



FAKULTÄT FÜR MEDIZIN

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der
Technischen Universität München zur Erlangung des
akademischen Grades eines Dr. med. genehmigten Dissertation.

Oligomerization of β_2 -Adrenergic Receptors

Stephan Martin Skawran





FAKULTÄT FÜR MEDIZIN

INSTITUT FÜR PHARMAKOLOGIE UND TOXIKOLOGIE

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Dr. med. genehmigten Dissertation.

Oligomerisierung von β_2 -Adrenorezeptoren

Stephan Martin Skawran

Vorsitzender:	Prof. Dr. Dr. Stefan Engelhardt
Prüfer der Dissertation:	1.
	2.
	3.

Die Dissertation wurde am TODO: Submission date bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am TODO: Submission date angenommen.



Ich erkläre an Eides statt, dass ich diese, bei der Fakultät für Medizin der TUM zur Promotionsprüfung vorgelegte Arbeit ohne sonstige Hilfe erstellt und bei der Abfassung nur die gemäß § 6 Abs. 6 und 7 Satz 2 angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

München, TODO: Submission date

Stephan Martin Skawran

Danksagung

Verzeichnis der Abkürzungen

aA am Arsch.

CD Compact Disk.

zB zum Beispiel.

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	iii
Verzeichnis der Abkürzungen	iv
1 Introduction	1
1.1 Firstsection	1
1.1.1 Subsection	1
1.2 Section	1
2 Einleitung	2
3 Material & Methoden	3
3.1 Plasmide	3
3.2 Bakterien	3
3.3 Zelllinien & Zellkultur	3
3.4 Chemikalien & Reagenzien	4
3.5 Enzyme	4
3.6 Oligonukleotidprimer	5
3.7 Pharmaka	5
3.8 Molekularbiologische Methoden	5
3.8.1 DNA-Amplifikation mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) . .	5
3.8.2 Agarose-Gelelektrophorese	6
3.8.3 Extraktion von DNA aus Agarosegelen	6
3.8.4 Restriktionsenzymverdau von PCR-Produkten und Plasmid-DNA	7
3.8.5 Ligation von DNA-Fragmenten	7
3.8.6 Messung der DNA-Konzentrationen	7
3.8.7 DNA-Sequenzierung	7
4 Ergebnisse	8
5 Diskussion	11
6 Zusammenfassung	12

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	13
Tabellenverzeichnis	14
Literatur	15

1 Introduction

1.1 Firstsection

Citation test (Ahles et al. 2011). zum Beispiel (zB) Compact Disk (CD) Ich habe viele Ideen,

1.1.1 Subsection

See Abbildung 1.1.



Abbildung 1.1: An example for a figure.

1.2 Section

See Tabelle 1.1

Tabelle 1.1: An example for a simple table.

A	B	C	D
1	2	1	2
2	3	2	3

2 Einleitung

Ich habe überhaupt gar keine Ahnung, was ich hier tue

3 Material & Methoden

3.1 Plasmide

Die folgenden Plasmide stammen entweder aus dem Laborbestand oder wurden von NEB GmbH (Frankfurt a. M.) erworben. Sie wurden unverändert transfiziert bzw. wurden für weitere Klonierung verwendet.

Vektor	Insert	Referenz
pSNAPf		New England Biolabs GmbH (Frankfurt a. M.)
pCLIPf		New England Biolabs GmbH (Frankfurt a. M.)
pSNAPf	5mis- <i>ADRB2</i> -16Gly	New England Biolabs GmbH (Frankfurt a. M.)
pDONR221	<i>ADRB2</i> -16Arg	IPT (TU München)

In die in der folgenden Tabelle aufgeführten Vektoren wurden die angegebenen Inserts kloniert. Dazu wurde die Methode der homologen Rekombination als Teil der Gateway-Technologie (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet.

Vektor	Insert	Polymorphismus / Mutation
pSNAPf	5mis- <i>ADRB2</i>	Arg16, Tyr284
pSNAPf	<i>ADRB2</i>	Arg16
pCLIPf	<i>ADRB2</i>	Arg16

3.2 Bakterien

Zur DNA-Amplifikation wurde der Bakterienstamm E. coli (DH10B) (IPT, TU München) verwendet.

3.3 Zelllinien & Zellkultur

Folgende Zelllinien wurden zur Transfektion verwendet.

Name	Ursprung (Organ)	Referenz
HEK293	menschliches, embryonales Nierenepithel	IPT (TU München)
HeLa	menschliches Cervixepithel	IPT (TU München)

Basierend auf den angegebenen Zelllinien wurden folgende stabile Zelllinien mit der Methode der stabilen Transfektion generiert.

Name	Stabil überexprimiertes Protein	Polymorphismen des Proteins
HEK293	ADRB2	Arg16, Gly16, Tyr284
HeLa	ADRB2	Arg16, Gly16, Tyr284

3.4 Chemikalien & Reagenzien

Falls nicht anders angegeben, wurden alle Chemikalien und Reagenzien von Appllichem (Darmstadt), Carl Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt) und Sigma-Aldrich (Taufkirchen) bezogen. Folgende SNAP-Substrate wurden wie angegeben bezogen.

Name	Company
BG-Alexa488	New England Biolabs GmbH (Frankfurt a. M.)
BG-d2	Cisbio Bioassays (Codolet, France)
BG-Lumi4	Cisbio Bioassays (Codolet, France)

3.5 Enzyme

Name	Referenz
DNA Ligase T4	New England Biolabs (Frankfurt a. M.)
DNA Polymerase AccuPrime <i>Pfx</i>	Invitrogen (Karlsruhe)
DNA Polymerase Quikchange Lightning	Agilent Technologies (Waldbronn)
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs (Frankfurt a. M.)

3.6 Oligonukleotidprimer

Name	Sequenz	Produkt
ADRB2-SbfI-for		
ADRB2-XhoI-rev	AAA AAA CCT GCA GGC GGG CAA CCC GGG AAC GG	<i>SbfI</i> - ADRB2 - <i>XhoI</i>
ADRB2-c850t_t851a_for	CAT GGG CAC TTT CAC CTA CTG CTG GCT GCC CTT C	ADRB2(Tyr284)
ADRB2-c850t_t851a_rev	GAA GGG CAG CCA GCA GTA GGT GAA AGT GCC CAT G	

3.7 Pharmaka

Name	Typ	Referenz
Alprenolol	β_2 -Adrenorezeptorantagonist	Sigma-Aldrich GmbH
ICI-118,551	inverser β_2 -Adrenorezeptoragonist	Sigma-Aldrich GmbH
Isoproterenol	β_2 -Adrenorezeptoragonist	Sigma-Aldrich GmbH
Epinephrin	natürlicher Adrenorezeptoragonist	Sigma-Aldrich GmbH

3.8 Molekularbiologische Methoden

3.8.1 DNA-Amplifikation mittels Polymerasekettenreaktion (PCR)

Zur Amplifikation von kodierender DNA wurde die Methode der Polymerasekettenreaktion (PCR) mittels des Enzyms AccuPrime *pfx* DNA Polymerase verwendet. Dabei wurde folgender Reaktionsmix vorbereitet.

cDNA oder Plasmid-DNA	100ng
Vorwärtsprimer	20pmol
Rückwärtsprimer	20pmol
AccuPrime <i>pfx</i> Reaktionspuffer	5 μ L
AccuPrime <i>pfx</i> DNA Polymerase	1 μ L
ddH ₂ O	ad 50 μ L

Der Reaktionsmix wurde nach folgendem Protokoll in einem Mastercycler Pro (Eppendorf, Hamburg) zur DNA-Amplifikation inkubiert.

	Temperatur	Dauer	Zyklen
Initiale Denaturierung	95°C	2min	1
Denaturierung	95°C	15s	35
Annealing	57°C	30s	
Elongation	68°C	1min/kb	
Finale Elongation	68°C	1min	1

3.8.2 Agarose–Gelelektrophorese

50xTAE–Puffer:	Tris	0,2M
	Essigsäure (0,5M)	57,1mL
	Na ₂ EDTA x 2H ₂ O	37,2mL
	ddH ₂ O	ad 1L

5xDNA–Ladepuffer:	Xylencyanol	0,025g
	EDTA (0,5M)	1,4mL
	Glycerol	3,6mL
	ddH ₂ O	7,0mL

Die Herstellung eines einprozentigen Agarosegels erfolgte mit 1g Agarose in 100mL 1xTAE–Puffer, die durch Erhitzen in einer Mikrowelle gelöst wurde. Nach Abkühlen auf etwa 45°C wurden 6,5µL Ethidiumbromid hinzugefügt und das Gel mit den gewünschten Kämmen gegossen. Nach dem Auspolymerisieren wurde das Gel in eine mit 1xTAE–Puffer befüllte Elektrophoresekammer (Peqlab, Erlangen) transferiert. Die DNA-Proben wurden 1:5 mit DNA-Ladepuffer verdünnt und in die Geltaschen geladen. Parallel wurden vorverdaute DNA–Stücke bekannter Länge (1–10kb) in eine Geltasche geladen.

An die so beladene Gelkammer wurde eine Spannung von 120V für 45min angelegt. Die negativ geladenen DNA–Fragmente liefen abhängig von ihrer Länge mit unterschiedlicher Geschwindigkeit anodenwärts. Das sich im Gel befindliche Ethidiumbromid interkalierte in die doppelsträngige DNA.

Anschließend konnte unter UV-Licht (Wellenlänge 312nm) der Standard mit den gesuchten Fragmenten abgeglichen werden.

3.8.3 Extraktion von DNA aus Agarosegelen

Zur Extraktion von DNA–Fragmenten aus Agarosegelen wurde die gewünschte DNA–Bande mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten und mithilfe des QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden) gemäß dem Protokoll des Herstellers extrahiert. Schließlich

wurde die DNA aus der Extraktionssäule mit 15µL ddH₂O eluiert.

3.8.4 Restriktionsenzymverdau von PCR-Produkten und Plasmid-DNA

PCR-Produkte und Plasmid-DNA wurden entsprechend den Empfehlungen des Enzymherstellers (New England Biolabs, Frankfurt a. M.) mit Restriktionsendonukleasen verdaut. Wenn möglich wurden die High-Fidelity-(HF)-Varianten der Restriktionsenzyme verwendet.

Für den vollständigen Verdau von Plasmid-DNA wurden 1–2U des gewünschten Enzyms mit 1µg DNA für 2,5h bei 37°C inkubiert. Zur Überprüfung der DNA-Fragmentlänge nach Mini-Präparation durchlief die verdaute DNA erneut eine Gelelektrophorese.

3.8.5 Ligation von DNA-Fragmenten

3.8.6 Messung der DNA-Konzentrationen

Die Bestimmung der Konzentration in Wasser gelöster DNA erfolgte mittels des Spektrophotometers ND-1000 (NanoDrop, Wilmington, USA) und der vom Hersteller gelieferten Software. Mithilfe der NanoDrop Software konnte über die Absorption bei 260nm die Konzentration der gelösten DNA und über den Quotienten der Absorption bei 260nm und 280nm die Reinheit der Probe bestimmt werden. Lag der Quotient über 1,8, so konnte von einem hohen Reinheitsgrad, d.h. geringer Kontamination mit Proteinen, Phenol oder anderen Kontaminanten ausgegangen werden.

3.8.7 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von Plasmid-DNA und PCR-Produkten wurde durch Eurofins MWG Biotech (Ebersberg) durchgeführt. Dazu wurden 20µL in ddH₂O gelöster DNA der Konzentration 0,1µg/µL zur Sequenzierung gegeben und die Sequenz anschließend mit dem Tool MacVector (MacVector, Inc.) mit der erwarteten Basenfolge abgeglichen.

4 Ergebnisse

Dies hier ist ein Blindtext zum Testen von Textausgaben. Wer diesen Text liest, ist selbst schuld. Der Text gibt lediglich den Grauwert der Schrift an. Ist das wirklich so? Ist es gleichgültig, ob ich schreibe: „Dies ist ein Blindtext“ oder „Huardest gefburn“? Kjift – mitnichten! Ein Blindtext bietet mir wichtige Informationen. An ihm messe ich die Lesbarkeit einer Schrift, ihre Anmutung, wie harmonisch die Figuren zueinander stehen und prüfe, wie breit oder schmal sie läuft. Ein Blindtext sollte möglichst viele verschiedene Buchstaben enthalten und in der Originalsprache gesetzt sein. Er muss keinen Sinn ergeben, sollte aber lesbar sein. Fremdsprachige Texte wie „Lorem ipsum“ dienen nicht dem eigentlichen Zweck, da sie eine falsche Anmutung vermitteln.

Das hier ist der zweite Absatz. Dies hier ist ein Blindtext zum Testen von Textausgaben. Wer diesen Text liest, ist selbst schuld. Der Text gibt lediglich den Grauwert der Schrift an. Ist das wirklich so? Ist es gleichgültig, ob ich schreibe: „Dies ist ein Blindtext“ oder „Huardest gefburn“? Kjift – mitnichten! Ein Blindtext bietet mir wichtige Informationen. An ihm messe ich die Lesbarkeit einer Schrift, ihre Anmutung, wie harmonisch die Figuren zueinander stehen und prüfe, wie breit oder schmal sie läuft. Ein Blindtext sollte möglichst viele verschiedene Buchstaben enthalten und in der Originalsprache gesetzt sein. Er muss keinen Sinn ergeben, sollte aber lesbar sein. Fremdsprachige Texte wie „Lorem ipsum“ dienen nicht dem eigentlichen Zweck, da sie eine falsche Anmutung vermitteln.

Und nun folgt – ob man es glaubt oder nicht – der dritte Absatz. Dies hier ist ein Blindtext zum Testen von Textausgaben. Wer diesen Text liest, ist selbst schuld. Der Text gibt lediglich den Grauwert der Schrift an. Ist das wirklich so? Ist es gleichgültig, ob ich schreibe: „Dies ist ein Blindtext“ oder „Huardest gefburn“? Kjift – mitnichten! Ein Blindtext bietet mir wichtige Informationen. An ihm messe ich die Lesbarkeit einer Schrift, ihre Anmutung, wie harmonisch die Figuren zueinander stehen und prüfe, wie breit oder schmal sie läuft. Ein Blindtext sollte möglichst viele verschiedene Buchstaben enthalten und in der Originalsprache gesetzt sein. Er muss keinen Sinn ergeben, sollte aber lesbar sein. Fremdsprachige Texte wie „Lorem ipsum“ dienen nicht dem eigentlichen Zweck, da sie eine falsche Anmutung vermitteln.

Nach diesem vierten Absatz beginnen wir eine neue Zählung. Dies hier ist ein Blindtext zum Testen von Textausgaben. Wer diesen Text liest, ist selbst schuld. Der Text gibt lediglich den Grauwert der Schrift an. Ist das wirklich so? Ist es gleichgültig,

ob ich schreibe: „Dies ist ein Blindtext“ oder „Huardest gefburn“? Kjift – mitnichten! Ein Blindtext bietet mir wichtige Informationen. An ihm messe ich die Lesbarkeit einer Schrift, ihre Anmutung, wie harmonisch die Figuren zueinander stehen und prüfe, wie breit oder schmal sie läuft. Ein Blindtext sollte möglichst viele verschiedene Buchstaben enthalten und in der Originalsprache gesetzt sein. Er muss keinen Sinn ergeben, sollte aber lesbar sein. Fremdsprachige Texte wie „Lorem ipsum“ dienen nicht dem eigentlichen Zweck, da sie eine falsche Anmutung vermitteln.

Dies hier ist ein Blindtext zum Testen von Textausgaben. Wer diesen Text liest, ist selbst schuld. Der Text gibt lediglich den Grauwert der Schrift an. Ist das wirklich so? Ist es gleichgültig, ob ich schreibe: „Dies ist ein Blindtext“ oder „Huardest gefburn“? Kjift – mitnichten! Ein Blindtext bietet mir wichtige Informationen. An ihm messe ich die Lesbarkeit einer Schrift, ihre Anmutung, wie harmonisch die Figuren zueinander stehen und prüfe, wie breit oder schmal sie läuft. Ein Blindtext sollte möglichst viele verschiedene Buchstaben enthalten und in der Originalsprache gesetzt sein. Er muss keinen Sinn ergeben, sollte aber lesbar sein. Fremdsprachige Texte wie „Lorem ipsum“ dienen nicht dem eigentlichen Zweck, da sie eine falsche Anmutung vermitteln.

Das hier ist der zweite Absatz. Dies hier ist ein Blindtext zum Testen von Textausgaben. Wer diesen Text liest, ist selbst schuld. Der Text gibt lediglich den Grauwert der Schrift an. Ist das wirklich so? Ist es gleichgültig, ob ich schreibe: „Dies ist ein Blindtext“ oder „Huardest gefburn“? Kjift – mitnichten! Ein Blindtext bietet mir wichtige Informationen. An ihm messe ich die Lesbarkeit einer Schrift, ihre Anmutung, wie harmonisch die Figuren zueinander stehen und prüfe, wie breit oder schmal sie läuft. Ein Blindtext sollte möglichst viele verschiedene Buchstaben enthalten und in der Originalsprache gesetzt sein. Er muss keinen Sinn ergeben, sollte aber lesbar sein. Fremdsprachige Texte wie „Lorem ipsum“ dienen nicht dem eigentlichen Zweck, da sie eine falsche Anmutung vermitteln.

Und nun folgt – ob man es glaubt oder nicht – der dritte Absatz. Dies hier ist ein Blindtext zum Testen von Textausgaben. Wer diesen Text liest, ist selbst schuld. Der Text gibt lediglich den Grauwert der Schrift an. Ist das wirklich so? Ist es gleichgültig, ob ich schreibe: „Dies ist ein Blindtext“ oder „Huardest gefburn“? Kjift – mitnichten! Ein Blindtext bietet mir wichtige Informationen. An ihm messe ich die Lesbarkeit einer Schrift, ihre Anmutung, wie harmonisch die Figuren zueinander stehen und prüfe, wie breit oder schmal sie läuft. Ein Blindtext sollte möglichst viele verschiedene Buchstaben enthalten und in der Originalsprache gesetzt sein. Er muss keinen Sinn ergeben, sollte aber lesbar sein. Fremdsprachige Texte wie „Lorem ipsum“ dienen nicht dem eigentlichen Zweck, da sie eine falsche Anmutung vermitteln.

Nach diesem vierten Absatz beginnen wir eine neue Zählung. Dies hier ist ein Blindtext zum Testen von Textausgaben. Wer diesen Text liest, ist selbst schuld. Der Text gibt lediglich den Grauwert der Schrift an. Ist das wirklich so? Ist es gleichgültig,

ob ich schreibe: „Dies ist ein Blindtext“ oder „Huardest gefburn“? Kjift – mitnichten! Ein Blindtext bietet mir wichtige Informationen. An ihm messe ich die Lesbarkeit einer Schrift, ihre Anmutung, wie harmonisch die Figuren zueinander stehen und prüfe, wie breit oder schmal sie läuft. Ein Blindtext sollte möglichst viele verschiedene Buchstaben enthalten und in der Originalsprache gesetzt sein. Er muss keinen Sinn ergeben, sollte aber lesbar sein. Fremdsprachige Texte wie „Lorem ipsum“ dienen nicht dem eigentlichen Zweck, da sie eine falsche Anmutung vermitteln.

Dies hier ist ein Blindtext zum Testen von Textausgaben. Wer diesen Text liest, ist selbst schuld. Der Text gibt lediglich den Grauwert der Schrift an. Ist das wirklich so? Ist es gleichgültig, ob ich schreibe: „Dies ist ein Blindtext“ oder „Huardest gefburn“? Kjift – mitnichten! Ein Blindtext bietet mir wichtige Informationen. An ihm messe ich die Lesbarkeit einer Schrift, ihre Anmutung, wie harmonisch die Figuren zueinander stehen und prüfe, wie breit oder schmal sie läuft. Ein Blindtext sollte möglichst viele verschiedene Buchstaben enthalten und in der Originalsprache gesetzt sein. Er muss keinen Sinn ergeben, sollte aber lesbar sein. Fremdsprachige Texte wie „Lorem ipsum“ dienen nicht dem eigentlichen Zweck, da sie eine falsche Anmutung vermitteln.

Das hier ist der zweite Absatz. Dies hier ist ein Blindtext zum Testen von Textausgaben. Wer diesen Text liest, ist selbst schuld. Der Text gibt lediglich den Grauwert der Schrift an. Ist das wirklich so? Ist es gleichgültig, ob ich schreibe: „Dies ist ein Blindtext“ oder „Huardest gefburn“? Kjift – mitnichten! Ein Blindtext bietet mir wichtige Informationen. An ihm messe ich die Lesbarkeit einer Schrift, ihre Anmutung, wie harmonisch die Figuren zueinander stehen und prüfe, wie breit oder schmal sie läuft. Ein Blindtext sollte möglichst viele verschiedene Buchstaben enthalten und in der Originalsprache gesetzt sein. Er muss keinen Sinn ergeben, sollte aber lesbar sein. Fremdsprachige Texte wie „Lorem ipsum“ dienen nicht dem eigentlichen Zweck, da sie eine falsche Anmutung vermitteln.

5 Diskussion

6 Zusammenfassung

Abbildungsverzeichnis

1.1	Example figure	1
-----	--------------------------	---

Tabellenverzeichnis

1.1	Example table	1
-----	-------------------------	---

Literatur

Ahles, A., F. Rochais, T. Frambach, M. Bünemann & S. Engelhardt (2011). „A polymorphism-specific "memory" mechanism in the $\beta(2)$ -adrenergic receptor.“ In: *Sci Signal* 4.185, ra53.