fig. 4A). Diese Kopräzipitation bzw. Interaktion konnte auch im nativen Kontext in nicht-transfizierten Zellen unter Verwendung von Antikörpern gegen RER und PLZF verifiziert werden (P2, Fig. 4B). Zur Identifikation der Interaktionsdomäne des RER mit PLZF wurde die komplette CDS des

RER (RER full) sowie eine N-terminal um 16 aa deletierte (RER N-term del) und C-terminal um 17 aa deletierte Mutante (RER C-term del) des RER in EGFP-Fusionplasmide kloniert und jeweils mit c-myc-getagtem PLZF kotransfiziert. Die anschließende Immunpräzipitation mit einem c-myc-Antikörper zeigte eine Kopräzipitation von „RER full“ und „RER N-term del“, wohingegen „RER C-term del“ ebenso wie das transfizierte EGFP allein nicht mit PLZF kopräzipitierten. Hiermit konnten die C-terminal letzten 17 aa des RER als Interaktionsdomäne identifiziert werden (P2, Fig. 4C). Darüber hinaus war es auch möglich, eine Homodimerisierung des RER mittels c-myc- und FLAG-getagtem RER nachzuweisen (P2, Fig. 4D).

In nun anschließenden Experimenten zur Analyse der intrazellulären Funktion der RER-PLZF-Interaktion wurde die Expression des RER in HEK293-Zellen, die sowohl den RER, als auch PLZF nativ exprimieren, untersucht. Renin-Stimulation genauso wie PLZF-Überexpression supprimierte jeweils die mittels qPCR bestimmte RER-mRNA. Beide Stimuli parallel zeigten additive Effekte im Sinne einer weitergehenden Suppression (P2, Fig. 5A). Diese Effekte wurden im Rahmen von Promotor-Luziferase-Assays bestätigt, in denen die bereits angeführten RER-Promotor-Konstrukte mit und ohne PLZF-Überexpression kotransfiziert wurden. Hierbei konnte eine Repression des RER-Promotor-Konstrukts [-1100;-1] unter PLZF-Kotransfektionsbedingungen nachgewiesen werden, was Hinweise auf die Existenz eines mittelbar oder unmittelbar auf PLZF responsiblen Elements im Promotorschnitt [-1100;-501] lieferte (P2, Fig. 5B).

Eine bioinformatische Analyse mittels des Programmes MatInspector (<http://www.genomatix.de>) identifizierte die putative PLZF-Konsensus-Sequenz 5'-AACTACAGTTTTTCAC im Intervall [-1097; -1083]. Diese wurde mittels dreier Nukleotidaustausche mutiert und im Vergleich mit dem nativen RER-Promotor [-1100;-1] in einem Promotor-Luziferase-Assay unter Renin- bzw. Vehikel-Stimulation sowie RER-mRNA-Suppression mittels RER-spezifischer siRNA bzw. *scrambled*-Kontroll-siRNA untersucht. Der native Promotor wurde erwartungsgemäß durch Renin in seiner Aktivität supprimiert, wobei siRNA gegen RER diesen Effekt aufheben konnte. Der mutierte Promotor zeigte eine höhere basale Aktivität als der native Promotor und reagierte nicht mehr auf Renin-Stimulation (P2, Fig. 5C).

Als weiteres putatives Zielgen der Renin-induzierten Aktivierung der RER-PLZF-Interaktion wurde das Gen PI3K-p85 $\alpha$  (Phosphatidylinositol-3-Kinase, p85 $\alpha$ -Untereinheit) untersucht, das bereits im Kontext einer Interaktion zwischen dem Angiotensin-AT2-Rezeptor und PLZF als *downstream target* identifiziert wurde (Senbonmatsu, 2003). Nach Subklonierung des PI3K-p85 $\alpha$ -Promotors in ein *firefly*-Luziferase-Plasmid, wurde dieser ebenfalls in HEK293-Zellen transfiziert und mit Renin bzw. Vehikel stimuliert sowie mit siRNA gegen RER bzw. *scrambled*-Kontroll-siRNA transfiziert. Es zeigte sich eine Aktivierung des Promotors unter Renin-Stimulation, die mit siRNA gegen den RER aufhebbar war (P2, Fig. 5D). Analoge Daten wurden im Rahmen der Quantifizierung der PI3K-p85 $\alpha$ -mRNA erhoben, wobei die Ausprägung dieser Effekte auf mRNA-Ebene durch Überexpression von PLZF zusätzlich gesteigert werden konnten (P2, Fig. 5E).

Um das Verhalten von PLZF nach Renin-Stimulation des RER näher zu untersuchen, wurde eine mögliche Translokation von transfiziertem C-terminal c-myc-getagtem PLZF in HEK293-Zellen auf diesen Stimulus hin geprüft. Hierfür wurden die nukleären und zytosolischen Proteine separat präpariert und mittels entsprechender Antikörper im *Western blot* detektiert. Dabei wurde eine Translokation von PLZF in den Nukleus beobachtet, die erneut durch siRNA gegen den RER blockiert werden konnte (P2, Fig. 6A). In einem weiteren Schritt wurde mittels Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP) eine 6-fach erhöhte Rekrutierung von PLZF auf den RER-Promotor nach Renin-Stimulation nachgewiesen (P2, Fig. 6B). Bei diesem Verfahren wird zu einem gegebenen Zeitpunkt ein sog. *crosslink* zwischen DNA und Proteinen mittels Formaldehyd vorgenommen, woraufhin im Anschluss mittels Sonifikation und den daraus resultierenden Scherkräften die chromosomale DNA samt den kovalent gebundenen DNA-bindenden Proteinen in Abschnitte von im Mittel 500 bp gespalten wird. Nach Immunpräzipitation der zu untersuchenden Proteine (in diesem Fall PLZF) mit entsprechenden Antikörpern werden diese mittels eines Proteinase-K-Verdau abgebaut und die vormals gebundene chromosomale DNA mittels qPCR auf den Rekrutierungsgrad des immunpräzipitierten Proteins auf dem per PCR amplifizierten DNA-Abschnitt untersucht. Eine große Anzahl von Positiv- und Negativ-Kontrollen ebenso wie einige Standardisierungs-ChIPs wurden parallel durchgeführt. In ebenfalls durchgeführten *electrophoretic mobility shift assays* (EMSA) konnte darüber hinaus mittels radioaktiv-markierter DNA-Bindungsmotive des RER-Promotors (nativ und mutiert, s.o.) sowie des PI3K-p85 $\alpha$ -Promotors als Positiv-Kontrolle eine Bindung von PLZF an diese nativen Motive – nicht jedoch an die mutierte Form – durch Nachweis eines PLZF-Antikörper-induzierten sog. *super-shifts* bewiesen werden (P2, Fig. 6C).

In Folgeexperimenten sollten nun die zellulären Effekte der Renin-Stimulation sowie die Signifikanz von PLZF und PI3Ks im Zusammenhang mit dem Renin-RER-PLZF-Signaltransduktionsweges näher untersucht werden. Hierfür wurden die Effekte pharmakologischer PI3K-Inhibition mit Wortmannin sowie PLZF-mRNA-Suppression mittels siRNA auf Zellproliferation und Apoptose, ebenso wie auf die bereits determinierten Regulationen der RER- und PI3K-p85 $\alpha$ -Transkription bestimmt. Hierbei wurden H9c2-Zellen (immortalisierte Kardiomyoblasten der Ratte) verwandt, wobei mögliche durch Angiotensin II vermittelte Effekte durch AT1-Rezeptor-Blockade mit Losartan und fehlende Nachweisbarkeit von AT2-Rezeptoren ausgeschlossen wurden. Zellproliferation bzw. Apoptose wurden mittels eines ATP-abhängigen bzw. Kaspase-3/7-abhängigen Luziferase-Assays bestimmt. Renin induzierte eine Zunahme der Zellzahl sowie eine Abnahme der Kaspase-Aktivität bzw. Apoptose, wobei diese Effekte jeweils durch Wortmannin zum Teil und durch siRNA gegen PLZF vollständig blockiert werden konnten (P2, Fig. 7A+B). In Bezug auf die Genexpression von RER und PI3K-p85 $\alpha$  konnte erneut eine Suppression respektive Induktion durch Renin beobachtet werden, die durch PLZF-siRNA jeweils weitgehend aufhebbar war. Wortmannin hatte keine Effekte auf die untersuchten Expressionslevel (P2, Fig. 7C+D).

In abschließenden Experimenten wurde die Signifikanz des Renin-RER-PLZF-Signaltransduktionsweges in einem *in vivo*-Kontext untersucht. Hierfür erhielten wir über einen Kooperationspartner (P. P. Pandolfi, New York, USA) Nieren-, Leber-, Herz- und Hirn-Gewebe aus

PLZF-*knockout*-Mäusen sowie den respektiven Wildtyp-Kontrollmäusen (C57BL6). In diesen Geweben wurden die mRNA-Level von RER, PI3K-p85 $\alpha$  und PLZF mit qPCR bestimmt. In Niere und Leber waren keine signifikanten Expressionsunterschiede bezüglich der RER- und PI3K-p85 $\alpha$ -mRNA zu determinieren, wobei in diesen Organen in beiden Gruppen auch keine PLZF-Expression detektierbar war. In Herz- und Hirngewebe jedoch, in denen eine PLZF-Expression in Wildtyp-Mäusen nachweisbar war, ergaben sich signifikant erhöhte Konzentrationen von RER-mRNA und signifikant erniedrigte Konzentrationen von PI3K-p85 $\alpha$ -mRNA in den PLZF-*knockout*-Mäusen (P2, Fig. 8A).

## Diskussion

### A. Identifizierung und Charakterisierung eines direkten Protein-Interaktionspartners des Renin/Prorenin-Rezeptors

Im Rahmen des Hauptprojektes dieser Arbeit konnte der Transkriptionsfaktor *promyelocytic zinc finger protein* (PLZF) als erster direkter Protein-Interaktionspartner des Renin/Prorenin-Rezeptors (RER) identifiziert werden. Darüber hinaus mündete eine weitergehende funktionelle Charakterisierung dieser Interaktion in der Beschreibung eines neuen Signaltransduktionsweges, der Renin, den RER und PLZF sowie zwei direkte Zielgene – den RER selbst und PI3K-p85 $\alpha$  – umfasst. Neben diesen rein genregulativen Effekten konnte ebenso ein pro-proliferativer und anti-apoptotischer Effekt der Aktivierung dieses Signaltransduktionsweges nachgewiesen werden. All diese Phänomene konnten *in vitro* in humanen epithelialen Zelllinien sowie immortalisierten Kardiomyoblasten der Ratte bestätigt werden. Ergebnisse aus Expressionsanalysen von PLZF-*knockout*-Mäusen konnten diese Ergebnisse weitergehend in einem *in vivo*-Kontext zusätzlich bestätigen.

Nach Aktivierung des RER mit Renin transloziert PLZF in den Nucleus und rekrutiert sich dort auf die Promotoren von PI3K-p85 $\alpha$  und dem RER selbst, wobei es hier sowohl als Aktivator wie auch als Repressor der Geneexpression – in Abhängigkeit des Promotorkontextes – wirkt. Auf diesem Wege, da ein direkter Interaktionspartner eines Rezeptors unmittelbar auch als Transkriptionsfaktor auf dessen Promotor wirkt, ergibt sich eine außergewöhnlich kurze negative *feedback*-Schleife. Ein derartig kurzer und direkter Signaltransduktionsweg konnte in dieser Form erst im Zusammenhang einiger weniger Signaltransduktionswege [SMAD, JAK-STAT, Notch und SREBP (Brivanlou, 2002; Emery, 2001)] beschrieben werden. Die Existenz eines PLZF-*cis*-Elements im RER-Promotor und somit einer direkten Protein-DNA-Interaktion konnte durch *site-directed mutagenesis* dieses Motivs mittels Luziferase-Promotor-Assays nachgewiesen werden. Diese Bindung wurde im Rahmen von EMSAs inklusive eines PLZF-spezifischen *super-shift* verifiziert. Darüber hinaus konnte unter nativen Bedingungen mittels ChIP eine deutlich erhöhte Rekrutierung von PLZF auf den entsprechenden RER-Promotor-Abschnitt nach Renin-Stimulation nachgewiesen werden. Die in der Literatur bisher kontrovers diskutierte Frage, ob das sog. RER-Protein tatsächlich einen Rezeptor für Renin/Prorenin darstellt, konnte durch Einsatz von RER-siRNA in diversen Experimenten beantwortet werden. Alle durch Renin induzierten Effekten waren durch

Suppression des RER eindeutig aufzuheben, womit die Existenz des RER im eigentlichen Sinne bestätigt werden konnte. Weiterhin konnten zelluläre Effekte im Sinne einer Zunahme der Zellzahl sowie einer Abnahme der apoptotischen Aktivität unter Aktivierung des RER demonstriert werden. Durch Einsatz von siRNA gegen PLZF konnte gezeigt werden, dass dieser Effekt hauptsächlich durch PLZF vermittelt ist, wohingegen pharmakologische Inhibition des *PLZF-downstream targets* PI3Ks mit Wortmannin erwartungsgemäß diese Renin-induzierten Effekte nur in einem geringeren Maße beeinflussen konnten. Abschließend konnten Experimente in *PLZF-knockout*-Mäusen zeigen, dass die Abwesenheit von PLZF eine Aufhebung der Repression der RER-mRNA sowie eine Zunahme der PI3K-p85 $\alpha$ -mRNA in Organen, die endogen im Wildtyp PLZF exprimieren, verursacht.

*Subzelluläre Lokalisation* – Die Ergebnisse dieser Studie stützen die im Jahre 2002 publizierten Daten (Nguyen, 2002) im Sinne der Existenz eines Rezeptormoleküls für Renin sowie der Initiierung signaltransduktorischer Effekte durch den Liganden Renin. Konträre Ergebnisse ergeben sich jedoch in Hinblick auf die subzelluläre Lokalisation des RER, die in der besagten Publikation als Zytoplasmamembran-ständig beschrieben wurde. Hingegen haben sämtliche, hier vorgestellte Experimente – unter Verwendung verschiedener Konstrukte, *tags* und Mutagenesen – eindeutig eine intrazelluläre, nämlich perinukleäre und mit dem endoplasmatischen Retikulum (ER) übereinstimmende Lokalisation nachgewiesen. Die zu beanstandende Qualität (geringe Auflösung, fehlende Negativ-Kontrollen) der von Nguyen et al. publizierten Immunzytologien sowie die in dieser Publikation beschriebene Verwendung von Membranlysaten, die im Allgemeinen nicht nur die Zytoplasmamembranen, sondern auch intrazelluläre Membranen und ihre Proteine beinhalten, beeinträchtigen die Validität dieser Daten. Vielfach in der Literatur diskutierte Artefakte durch Überexpression von getaggten Proteinen vermochten wir, durch Einsatz unterschiedlicher *tags* (c-myc, FLAG und EGFP) und ihrer Lokalisationen (jeweils N- und C-terminale Fusionen) bei konstant und gleichbleibend zu erhebenden Lokalisationsbefunden auszuschließen. Die Punktmutation des bereits beschriebenen atypischen ER-Retentions-Motivs KXXXX (Vincent, 1998) und die damit verbundene Aufhebung der perinukleären Lokalisation unterstützen weiterhin die hier dargestellten Beobachtungen.

Die beobachtete intrazelluläre Lokalisation des RER wirft die Frage auf, wie der gemeinhin extrazellulär lokalisierte Ligand (Renin) eine Aktivierung zu induzieren vermag. Hierfür können mehrere Mechanismen in Betracht gezogen werden. (1.) Andere, bereits bekannte Renin-bindende Proteine, wie der Mannose-6-Phosphat-Rezeptor, könnten (Pro-) Renin internalisieren (Danser, 2005). (2.) Eine intrazelluläre Variante des Renins, die über ein alternatives *splicing* transkribiert wird und direkt an den intrazellulären RER binden könnte, ist in der Literatur beschrieben worden (Lee-Kirsch, 1999; Clausmeyer, 1999). Die physiologische Signifikanz dieses intrazellulären Renins inklusive seines Expressionsmusters in verschiedenen Geweben ist jedoch bisher weitgehend unerforscht. (3.) Trotz der Beobachtung größter Anteile des RER in intrazellulären Kompartimenten bleibt die Lokalisation kleinerer Mengen dieses Proteins in der Zytoplasmamembran, die für eine Initiation von

Signaltransduktionseffekten suffizient wären, unter Berücksichtigung der hier verwandten Methoden nicht ausgeschlossen. In diesem Zusammenhang vermag die hier erstmals beschriebene Homodimerisierung des RER von zusätzlicher Bedeutung zu sein, da der Dimerisierungsstatus von Proteinen ihre subzelluläre Lokalisation zusätzlich beeinflussen kann (Muller, 2003).

*Promyelocytic zinc finger protein (PLZF)* – Der Transkriptionsfaktor PLZF enthält mehrere DNA-bindende Zinkfinger-Domänen. Herausragende klinische Bedeutung hat dieses Protein in der Pathogenese der akuten Promyelozyten-Leukämie (APL) mit der seltenen chromosomalen Translokation t(11;17)(q23;q21), durch die das PLZF-Gen unterbrochen wird (Costoya, 2001). Hierbei entstehen Fusionsproteine zwischen PLZF und dem Retinolsäure-Rezeptor- $\alpha$  (RAR- $\alpha$ ), die die Histone-Deacetylase 1 (HDAC1) aktivieren und nicht mehr gegenüber Retinolsäure responsibel sind, was das fehlende Ansprechen dieser seltenen APL-Form auf die sonstige Standardtherapie mit Retinolsäure erklärt (Grignani, 1998). Darüber hinaus hat man vor kurzem PLZF bereits als direkten Protein-Interaktionspartner des Angiotensin-AT2-Rezeptors beschrieben und in diesem Zusammenhang eine Stimulierung der Protein-Synthese und eine Induktion von kardialer Hypertrophie durch Aktivierung dieses Signaltransduktionsweges beobachten können (Senbonmatsu, 2003). Diese durch Angiotensin II vermittelten Effekte haben phänomenologische Ähnlichkeit mit den Renin-vermittelten Effekten der RER-Aktivierung.

Die im Rahmen anderer Studien ebenfalls untersuchten PLZF-*knockout*-Mäuse wurden bisher ausschließlich unter Gesichtspunkten ihrer gestörten muskuloskeletalen Embryologie untersucht (Barna, 2000). Weitergehende Studien mit kardiovaskulärem oder zerebralem Schwerpunkt sind bisher noch nicht durchgeführt worden.

*Biologische und klinische Signifikanz des RER* – Bezüglich der biologischen Signifikanz des RER *in vivo* konnten Ramser et al. zeigen, dass eine Mutation innerhalb des RER (mit sukzessiver Deletion des Exon 4) Ursache für *X-linked mental retardation* (XLMR) und *-epilepsy* (XLME) im Menschen sein kann (Ramser, 2005). Darüber hinaus konnte im Rahmen eines Zebrafisch-Mutagenese-Screenings gezeigt werden, dass der *knockout* des RER zu einer dramatischen Reduktion der Kopfgröße sowie hochgradigen Nekrosen des zentralen Nervensystems führt (Amsterdam, 2004). Bemerkenswerterweise schreibt man dem RER-Interaktionspartner PLZF eine ausgesprochen komplexe und wichtige Bedeutung in der zerebralen Embryologie mit Formation und Reifung von Prosenzephalon und Rhombenzephalon zu (Cook, 1995; Avantaggiato, 1995), wobei ein direkter Zusammenhang zwischen Phänotyp des RER-*knockouts* im Zebrafisch und damit verbundenen, fehlenden PLZF-Effekten derzeit einen rein hypothetischen Charakter besitzt und weiterer Studien bedürfte.

Publikationen der letzten zwei Jahre haben die klinische Relevanz des RER bereits unterstrichen. So konnte ein *decoy*-Peptid gegen die *handle region* von Prorenin, das die Bindung von Prorenin an den RER inhibiert, die Entwicklung und Progression von kardialer Fibrose ebenso wie diabetischer Nephropathie in

entsprechenden Ratten-Modellen inhibieren (Ichihara, 2004; Ichihara, 2005; Ichihara, 2006). Ebenso konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung des RER den profibrotischen Faktor *transforming growth factor- $\beta_1$*  (TGF $\beta_1$ ) in mesangialen Zellen induziert (Huang, 2006).

*Renin-Inhibition und der Renin/Prorenin-Rezeptor* – Auch aus klinisch-pharmakologischer Sicht könnte der RER in Bezug auf die Markteinführung des Renin-Inhibitors Aliskiren (Zulassung in den USA seit März 2007) von Bedeutung sein. Diese Pharmaka inhibieren die Plasma-Renin-Aktivität und damit die Generierung von Angiotensin I nahezu vollständig, womit sie die dritte pharmakologische Klasse der RAS-Inhibitoren – neben ACE-Inhibitoren und AT1-Rezeptor-Blockern – darstellen (Hershey, 2005). Neben seiner Funktion als potentes Antihypertensivum durch RAS-Inhibition steigert Aliskiren jedoch durch Aufhebung des negativen *feedbacks* auf die renale Renin-Freisetzung (durch Angiotensin II) die Plasma-Renin-Konzentration im Vergleich zu Placebo-behandelten Individuen auf bis zu 34-mal höhere Werte (Nussberger, 2002). In diesem Zusammenhang ist die Untersuchung der über den RER-vermittelten intrinsischen Aktivität des Renins von herausragender Bedeutung. Bedenkt man die bereits oben angeführten tendenziell negativen Effekte der RER-Aktivierung (Aktivierung von MAP-Kinasen, Pro-Proliferation und gesteigerte TGF- $\beta_1$ -Expression) sowie die gegensätzlichen, eher positiven Effekte der Inhibierung von Prorenin als RER-Ligand (Inhibition von kardialer Fibrose und diabetischer Nephropathie) sollte die durch einen Renin-Inhibitor bedingte Steigerung der Plasma-Renin-Konzentration dringend weitergehend bezüglich einer möglichen Endorgan-Schädigung untersucht werden.

#### B. Datenanalytik von quantitativen Real-time PCR-Daten

Im Rahmen des hauptsächlich innerhalb dieser Zusammenfassung besprochenen Projektes wurde mehrfach die Methode der quantitativen Real-time PCR (qPCR) experimentell eingesetzt. Aufgrund einiger wesentlicher Nachteile der gegenwärtig verwendeten Methoden der Datenanalyse sollten in einem Nebenprojekt diese im Sinne einer verbesserten Validität, Präzision und Ökonomie überdacht und verbessert werden.

Das Verfahren der qPCR basiert ganz allgemein auf einer gewöhnlichen PCR, die durch Einsatz von Fluoreszenzfarbstoffen [z.B. dsDNA-interkalierende Substanzen (SYBR Green I) oder fluoreszenzmarkierten, genspezifischen DNA-Sonden (TaqMan, molecular beacons, etc.)] und entsprechenden Geräten, die DNA-Amplifikation innerhalb der PCR „*in real time*“ aufzeichnen können. Die dabei entstehenden sog. Amplifikationskurven verschiedener (c)DNA-Proben werden in Bezug auf ihren  $C_T$ -Wert („cycles on threshold“), d.h. die PCR-Zyklusanzahl, an der die Kurven jeweils einen einheitlich definierten Schwellenwert erreichen, zueinander in Verhältnis gesetzt und relativ bzw. absolut quantifiziert. Für diese Quantifizierung sind vor allem zwei Verfahren – die  $\Delta\Delta C_T$ -Methode (Livak, 2001) und die Standardkurven-Methode (Morrison, 1998) – etabliert. Die  $\Delta\Delta C_T$ -Methode basiert auf der Grundannahme, dass die PCR eine Amplifikationseffizienz  $E$  von 100% erreicht und damit mit jedem

PCR-Zyklus eine Verdopplung der PCR-Produkte erreicht. Aus dieser Annahme heraus lassen sich  $C_T$ -Wert-Differenzen in quantitative Unterschiede der Proben zueinander berechnen. Der Alternativ-Weg besteht in der Standardkurven-Methode, die das Mitführen einer Standard-Verdünnungsreihe parallel zu jeder Messung notwendig macht. Auf diese Standardreihe können anschließend die einzelnen Proben bezogen und damit (auch absolut) quantifiziert werden. Beide Methoden erscheinen jedoch als nicht suffizient. Die  $\Delta\Delta C_T$ -Methode geht von der inkorrekten Annahme aus, dass PCR-Effizienzen stets bei 100% liegen, was zumeist nicht der Fall ist, womit Expressionsunterschiede (bei  $E < 1$ ) stets überschätzt werden. Die Standardkurven-Methode wiederum hat den großen Nachteil, dass in jedem qPCR-Durchlauf eine große Anzahl an Standards mitgeführt werden muss, was die Anzahl messbarer Proben pro Lauf einschränkt und die entstehenden Kosten nachhaltig steigert. Beiden Methoden gemein ist ihre mangelnde Detektion der Amplifikationseffizienzen jeder einzelnen PCR und jeder einzelnen Probe. Hierbei ist anzumerken, dass ein verhältnismäßig kleiner Effizienzunterschied von beispielsweise  $E_1 = 0,85$  zu  $E_2 = 0,70$  in Proben identischer, genspezifischer Ausgangskonzentrationen in einer  $C_T$ -Wert-Differenz von 4 enden kann und damit eine Expressionsrate von 1 zu 16 (bei Annahme von  $E_1 = E_2 = 1,0$ ) in diesen eigentlich identischen Proben berechnet würde (P3, S. 904).

Ein neues, zu entwickelndes Verfahren der Datenanalyse sollte diese methodischen und inhaltlichen Nachteile kompensieren. Zu diesem Zweck wurde die der PCR-Kinetik in ihrer exponentiellen Phase zugrunde liegende Formel dahingehend abgeleitet, dass die in dieser Phase akquirierten  $C_T$ -Werte jeder einzelnen Probe und jeder einzelnen PCR unter Berücksichtigung ihrer jeweiligen PCR-Effizienzen  $E$  in die Berechnung der Expressionswerte einbezogen werden. Software, die diese individuelle Effizienzbestimmung ermöglicht, ist mittlerweile in einigen Varianten und teils auch kostenlos verfügbar (Peirson, 2003; Ramakers, 2003). Auf diesem Wege wurde ein Verfahren der qPCR-Datenanalyse entwickelt, das (1.) ohne zusätzliche Standards auskommt, (2.) mit korrekt quantifizierten PCR-Effizienzen rechnet, und (3.) „Ausreißer“ in Bezug auf PCR-Effizienzen detektiert und entsprechend in der Datenanalyse berücksichtigen bzw. ausschließen kann.

## Literaturverzeichnis

Amsterdam A, Nissen RM, Sun Z, Swindell EC, Farrington S, Hopkins N. Identification of 315 genes essential for early zebrafish development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101:12792-12797.

Avantaggiato V, Pandolfi PP, Ruthardt M, et al. Developmental analysis of murine Promyelocyte Leukemia Zinc Finger (PLZF) gene expression: implications for the neuromeric model of the forebrain organization. *J Neurosci*. 1995;15:4927-4942.

Barna M, Hawe N, Niswander L, Pandolfi PP. Plzf regulates limb and axial skeletal patterning. *Nat Genet*. 2000;25:166-172.

Brivanlou AH, Darnell JE, Jr. Signal transduction and the control of gene expression. *Science*. 2002;295:813-818.

Clausmeyer S, Sturzebecher R, Peters J. An alternative transcript of the rat renin gene can result in a truncated prorenin that is transported into adrenal mitochondria. *Circ Res*. 1999;84:337-344.

Cook M, Gould A, Brand N, et al. Expression of the zinc-finger gene PLZF at rhombomere boundaries in the vertebrate hindbrain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92:2249-2253.

Costoya JA, Pandolfi PP. The role of promyelocytic leukemia zinc finger and promyelocytic leukemia in leukemogenesis and development. *Curr Opin Hematol*. 2001;8:212-217.

Danser AH, Deinum J. Renin, prorenin and the putative (pro)renin receptor. *Hypertension*. 2005;46:1069-1076.

Emery JG, Ohlstein EH, Jaye M. Therapeutic modulation of transcription factor activity. *Trends Pharmacol Sci*. 2001;22:233-240.

Funke-Kaiser H, Bolbrinker J, et al. Characterization of the c-specific promoter of the gene encoding human endothelin-converting enzyme-1 (ECE-1). *FEBS Lett*. 2000;466:310-316.

de Gasparo M, Catt KJ, Inagami T, Wright JW, Unger T. International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol Rev*. 2000;52:415-72.

Grignani F, De Matteis S, Nervi C, et al. Fusion proteins of the retinoic acid receptor-alpha recruit histone deacetylase in promyelocytic leukaemia. *Nature*. 1998;391:815-818.

Hershey JC, Steiner B, Fischli W, Feuerstein G. Renin inhibitors: An antihypertensive strategy on the verge of reality. *Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies*. 2005;2:181-185.

Huang Y, Wongamorntham S, Kasting J, et al. Renin increases mesangial cell transforming growth factor-beta1 and matrix proteins through receptor-mediated, angiotensin II-independent mechanisms. *Kidney Int*. 2006;69:105-113.

Ichihara A, Hayashi M, Kaneshiro Y, et al. Inhibition of diabetic nephropathy by a decoy peptide corresponding to the "handle" region for nonproteolytic activation of prorenin. *J Clin Invest*. 2004;114:1128-1135.

Ichihara A, Kaneshiro Y, Takemitsu T, et al. "Receptor-associated prorenin system" contributes to hypertensive end-organ damage. *J Hypertens*. 2005; 23 (suppl 2):S78: P71.197.

- Ichihara A, Suzuki F, Nakagawa T, et al. Prorenin receptor blockade inhibits development of glomerulosclerosis in diabetic angiotensin II type 1a receptor-deficient mice. *J Am Soc Nephrol*. 2006 Jul;17:1950-61.
- Lee-Kirsch MA, Gaudet F, Cardoso MC, Lindpaintner K. Distinct renin isoforms generated by tissue-specific transcription initiation and alternative splicing. *Circ Res*. 1999;84:240-246.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-DeltaDelta C(T)) method. *Methods* 2001;25:402-408
- Ludwig J, Kerscher S, Brandt U, et al. Identification and characterization of a novel 9.2-kDa membrane sector-associated protein of vacuolar proton-ATPase from chromaffin granules. *J Biol Chem*. 1998;273:10939-10947.
- Morrison TB, Weis JJ, Wittwer CT. Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *Biotechniques* 1998;24:954-962
- Muller L, Barret A, Etienne E, et al. Heterodimerization of endothelin-converting enzyme-1 isoforms regulates the subcellular distribution of this metalloprotease. *J Biol Chem*. 2003;278:545-555.
- Nguyen G, Delarue F, Burckle C, Bouzahir L, Giller T, Sraer JD. Pivotal role of the renin/prorenin receptor in angiotensin II production and cellular responses to renin. *J Clin Invest*. 2002;109:1417-1427.
- Nussberger J, Wuerzner G, Jensen C, Brunner HR. Angiotensin II suppression in humans by the orally active renin inhibitor Aliskiren (SPP100): comparison with enalapril. *Hypertension*. 2002;39:E1-8.
- Peirson SN, Butler JN, Foster RG. Experimental validation of novel and conventional approaches to quantitative real-time PCR data analysis. *Nucleic Acids Res* 2003;31:e73
- Ramakers C, Ruijter JM, Deprez RH, Moorman AF. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neurosci Lett* 339:62-66
- Ramser J, Abidi FE, Burckle CA, et al. A unique exonic splice enhancer mutation in a family with X-linked mental retardation and epilepsy points to a novel role of the renin receptor. *Hum Mol Genet*. 2005;14:1019-1027.
- Senbonmatsu T, Saito T, Landon EJ, et al. A novel angiotensin II type 2 receptor signaling pathway: possible role in cardiac hypertrophy. *Embo J*. 2003;22:6471-6482.
- Vincent MJ, Martin AS, Compans RW. Function of the KKXX motif in endoplasmic reticulum retrieval of a transmembrane protein depends on the length and structure of the cytoplasmic domain. *J Biol Chem*. 1998;273:950-956.

Wruck CJ, Funke-Kaiser H, Pufe T, Kusserow H, Menk M, Scheffé JH, Kruse ML, Stoll M, and Unger T:

**Regulation of transport of the angiotensin AT2 receptor  
by a novel membrane-associated Golgi protein.**

*Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005 Jan;25:57-64.

Scheffe JH, Menk M, Reinemund J, Effertz K, Hobbs R, Pandolfi PP,  
Ruiz P, Unger T, and Funke-Kaiser H:

**A novel signal transduction cascade involving direct physical interaction  
of the renin/ prorenin receptor with the transcription factor PLZF.**

*Circ Res 2006;99:1355-1366.*

Scheffe JH, Lehmann KE, Buschmann IR, Unger T, and Funke-Kaiser H:

**Quantitative real-time RT-PCR data analysis:  
current concepts and the novel "gene expression's C<sub>T</sub> difference" formula.**

*J Mol Med 2006 Nov;84:901-10.*

## **Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

## **Erklärung**

Ich, Jan Hendrik Sचेफे, erkläre hiermit, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Titel „Molekularbiologische Identifizierung und Charakterisierung des Transkriptionsfaktors *promyelocytic zinc finger protein* als direkten Protein-Interaktionspartner des Renin/Prorenin-Rezeptors“ selbst und ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst, keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Berlin, den 30. Januar 2009

## Danksagung

Obwohl ich diese Arbeit mit allem subjektiv empfundenen Recht als die meinige bezeichnen möchte, kann diese Wahrnehmung nicht mehr als die halbe Wahrheit sein. Viele Menschen, die ich hier leider nicht einzeln und im gebührenden Rahmen erwähnen kann, haben essentiell zum Gelingen dieses meines „Lebensabschnittes Promotion“ beigetragen. Ihnen allen bin ich zu tief empfundenem Dank verpflichtet.

Zu allererst muss ich an dieser Stelle meinen fachlichen Betreuer, Herrn Dr. Heiko Funke-Kaiser, nennen, der mir nicht nur stets ein kompetenter und geduldiger Diskussionspartner war, sondern darüber hinaus auch meine wissenschaftliche Kompetenz und mein wissenschaftliches Weltbild wesentlich geprägt hat.

Ebenso zu Dank verpflichtet bin ich natürlich meinem Doktorvater, Herrn Prof. Unger, der meinen Ideen, Vorstellungen und Eskapaden stets freundlich, geduldig und konstruktiv begegnete. In Zeiten schwindender öffentlicher Förderung ermöglichte er zu jeder Zeit den nötigen äußeren Rahmen, der diese Arbeit überhaupt erst gelingen lassen konnte.

Nicht zu vergessen seien hier natürlich auch alle Kolleginnen und Kollegen in unserem Labor, die mich in der langen Zeit der Arbeit „an der *bench*“ auf sehr unterschiedliche Weise unterstützt und ermuntert haben. Nicht wenige von ihnen sind lieb gewonnene Freunde geworden, die mir hoffentlich noch über Jahre erhalten bleiben werden.

Meinen Eltern, meinen Großeltern und meinen Freunden habe ich in den letzten gut zwei Jahren, in denen ich Ihnen zumeist weit weniger Zeit gewidmet habe als es eigentlich mein Wunsch gewesen wäre, eine ganz erhebliche Menge an Geduld und Verständnis für mich abgerungen. Trotzdem habe ich von ihnen allen stets jede Unterstützung erfahren, die ich mir überhaupt nur wünschen konnte. Ich nehme dies alles nicht als selbstverständlich wahr und danke hierfür von ganzem Herzen.