

## Protein-Protein-Interaktion des kardialen Ankyrin-Repeat-Proteins, CARP, mit dem zytoplasmatischen $\beta$ -Aktin

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Marian Naguib

aus Kairo

Januar 2009

Aus dem Institut für Herz- und Kreislaufphysiologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. A. Gödecke

Koreferent: Prof. Dr. J.H. Hegemann

Tag der mündlichen Prüfung: 29.04.2009

**Danksagung** 

In der Regel ist die Danksagung der letzte Text, den man für solch eine Arbeit

verfasst. Jedoch bei dieser Arbeit schreibe ich sie schon achteinhalb Monate vor

dem voraussichtlichen Ende meiner Doktorarbeit.

Meistens schreibt man die Danksagung in einer ziemlich entspannten Stimmung,

nachdem man schwarz auf weiß sehen kann, was aus seiner Arbeit geworden ist.

Und dementsprechend verteilt man seine Dankbarkeit.

Diesmal möchte ich allerdings mitten in meiner Arbeit Halt machen und danken.

Ich befinde mich mitten in einer Arbeit, deren Ende mir noch ein Geheimnis ist.

Und im Höhepunkt meines Arbeitsstresses möchte ich als allererstes meinem

lieben Gott und Vater dafür danken, dass er mich keine einzige Minute aus den

Augen lässt. Darauf vertraue ich und deshalb hoffe ich auf ein schönes und

erfüllendes Ende dieser Arbeit.

Ich möchte mich bei meiner Familie bedanken, vor allem bei meinem Vater, für

den – und für den alleine – ich diese Arbeit anfangs vollenden wollte, denn er

hatte so viel für mich getan. Das wäre das kleinste, was ich ihm widmen könnte.

Mittlerweile weiß ich allerdings, dass ich mit dieser Arbeit ihm zeigen will, dass

ich vor meiner bisher größten Herausforderung in meinem Leben standhaft

bleiben konnte.

Axel Gödecke - einen besseren Betreuer und Chef werde ich nie wieder finden.

Das weiß ich jetzt schon.

Danke!

Düsseldorf, den 16. Juli 2007

"Groß sind die Taten des HERRN, zu **erforschen** von allen,

die Lust an ihnen haben." Psalm 111,2

## Inhaltsverzeichnis

1Einleitung	1
1.1 Die Komplexität von Protein-Protein-Interaktionen	1
1.2 Das kardiale Ankyrin-Repeat-Protein, CARP	5
1.3 Ziel der Arbeit	16
2Material und Methoden	17
2.1 Material	17
2.2 Methoden	27
2.2.1 Bearbeitung von Nukleinsäuren	27
2.2.2 Zellkultur eukaryontischer Zelllinien	29
2.2.3 Bearbeitung von Proteinen	31
3Ergebnisse und Auswertung	41
3.1 Etablierung der TAP-Technologie	41
3.2 Identifizierung und Verifizierung aufgereinigter Interaktionspartner von CARP	70
3.3 CARP in migrierenden Endothelzellen	85
4Diskussion	93
5Zusammenfassung	103
6Summary	104
Literaturverzeichnis	I
Liste der häufig benutzten Abkürzungen	IX

## 1.1 Die Komplexität von Protein-Protein-Interaktionen

die Zelle als eine Leistungseinheit eines vielzelligen Betrachtet man Gesamtorganismus, so stellen Proteine die einzelnen Maschinen dar, auf die die Leistung in der Zelle zurückzuführen ist. Die Grundausstattung mit Proteinen stellt das Genom zur Verfügung. Doch existieren weiterhin genom-unabhängige Prozesse wie posttranslationale Modifikationen, durch die die Proteine ihre endgültige Funktion zur Erfüllung ihrer biologischen Aktivität erreichen. Die Vielfalt der möglichen posttranslationalen Modifikationen stellt nicht nur ein komplexes Netzwerk zur Modulation der Proteinfunktion dar, sondern ist bisher unvollständig verstanden. Beispiele für komplexe Prozesse ist der Zellzyklus oder die DNA-Replikation, bei denen es nicht nur darauf ankommt, dass die erforderlichen Proteine in der Zelle vorhanden sind, sondern dass diese Proteine zum richtigen Zeitpunkt am richtigen Ort in ihrer richtigen Konformation und Modifikation ihre biologische Aktivität ausführen. Meistens fungieren Proteine dann in einem weiteren Schritt als Untereinheiten größerer Komplexe. Somit entstehen Makroproteinkomplexe, die wie das Ribosom die Translation von mRNA in eine Peptidkette oder wie das Proteasom die Degradierung eines Proteins in seine einzelnen Aminosäuren ermöglichen. Proteinkomplexe sind daher die grundlegende Einheit für makromolekulare Organisation (Gavin, et al. 2006).

Wie komplex eine solche makromolekulare Proteinzusammensetzung sein kann, soll im Folgenden aus dem Gebiet der Physiologie am Beispiel der sogenannten Z-Scheibe des Muskels verdeutlicht werden.

Die zentrale Funktion einer Muskelzelle besteht in ihrer Kontraktionsfähigkeit. Die Grundlage für die Kontraktion des Muskels ist die Verschiebung von Myosin- an Aktinfilamenten nach der Filamentgleittheorie (Huxley und Nieredgerke 1954). ATP-Verbrauch kommt zu periodisch ablaufenden Unter es einer Konformationsänderung der Myosinfilamente und der darauffolgenden Verschiebung des Aktinfilaments, was zur Verkürzung des Muskels führt (siehe Abbildung 1-1). Voraussetzung für die Verkürzung ist die Verankerung der Aktinfilamente an einer Struktur, die alle Filamente miteinander verbindet. Diese Funktion ist in der Z-Scheibe gewährleistet. Die folgende Abbildung zeigt eine

vereinfachte Darstellung einer kontraktilen Einheit des Muskels – des sogenannten Sarkomers. Zwischen zwei Z-Scheiben erstrecken sich die Aktinund die Myosinfilamente. Eine Kontraktion führt zur Verkürzung des Abstands zwischen zwei Z-Scheiben, wobei die Aktinfilamente der mittleren M-Linie näherkommen.

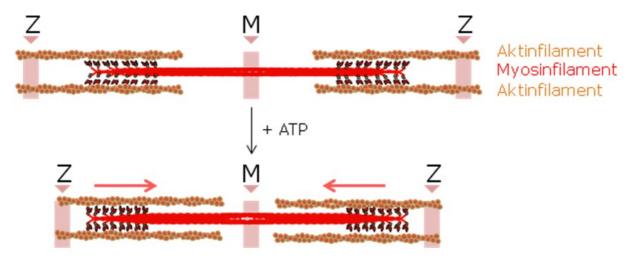


Abbildung 1–1 Mechanismus der Sarkomerkontraktion infolge der Gleittheorie des Myosin- entlang des Aktinfilaments: M: Mittellinie des Sarkomers, Z: Z-Linie bzw. –Scheibe des Sarkomers.

Somit stellt das Sarkomer die kleinste funktionelle Einheit des quergestreiften Muskels dar, deren spezifische räumliche Organisation die Kraftentwicklung bei der Kontraktion bestimmt. Die Schnittstelle zwischen dem kontraktilen Apparat und dem Zytoskelett bildet die Z-Scheibe (siehe Abbildung 2-1). Diese besteht im wesentlichen aus alpha-Aktinin, das in Form eines Rückgrates geordnet ist. Sowohl die dünnen Aktinfilamente als auch das riesige Protein Titin, das das halbe Sarkomer von der Z-Scheibe bis zur M-Linie überspannt, sind darin verankert, so dass die horizontalen Filamente des Sarkomers durch das vertikale Rückgrat der Z-Scheibe zusammengehalten werden. Um die Sarkomere weiterhin untereinander zu verbinden, sind die Z-Scheiben benachbarter Sarkomere miteinander durch das Intermediärfilament Desmin verbunden. Weiterhin stehen die verbundenen Z-Scheiben am Sarkolemma über spezifische Strukturen, die sogenannten Costamere, mit der extrazellulären Matrix in Verbindung. Damit ist die mechanische Kopplung der Kontraktion eines einzelnen Sarkomers mit der Muskelzellmembran hergestellt (Bang, et al. 2001).

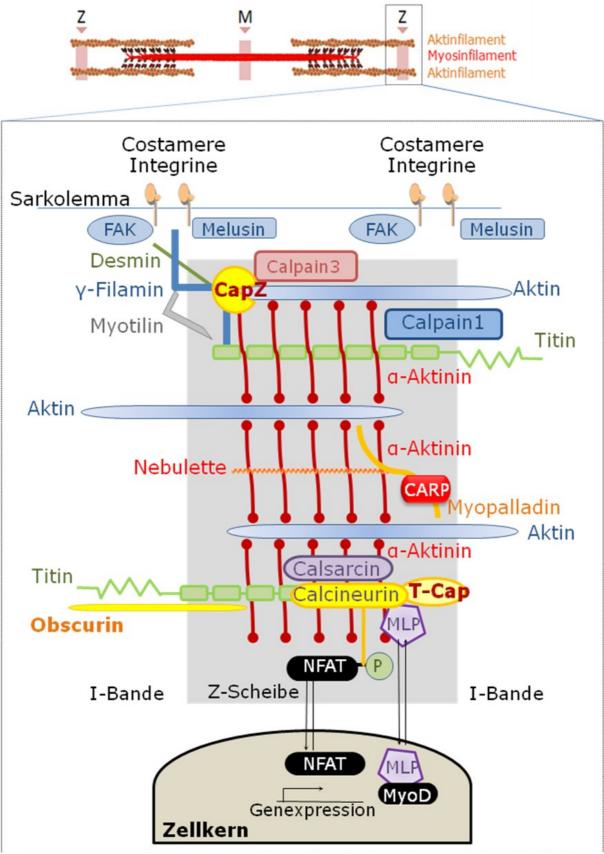


Abbildung 1–2 Schematische Darstellung einer Auswahl der molekularen Komponenten der Z-Scheibe – modifziert nach (Frank, et al. 2006); CapZ, Z disc capping protein; FAK, focal adhesion kinase; MLP, muscle LIM protein; T-cap, titin capping protein.

Dieser strukturelle Aufbau führte anfangs zu der Annahme, dass die Z-Scheibe eine passive Komponente des Sarkomers darstellt, die lediglich zur Verknüpfung der Filamente und der Weiterleitung der mechanischen Kraft dient. Die aktuellen Entdeckungen von zahlreichen neuen molekularen Komponenten der Z-Scheibe verleihen ihr allerdings eine kontinuierlich wachsende Rolle Signaltransduktion der Muskelzelle. Mutationen in unterschiedlichen Scheibenproteinen führen zu diversen pathologischen Dystrophie-Phänotypen im Muskel und zu Kardiomyopathien im Herzen (Frank, et al. 2006). Dies deutet darauf hin, dass der makromolekulare Z-Scheibenkomplex eine dynamische Schlüsselkomponente der Muskelzelle darstellt, mit der die Stabilität und Integrität der Kontraktionsfähigkeit eng zusammenhängen. Sie funktioniert als Mechanosensor, der veränderte Belastungen wahrnimmt und durch die interagierenden Proteine biochemisch weiterleitet. Ein bekanntes Prinzip dafür besteht darin, dass infolge einer Störung – z.B. über einen chronisch erhöhten Druck – einige Z-Scheiben-proteine posttranslational modifiziert werden und von der Z-Scheibe dissoziieren, um sich in andere Zellkompartimente - wie z.B. in den Kern – zu translozieren und downstream Reaktionen auszulösen (Knöll, et al. 2003). So führt beispielsweise eine Erhöhung des intrazellulären Calciumspiegels zur Aktivierung der Serin-Threonin-Phosphatase Calcineurin und damit zur Dephosphorylierung des nuclear factor of T-cells (NFAT), wodurch NFAT in den Kern translozieren und die Transkription beeinflussen kann (Molkentin, et al. 1998) (siehe Abbildung 1-2). Auch die Dehnung kultivierter Kardiomyozyten führt zur Dissoziation des Muskel-LIM-Proteins (MLP) von der Z-Scheibe und zur Transkription der natriuretischen Peptide ANF und BNP infolge einer Interaktion zwischen MLP und dem Transkriptionsfaktor MyoD im Kern (Knöll, et al. 2002).

Miller et al. berichteten 2003 über ein neues Z-Scheiben-Protein, das mit Myopalladin assoziiert ist – das kardiale Ankyrin-Repeat-Protein (CARP). Interessanterweise wurde dieses Protein sowohl am Sarkomer als auch im Kern gefunden, so dass vermutet wurde, dass CARP im Sinne eines Mechanosensors veränderte mechanische Belastung am Sarkomer detektiert, in den Kern wandert und dort eine veränderte Genexpression auslöst (Miller, et al. 2003).

Das folgende Kapitel bietet eine genaue Beschreibung von CARP und die bisherigen Erkenntnisse über seine Funktion in diversen Zelltypen dar.

## 1.2 Das kardiale Ankyrin-Repeat-Protein, CARP

Die Entdeckung von CARP

Identifiziert wurde CARP zum ersten Mal von Chu et al. (1995) als ein Zytokininduzierbares Kernprotein in Endothelzellen. In dieser Studie wurden sowohl
HDMEC- (human dermal microvascular endothelial cells) als auch HUVEC-Zellen
(human umbilical vein endothelial cells) mit dem Tumornekrosefaktor TNFa- bzw.
Interleukin IL1a stimuliert und nach induzierten Genen in cDNA-Bibliotheken
gesucht. Dabei zeigte sich eine Heraufregulation der mRNA von CARP, das
damals als neu identifiziertes Gen noch als C-193 bezeichtnet wurde.

Zwei Jahre später identifizierten Zou et al. über das *Yeast-Two-Hybrid-*System CARP als einen neuen Bindungspartner des Trankriptionsregulators YB-1 und wiesen eine negative genregulatorische Wirkung während der Kardiogenese – der Embryonalentwicklung des Herzens – nach (Zou, et al. 1997). Aus dieser Studie entsprang der neue Name für C-193, nämlich das *cardiac-(restricted) ankyrin repeat protein*, CARP. Reguliert durch das Homöobox-Protein Nkx2-5 bindet CARP an YB-1 und verhindert damit seine Bindung am HF1a/MEF2 Promotorelement. Dies führt zur Inhibierung der MLC-2v Genexpression und damit zur Herabregulation der ventrikelspezifischen Form der leichten Kette des Myosins.

Im gleichen Jahr identifizierten Jeyaseelan et al. CARP als ein Gen, das durch Doxorubicin/Adriamycin – breit eingesetzte Chemotherapeutika – in neonata-len Rattenkardiomyozyten herabreguliert wird. Sie bezeichneten das Gen als *cardiacrestricted adriamycin responsive protein* (CARP) (Jeyaseelan, et al. 1997). In dieser Arbeit wurde eine Verkürzung der Halbwertszeit der CARP mRNA nachgewiesen. Als Folge der reduzierten CARP Expression wurden die Promotoren des atrialen natriuretischen Peptids (ANP) und des kardialen TroponinC (cTnC) aktiviert. Inzwischen weiß man, dass Doxorubicin über die Erzeugung von Wasserstoffperoxid zur Aktivierung von H7-sensitiven Serin/Threonin-Kinasen und darüber zur Herabregulation von CARP führt (Aihara, et al. 2000).

#### CARP in Kardiomyozyten

In weiteren Untersuchungen am Herzen wurde wiederholt gezeigt, dass CARP bei erhöhter mechanischer Belastung induziert wird. In einem Mausmodell für

konzentrische Hypertrophie des Herzens infolge chronischer Druckbelastung stieg das CARP mRNA-Niveau durch Aortenligation an (Kuo, et al. 1999). Auch bei Stickstoffmonoxid (NO) induzierter Hypertrophie stieg das CARP Expressionsniveau im Herzen transgener Mäuse um das 2,5-fache an (Gödecke, et al. 2003). Ein ähnlicher Anstieg der CARP-Expression wurde in weiteren Hypertrophie-Modellen bei Druckbelastung, Bluthochdruck und Herzinsuffizienz beobachtet (Aihara, et al. 2000).

An einem Hundemodell für Herzhypertrophie und terminale Herzinsuffizienz wurde mittels einer RDA (*representational differential* analysis)-cDNA-Analyse ferner gezeigt, dass CARP ausschließlich im hypertrophierten ventrikulären Myokard heraufreguliert wird. Dabei befand sich das CARP-Protein haupt-sächlich im Kern (Zolk, et al. 2002).

Weitere Studien konnten die Heraufregulation von CARP bei der Entwicklung einer Hypertrophie infolge stimulierter α- und β-adrenerger Signaltransduktionswege nachweisen. An neonatalen Rattenkardiomyozyten wurde gezeigt, dass die CARP-Expression durch die p38-Kinase und den Transkriptionsfaktor GATA-4 aktiviert wird (Kuo, et al. 1999). Sowohl die p38-Kinase als auch GATA-4 sind bekannte Mitglieder von vielen Hypertrophie-induzierten Signalkaskaden. Eine Phenylephrin-vermittelte a₁-adrenerge Stimulation von Rattenkardiomyozyten führte zur GATA-4 abhängigen Aktivierung des CARP-Promotors (Maeda, et al. 2002). Eine ähnliche Aktivierung (ca. um 50%) konnte ebenfalls durch eine Isoprenalin-vermittelte β-adrenerge Stimulation erreicht werden (Zolk, et al. 2003). Umgekehrt führt eine Blockade der  $\beta_1$ - und  $\beta_2$ adrenergen Signalwege zur Reduktion der CARP-Transkription und der CARP mRNA-Halbwertszeit. In dieser Studie wurde zum ersten Mal ein CARPüber adenovirale Transfektion Überexpressionsmodell neonataler Rattenkardiomyozyten durchgeführt. Diese zeigten unter basalen Bedingungen keinen Unterschied zu den mit dem leeren Vektor transfizierten Kardiomyozyten. Nach β-adrenerger Stimulation verschlechterte sich allerdings die kontraktile Funktion der isolierten Kardiomyozyten. Somit ist der bisher mehrmals beobachtete Anstieg der CARP-Expression infolge der Hypertrophieentwicklung nicht nur ein Indikator für die kompensatorische Re-aktivierung des fötalen Genexpessionsprogramms, sondern auch eine mögliche Ursache für die verschlechterte Kontraktilität im kranken Herzmuskel.

#### CARP im Skelettmuskel

Im fötalen Skelettmuskel wurde CARP im Zytoplasma nachgewiesen (Ishiguro, et al. 2002) und auch mit dem myofibrillären Myopalladin kolokalisiert (Bang, et al. 2001). Wie in Kardiomyozyten war CARP im Skelettmuskel sowohl mit dem Sarkomer assoziiert als auch im Kern lokalisiert, um möglicherweise Signale von der Z-Scheibe in den Kern zu übertragen, und dort die Genexpression zu beeinflussen. Eine weitere Hypothese besagt, dass CARP andere Proteine, die kein Kernlokalisationssignal besitzen (wie z.B. YB-1), in den Kern transportieren könnte und auf diese Weise eine Verbindung zwischen dem Sarkomer und dem Signaltransduktionskette herstellen könnte. der Eine intrazelluläre Reorganisation CARP wurde in neonatalen von Rattenkardiomyozyten unter passiver Dehnung beobachtet, wo CARP eine bevorzugte Kernlokalisation unter Dehnungsstress zeigte (Miller, et al. 2003). In dieser Studie wurde mittels des Yeast-Two-Hybrid-Systems die Interaktion von CARP mit dem myofibrillären Myopalladin bestätigt. Zusätzlich wurde eine Interaktion mit der N2A-Region des riesigen Myofilaments Titin (3000-3700 kDa) und der Calpain 3 Protease/p94 entdeckt.

Im mdm-Muskeldystrophiemodell, das eine Deletion in der N2A-Region des Titins aufweist, wird die Bindestelle von p94 am Titin zerstört und die Mäuse zeigten schwerwiegenden Dystrophie-Phänotyp. einen CARP wurde den Skelettmuskeln von *mdm*-Mäusen um das 30-fache überexprimiert, infolgedessen die Expression von neun Genen der Nkx2-5-Homöobox-Genfamilie gestört wurde. Witt et al. postulierten anhand dieser Ergebnisse, dass die fehlende Interaktion des Titins mit p94, welches CARP eventuell proteolytisch reguliert, das Zusammenspiel zwischen CARP und p94 aus dem Gleichgewicht bringt. Somit könnte CARP durch seine repressorische Wirkung in der Nkx2-5/YB-1 Signalkaskade eine Myopathie im Skelettmuskel hervorrufen (Witt, et al. 2004). Im Gegenteil dazu konnten Nakada et al. eine Heraufregulation von CARP im regenerierenden Rattenmuskel nachweisen. Eine ähnliche Heraufregulation wurde für die schwere Kette des Myosins (MHC: myosin heavy chain) - ein Marker für Muskelregeneration – festgestellt (Nakada, et al. 2003).

Das CARP *Knockout*-Mausmodell zeigte eine Neigung zur Bildung von langsameren Muskelfasern, allerdings blieb die Faserlänge und -größe unverändert. Interessanterweise fand man in diesen Mäusen eine verstärkte

Expression der N2BA-Isoform des Titins. Bei der Expression dieser Isoform werden die Muskeln dehnbarer und weniger steif. Unter exzentrischer Dehnung wurden zwar die Sarkomere der CARP-*Knockout*-Maus stärker gedehnt als die WT-Sarkomere, konnten sich allerdings im Vergleich zum WT schnell wieder erholen. Somit wurde postuliert, dass CARP an der Stabilität des Skelettmuskels infolge von Dehnungsstress beteiligt ist, wobei es unter basalen Ruhebedingungen keine bis milde Effekte auf den Muskelfaser-Phänotyp ausübt (Barash, et al. 2007).

## CARP im glatten Muskel

CARP wurde auch in glatten Muskelzellen gefunden. So zeigten Glattmuskelzellen der verletzten Aorta ( $balloon\ injury$ -Modell) eine erhöhte CARP Expression (Kanai, et al. 2001). In Abhängigkeit vom Wachstumsfaktor TGF $\beta$ 1 ( $tumor\ growth\ factor\ \beta$ 1) binden Smad Proteine am CAGA-Motiv des CARP-Promotors und führen zur Heraufregulation von CARP. Dies führte wiederum zur Inhibierung der Zellproliferation von VSMC-Zellen ( $vascular\ smooth\ muscle\ cells$ ) in der infolge der Wunde neu entstehenden Neointima. Im Gegensatz dazu war eine CARP in ruhenden Glattmuskelzellen der Media nicht mehr detektierbar. Daher wurde eine Rolle für CARP bei dem Übergang der aktivierten Glattmuskelzellen in den ruhenden Phänotyp nach der Gefäßheilung postuliert (de Waard, et al. 2003).

## CARP im Endothel

Auf der Suche nach differentiell regulierten Proteinen bei der Angiogenese wurden Böngler et al. ebenfalls auf CARP aufmerksam (Boengler, et al. 2003). Schon 24 Stunden nach Ligatur der *Arteria Femoralis* von weißen New Zealand Kaninchen wurde CARP im Endothel und in glatten Muskelzellen der sich ausbildenden Kollateralgefäße heraufreguliert. Eine Behandlung mit dem Wachstumsfaktor TGFβ1 konnte die CARP-Expression noch zusätzlich induzieren. Die Heraufregulation von CARP ging mit einer Überexpression des *early gene response protein 1,* egr1, einher, das eine Reihe weiterer proangiogenetischer Gene aktiviert.

Eine höchstsignifikante Überexpression von CARP (157-fach) konnte weiterhin bei der Wundheilung von Hautwunden der Maus schon nach einem Tag der Verwundung beobachtet werden. Die erhöhte CARP-Expression hielt sogar zwei

Wochen an und zeigte sich sowohl in den subkutanen Skelettmuskeln als auch im Gefäßendothel. Adenovirale Überexpression von CARP im Bereich der Wunden, die durch Hautausstanzung verursacht wurden, führte zu einer verbesserten Neovaskularisierung und erhöhter Blutperfusion der Wunde. Auch *in vitro* führte die Überexpression von CARP in HUVEC-Zellen zu einem verbesserten Überleben der Zellen (Shi, et al. 2005).

#### CARP in weiteren Geweben

Bei der Untersuchung von Glomerulonephritis-Patienten zeigte sich eine Heraufregulation von CARP, die mit dem Ausmaß der Entzündung im Bereich spezieller Nierenepithelzellen (sog. Podozyten) korrelierte (Matsuura, et al. 2007). In einer weiteren Studie führte die CARP-Überexpression in der Neuronen-abgeleiteten F11-Zelllinie zu einer erhöhten Neuritenausdehnung (Stam, et al. 2007).

Die momentan aktuelleste CARP-Studie erfasste durch immunhistochemische Färbung die Korrelation zwischen der CARP-Expression und der Tumorentwicklung. Verglichen wurden Rhabdomyosarkome (eine Krebsart, die aus Skelettmuskel-Vorläuferzellen entsteht), Nicht-Rhabdomyosarkome Karzinome (eine Krebsart, die aus Epithelzellen entsteht). Dabei zeigte sich eine spezifische CARP-Expression in den Rhabdomyosarkomen und bot mit dieser Marker-Eigenschaft eine Möglichkeit, Rhabdomyosarkome spezifisch zu diagnostizieren (Ishiguro, et al. 2008). Unbekannt bleibt allerdings dabei die Rolle von CARP in dieser spezifischen Tumorart.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass alle obengenannten Studien eine genregulatorische sowie eine signalweiterleitende Rolle für **CARP** in verschiedenen Zelltypen postulieren. Diese Rolle kann sich entweder physiologisch während der Organentwicklung oder pathologisch als Antwort auf unterschiedliche Stressstimuli entfalten. Der genaue Mechanismus der CARP-Wirkung bleibt allerdings noch unklar.

#### Die Struktur von CARP

Betrachtet man die Struktur von CARP (siehe Abbildung 1-3), so fällt auf, dass CARP nahezu zur Hälfte aus den namensgebenden Ankyrin-Repeat Domänen besteht. CARP besitzt vier Ankyrin-Repeats (Chu, et al. 1995), wobei Jeyaseelan et al. (1997) fünf Ankyrin-Repeats postulieren. Durch ihre charakteristische L-

förmige Konformation bieten solche Repeats eine geeignete Oberfläche für Protein-Protein-Interaktionen (Li, et al. 2006).

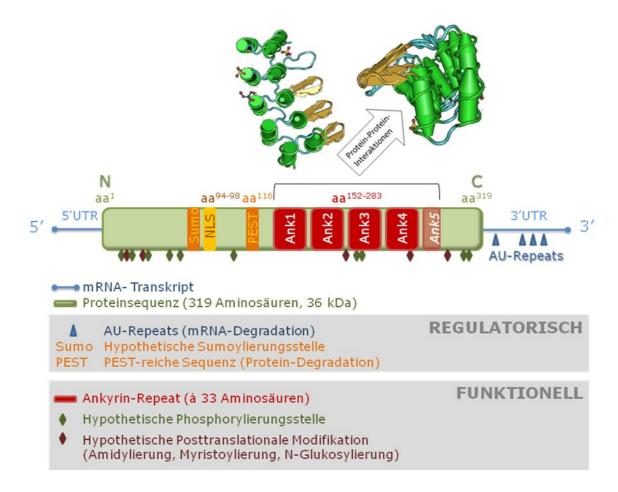


Abbildung 1–3 Detaillierte Übersicht über bekannte Domänen und Konsensus-Sequenzen bzw. hypothetische Stellen posttranslationaler Modifikationen von CARP (Chu, et al. 1995); aa, Aminosäure. Im Detail ist eine Computer-generierte Struktur (ExPaSy) der Ankyrin-Repeat Domäne von CARP mit vier Ankyrin-Repeats dargestellt. Jeder Repeat besteht aus 33 Aminosäuren, zwei antiparallelen  $\alpha$ -Helices und einem  $\beta_1$ -Faltblatt, das ungefähr im rechten Winkel zu den Helices steht. Dadurch entsteht die typische durch die L-Form bedingte Grube der Ankyrin-Repeats.

Ankyrin-Repeats wurden ursprünglich beim Ankyrin-Protein des erythrozytären Zytoskeletts identifiziert. Inzwischen weiß man, dass Ankyrin-Repeats funktionelle Domänen diverser Proteine sind, die u.a. für Zell-Zell-Adhäsion (z.B. Integrin-*linked* Kinase) Signaltransduktion (z.B. Notch), Zytoskelett-integrität (z.B. Ankyrin), Transkriptionsregulation (z.B. IκB), Zellzyklus-regulation (z.B. INK4 Tumorsuppressoren) und Entzündungsprozesse (z.B. IκB) zuständig sind (Mosavi, et al. 2004).

CARP verfügt weiterhin über ein nukleäres Lokalisationssignal (NLS), und tatsächlich wurde CARP auch im Zellkern nachgewiesen (Miller, et al. 2003).

CARP besitzt sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene mehrere Elemente, die für eine kurze Halbwertszeit und hohe Degradation des Transkripts bzw. Proteins zuständig sind. Eine AU-Repeat-reiche Region (AAUUUAA) in der untranslatierten 3'-UTR Sequenz des CARP-Transkripts erhöht seinen mRNA-turn-over. Auch auf Proteinebene sorgt eine PEST-reiche Sequenz (Prolin/ Tyrosin/Serin/Threonin) für dessen Calpain-abhängigen Abbau (Hayashi, et al. 2008). Eine hypotethische Sumoylierungsstelle würde einerseits auf eine weitere Degradation des Proteins über Proteasomkomplex hinweisen. Andererseits könnte eine Sumoylierungsmodifikation dem Kernzytoplasma-transport oder der Transkriptionsregulation dienen. Allerdings ist die Bedeutung der Sumoylierung von CARP bisher nicht untersucht worden.

Schließlich verfügt CARP über viele hypothetische Phosphorylierungs- und Glukosylierungsstellen, die ebenfalls noch bestätigt und charakterisiert werden müssen.

Demzufolge scheint es sich bei CARP um ein unstabiles Protein zu handeln, das über seine Ankyrin-Repeat Domänen ein hohes Potential an Protein-Protein-Interaktionen besitzt, sich sowohl im Kern als auch im Zytoplasma befindet und wahrscheinlich posttranslational modifiziert werden kann.

## Bekannte Protein-Interaktionen von CARP

Aufgrund der Vermutung, dass die wesentliche Funktion von CARP in seiner Interaktion mit weiteren Proteinen besteht, wurde eine Reihe an Protein-Interaktionsstudien an CARP durchgeführt. So konnte mit Hilfe von *Yeast-Two-Hybrid*-Analysen eine Interaktion von CARP mit dem Tranksriptionsfaktor YB-1 (Zou, et al. 1997) und mit den sarkomeren Proteinen, Titin und Myopalladin, gezeigt werden. Diese Interaktionen konnten weiterhin mittels immunhistochemischer Fluoreszenzfärbung bestätigt werden (Miller, et al. 2003). Eine weitere *Yeast-Two-Hybrid*-Analyse stellte eine Homodimerisierung von CARP über ein N-terminales *coiled coil*-Dimerisierungsmotiv fest (Witt, et al. 2005). Mittels Koimmunpräzipitation wurde außerdem eine Interaktion von CARP mit dem kardialen Calsequestrin-2 (CASQ2) gezeigt, das für die Calcium-regulierte elektromechanische Kopplung wichtig ist (Torrado, et al. 2005).

CARP und seine homologen Proteine aus der MARP-Proteinfamilie

Weiterhin existieren zwei homologe Proteine von CARP – das diabetes related ankyrin repeat protein (DARP) und das ankyrin repeat protein 2 (Ankrd2). Zusammen mit CARP werden sie zur Familie der MARPs (muscle ankyrin repeat proteins) zusammengefasst. Auf Proteinebene besteht eine 50%-ige Sequenzhomologie der MARPs untereinander. Insbesondere zeigen sich Unterschiede am N-Terminus. Doch finden sich auch Sequenzabweichungen in der C-terminalen Hälfte, in der die bei allen MARPs für die Proteinfamilie charachteristischen 4-5 Ankyrin-Repeats lokalisiert sind.

Ankrd2 scheint vor allem im Skelettmuskel eine Rolle zu spielen. Hentzen et al. konnten zeigen, dass Ankrd2 spezifisch bei exzentrischer Dehnung des *Tibialis anterior*- und des *Extensor digitorum longus*-Muskels in der Ratte heraufreguliert wird (Hentzen, et al. 2006). Wie CARP interagiert Ankrd2 mit dem Transkriptionsfaktor YB-1 *in vivo* und *in vitro*, wo es unter Hypertrophie-Bedingungen im Skelettmuskel zwischen dem Kern und dem Zytoplasma transloziert (Kojic, et al. 2004).

Für DARP wurde gezeigt, dass es in Herzen einer Typ2 Diabetes/Insulinresistenten Maus unter Hungerbedingungen signifikant herunterreguliert wird (Ikeda, et al. 2003). Außerdem wurde seine Expression in COS- und CHO-Zellen nach Inkubation mit 250 µM Oleat induziert. Diese Befunde legen den Schluss nahe, dass DARP eine Rolle bei der Regulation der Substratutilisation spielt. Wie CARP assoziiert DARP in neonatalen Kardiomyozyten mit dem kontraktilen Apparat (Z-Scheibe). Nach 10%-iger passiver Dehnung der Zellen wurde eine Reorganisation beider Proteine beobachtet. Die Immun-fluoreszenzfärbung ergab eine Zunahme des CARP-Signals im Kern. Im gleichen Experiment zeigte DARP ein intensiveres Signal an den *intercalated discs*. Trotz ihrer Homologie auf der Proteinebene scheinen beide Proteine unterschiedliche Funktionen unter Stressbedingungen, wie z.B. Dehnung, auszuüben, die sie mit unterschiedlichen subzellulären Strukturen bzw. Kompartimenten assoziieren (Miller, et al. 2003).

Methoden zur Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen

Protein-Protein-Interaktionen lassen sich wie oben dargestellt durch Koimmunpräzipitation oder das *Yeast-Two-Hybrid-*System untersuchen. Obwohl eine große Zahl von Proteininteraktionen über das *Yeast-Two-Hybrid-*System

identifziert werden konnte, besteht ein wesentlicher Nachteil des Systems darin, dass die zu untersuchenden Proteine nicht in ihrem normalen zellulären Kontext untersucht werden können. So werden in der Regel in Hefezellen nicht die typischen Proteinmodifikationen ausgelöst, die für die Ausbildung der Proteinkomplexe von entscheidender Bedeutung sein können (Stelzl, et al. 2005).

Mit der Entwicklung des sogenannten Epitop-*Tagging*s eröffneten sich vielseitige Möglichkeiten, Proteinfunktionen und –interaktionen durch simple und durchaus elegante Versuchsstrategien an Säugerzellen zu untersuchen (Kolodziej und Young 1991). Das Prinzip des Epitop-*Tagging*s besteht darin, das Zielprotein mit einer kurzen Aminosäuresequenz – dem sogenannten *Tag*– zu fusionieren. Diese Methode erlaubt es nicht nur das Zielprotein im Westernblot leicht zu detektieren, sondern auch die zelluläre Lokalisation, posttranslationale Modifikationen, intrazelluläre Translokation, Protein- bzw. DNA-Interaktionen des Zielproteins zu untersuchen.

Für Proteininteraktionsstudien lässt sich das Epitop-*Tagging* optimal einsetzen, indem das getaggte Zielprotein samt seiner Interaktionspartner über eine Affinitätschromatographie-Aufreinigung in reiner Form gewonnen wird und der gereinigte Proteinkomplex massenspektrometrisch untersucht werden kann. Da die Bedingungen für eine solche Aufreinigung lediglich von dem gewählten *Tag* abhängig sind, ermöglicht das Epitop-*Tagging* eine zielprotein-unabhängige Aufreinigungsstrategie und damit eine automatisierbare Proteinkomplexaufreinigung mit anschließender Proteinidentifizierung. Mittlerweile sehr häufig eingesetzte *Tags* sind der poly-Arg-, poly-His-, CBP- (Calmodulin bindendes Protein), Flag-, Strep(II)- und c-myc-*Tag* (Terpe 2003).

Generell sollte der ideale *Tag* (i) eine hohe Ausbeute bei der Reinigung erlauben, (ii) keinen Einfluss auf die Proteinfunktion verursachen, (iii) N-terminal, C-terminal oder intern einsetzbar sein, (iv) mit jedem Expressionssystem in jeder Wirtszelle funktionieren, (v) eine Detektion des Proteins ermöglichen und (vi) über eine kostengünstige Affinitätssäule mit guten Flussbedingungen eine effiziente Reinigung erlauben. Laut einer komparativen Studie scheinen sowohl der Flag- als auch der StrepII-*Tag* ein guter Kompromiss zwischen den obengenannten Kriterien zu sein (Lichty, et al. 2005).

## Tandem-Affinitäts-Aufreinigung (TAP)

Eine besondere Form des Epitop-*Tagging*s ist das mehrfache *Tagging* von Zielproteinen für Aufreinigungszwecke. Dieses Konzept wurde von Séraphin und seiner Arbeitsgruppe im Jahr 1999 entwickelt und als Tandem-Affinity-Purification (TAP)-Technologie bezeichnet (Rigaut, et al. 1999). Der dieser Technologie zugrunde liegende *Tag* (TAP-*Tag*) besteht aus zwei IgG-Bindedomänen des *Staphylococcus aureus* Protein A (ZZ-Domäne) und einem Calmodulin-bindenden Protein (CBP). Während Protein A eine hohe Affinität zum F<sub>C</sub>-Teil von Immunglobulinen verschiedener Spezies besitzt (Uhlen, et al. 1983), wurde die 26-Aminosäuren-lange CBP-Domäne aus der leichten Myosinketten-Kinase des Skelettmuskels hergeleitet, die eine hohe Affinität zu Calmodulin hat (Blumenthal, et al. 1985). Das Calmodulin-bindende Peptid besitzt eine alphahelikale Struktur, die vom EF-Handmotiv des Calmodulin gebunden wird. Da diese Bindung Calciumionen-abhängig ist, kann sie durch Zugabe von EDTA wieder aufgehoben werden (Lichty, et al. 2005).

Beide Tags - der Protein A- und der CBP-Tag - sind im TAP-Tag durch eine  $\underline{T}$ obacco  $\underline{E}$ tch  $\underline{V}$ irus-(TEV)-Proteaseschnittstelle getrennt. Durch Inkubation mit TEV-Protease kann das über die ZZ-Domäne an die IgG-Säule gebundene Fusionsprotein spezifisch von der IgG-Säule eluiert werden. Ein großer Vorteil der TEV-Protease ist ihre hohe Spezifität und Aktivität auch bei niedrigen Temperaturen. Ihre optimale Schnittstellensequenz E-N-L-Y-F-Q-S ist (Konsensus-Sequenz: E-X-X-Y-X-Q-S), und sie schneidet zwischen den konservierten Aminosäuren Glutamin und Serin. Da sehr wenige Proteine des Säugerzellproteoms eine TEV-Schnittstelle aufweisen, eignet sich die TEV-Protease optimal für die TAP-Aufreinigung von den meisten Säugerzell-proteinen, die nach der TEV-Elution unversehrt bleiben.

## Ablauf der TAP-Aufreinigung nach Séraphin

Für eine Tandemaffinitätsreinigung wird das Zielprotein mit seinen interagierenden Proteinen zunächst an eine IgG-Säule gebunden und nach Waschen der Säule durch Inkubation mit der TEV-Protease proteolytisch von der Säule eluiert. Die eluierten Proteine werden danach an eine Calmodulin-Säule in Anwesenheit von zweiwertigen Calciumionen gebunden und mittels EGTA (Ethylen-Glykol-Tetra-Essigsäure) von der Säule eluiert. Der gereinigte

Proteinkomplex ist dann weitgehend frei von kontaminierenden Proteinen und kann in einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und entweder mit Silber- oder Coomassie-Färbung visualisiert werden. Proteine, die mit dem getaggten Zielprotein koeluiert werden, können dann massenspektrometrisch analysiert und identifiziert werden (Puig, et al. 2001) (Abbildung 1-4).

Der wesentliche Vorteil der TAP-Technologie besteht in der Möglichkeit, zwei Aufreinigungsschritte unter nativen Bedingungen durchführen zu können und damit Proteinkomplexe zu isolieren. Die zweifache Reinigung führt zu einer Reduktion kontaminierender Proteine und damit zur Eliminierung falsch positiver Interaktionspartner.

Damit stellt die TAP-Technologie eine elegante und hochvariable Methode für Proteinaufreinigung mit anschließender Proteininteraktionsanalyse dar.

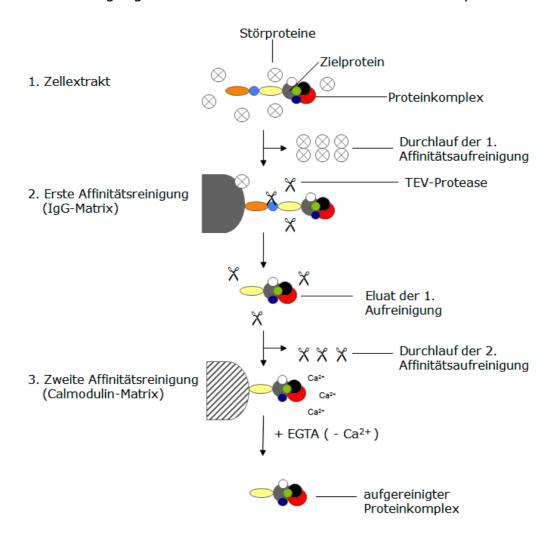


Abbildung 1–4 Original-TAP-Aufreinigungsablauf nach Puig, et al. (2001) (für Details siehe Text).

## 1.3 Ziel der Arbeit

In den bisherigen Untersuchungen wurden erste Modelle zur Funktion von CARP, insbesondere in der Muskulatur, entwickelt. Über die Funktion von CARP in anderen Zelltypen, wie Endothel, Podozyten etc. ist bisher allerdings fast nichts bekannt.

Diese Funktion könnte über die Identifizierung der Proteine aufgeklärt werden, die mit CARP über die Ankyrin-Repeat Domänen interagieren. So könnte man über die Identifizierung eines Proteins, dessen Funktion bereits bekannt ist, einen Hinweis und somit ein besseres Verständnis für die Funktion von CARP gewinnen.

Um anhand seiner Interaktionspartner eine funktionelle Einordnung von CARP vornehmen zu kommen, wurde das vorliegende Projekt in die folgenden Arbeitsschritte gegliedert.

- 1. Über die von Puig und Rigaut (Puig, et al. 2001) entwickelte Tandem-Affinitätsreinigungstechnologie sollten CARP-Proteinkomplexe über zwei Affinitätsaufreinigungsschritte unter nativen Bedingungen in reiner Form gewonnen werden.
- 2. Die aufgereinigten an CARP gebundenen Proteine sollten massenspektrometrisch identifiziert werden.
- 3. Die identifizierten Interaktionen sollten mit Hilfe anderer Methoden, wie z.B. Koimmunpräzipitation und immunzytochemischen Färbungen bestätigt bzw. verifiziert werden.
- 4. Funktionelle Untersuchungen sollten die genauere Funktion von CARP aufgrund der gefundenen Proteininteraktionen herausarbeiten.

## 2 Material und Methoden

## 2.1 Material

## **2.1.1** Geräte

## **Tabelle 2-1 Verwendete Geräte und ihre Hersteller**

Gerät	Hersteller
Analysenwaagen, pH-Elektroden	
Analysenwaage, EMB 200-2	Kern & Sohn GmbH
PE 3600, DeltaRange®	Mettler
Feinanalysenwaage, Basic bzw. BP121S	Sartorius
pH-Meter, MP 220	Mettler
Inkubatoren, Schüttler, Sterilarbeit	
Autoklav	Webeco
Sterilwerkbank, antair BSK	STERIL S.p.A

Rotator, Roto-Shake-Genie Scientific Industries

Edmund Bühler

Vortexer, Vortex-Genie2 Scientific Industries

Magnetrührer, MR2002 – MR3001 Heidolph

Schüttler für Bakterienschüttelkulturen Infors AG

Zellkulturinkubator, Hera cell 240 bzw. Function line Heraeus Instruments

Brutschrank (Bakterienkulturen) Haraeus Instruments

Temperierbad (16°C), Julabo U3

(37°C), GFL 1083

Julabo

GFL

Wärmeblock, Thermomixer comfort Eppendorf

Kühl- und Gefrierschränke

Kühl- und Gefrierschrank (4°C bzw. -20°C) Liebherr, Privileg

Gefrierschrank (-80°C), UltimaII REVCO

Mikroskope

Schüttler

Lichtmikroskop, ID-03 Zeiss
Axiovert25 Zeiss

#### 2 Material und Methoden

Fluoreszenzmikroskop, Axiovert35 Zeiss

Fluoreszenzmikroskop, Olympus BX50 Olympus

Hellfeldkamera Sony

Fluoreszenzkamera, F-View UT-TV0,5xC-3 Olympus

Konfokales Laserscanning Mikroskop, LSM 510 Meta Zeiss

SDS-PAGE, Westernblotting-Zubehör

SDS-PAGE vertikale Laufkammer, SE600-SE400 Hoefer Instruments

Transferkammer, Fastblot B33-B43 Biometra

Röntgenentwicklungsmaschine, Curix60 Agfa

Infrared Imaging System, Odyssey LI-COR Biosciences

Zentrifugen

Mini-Zentrifuge Roth

Tischzentrifuge, Centrifuge 5417R, 5810R Eppendorf

Sorvall® RC-5B refrigerated superspeed centrifuge Du Pont Instruments

Vakuumzentrifuge, Speed Vac Concentrator Bachhofer

**Sonstige Geräte** 

Wasserreinigungsanlage, MilliQ Millipore

Mikrowelle, Micromat AEG

Pipetten (10,20,200,1000µL), Pipetman Gilson

Stromquellen, 400/200 power supply BioRad

500 Volt power supply Buchler Instruments
Elecrophoresis power supply EPS200 Pharmacia Biotech

PCR Thermocycler, Mastercycler *gradient* Eppendorf

Spektralphotometer, NanoDrop ND-1000 Peglab

Plattenphotometer, SpectraCount Packard

UV-Transilluminator, Mighty Bright Hoefer Instruments

Universal Hood Bio-Rad

Gelfiltrationsanlage, ÄKTA *explorer* Pharmacia Biotech

EconoColumn (Chromatographie-Säule) Biorad

Massenspektrometer: ESI-MS/MS, QSTAR XL Applied Biosystems

Finnigan LTQ gekoppelt mit einer Ultimate3000-RT-LC-Säule von Dionex

Thermo/Dionex

#### 2.1.2 Bakterien- und Zellkultur

#### Bakterienstämme und Kulturmedien:

o XL-1 Blue kompetente Zellen, Stratagene

**Luria-Bertani-Medium** (10 g/l Bacto-Tryptone, 5 g/l Bacto-Yeast Extract, 170 mM NaCl, 50  $\mu$ g/ml Ampicillin, pH 7,5); LB-Agar-Medium (10 g/l Bacto-Tryptone, 5 g/l Bacto-Yeast Extract, 170 mM NaCl, 50  $\mu$ g/ml Ampicillin, 15 g/l Agar, pH 7,5)

## Säugerzelllinien und Kulturmedien:

- Human Embryonic Kidney HEK293T-Zellen (European Collection of Cell Culture, ECACC)
- Mouse embryonic fibroblast (MEF) Feeder Zellen wurden aus Mausembryonen
   (e12.5-e13.5) nach Hogan, et al. (1994) präpariert.

**HEK/MEF-Medium:** Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM), 10% Fetal Calf Serum – FCS (Biochrom), 2 mM L-Glutamin, 1x non-essential amino acids (Invitrogen), 100 U/ml Penicillin/Streptomycin

Als Einfriermedium diente DMEM mit 20% FCS- und 10% DMSO-Zusatz.

 Human Umbilical Vein Endothelial Cells – primäre Kulturen von HUVEC-Zellen wurden nach Jaffe, et al. (1973) präpariert.

**HUVEC-Medium:** Das Endothelzell-Medium C-22210 wurde mit den dazugehörigen Zusätzen von der Firma Promocell erworben. Für den *Tube formation-*Fibrinassay wurde das Endothelzell-Medium CC-3162 (Lonza) mit den dazu gehörenden Zusätzen verwendet.

## 2.1.3 Chemikalien

Acrylamid/Bis Rotiphorese Gel 40 (29:1) (Roth), Agar (Roth), Agarose electro-phoresis grade (Invitrogen), Aluminiumsulfat-18-Sulfat (Merck), Ammonium-bicarbonat (Roth), Ampicillin (Roth), Aphidicoline (Fluka), APS (Sigma), Bacto-Tryptone (BD), Bacto-Yeast-Extract (BD), Biotin (Sigma), Bromphenolblau (Serva), BSA (Fluka), Calciumchlorid (Roth), CBB-G250 (Serva), Digitonin (Sigma), DTT (Roche), EDTA (Sigma), Essigsäure (Merck), Ethanol (Merck), Ethidiumbromid (ICN Biomedicals), Glycerol (Sigma), Glycin (Merck), Iodacet-amid (Sigma), Isopropanol (Merck), Kaliumferricyanid (Merck), Lipofectamin

(Invitrogen), Magermilchpulver (Sucofin), Magnesiumchlorid (Roth), Methanol (Merck), Natriumacetat (Merck), Natriumbutyrat (Sigma), Natriumcarbonat (Roth), Natriumchlorid (Merck), Dinatriumhydrogenphosphat - Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Merck), Natriumdihydrogenphosphat - NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Merck), Natriumthiosulfat (Merck), 1M Natronlauge (Roth), Nocodazol (Sigma), NP-40 (Sigma), Nukleo-tidmix 25mM (Invitrogen), ortho-Phosphorsäure (Merck), Paraformaldehyd 37% (Merck), Pikrinsäure (Merck), PIPES (Roth), PMSF (Sigma), Proteinase-Inhibitoren-Cocktail (Sigma), Puromycin (Sigma), D-Saccharose (Roth), 37% Salzsäure (Merck), Saponin (Roth), SDS (Roth), Silbernitrat (Roth), TEMED (Roth), Tris Ultra Pure (MP Biomedicals), Tween 20 (Sigma)

#### 2.1.4 Größenmarker

**DNA-Größenmarker:** Lambda DNA (Invitrogen) verdaut mit EcoRI/HindIII (560, 831, 947, 1375, 1584, 1900, 2027, 4950, 5150, 21000bp), Lambda DNA verdaut mit HpaII (710, 489, 404, 325, 242, 190, 157, 147, 110, 6, 57bp)

**Protein-Größenmarker:** Mark12 Unstained Standard (Invitrogen; 6-200 kDa), PageRuler Prestained Protein Ladder (Fermentas; 11-170 kDa)

#### **2.1.5 Puffer**

**Digitonin-EDTA-Extraktionspuffer (pH 6,8):** 0,015% Digitonin, 1 mM PMSF, 5 mM EDTA, 103 g/l Saccharose, 5,8 g/l NaCl, 3 g/l PIPES, 0,64 g/l MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O

**DNA-Ladepuffer:** 30% (v/v) Glycerol, 0,25% (w/v) Bromphenolblau

**Imidazolpuffer (pH 7,5):** 20 mM Natriumphosphatpuffer (pH 7,5), 500mM NaCl, 100 mM Imidazole

**Lysispuffer:** 10 mM Tris (pH 7,5), 150 mM NaCl, 0,1% NP-40, 1,5 mM PMSF, 1x Proteinase-Inhibitor-Cocktail<sup>1</sup>

**Lämmli-Puffer:** 0,25 M Tris (pH 6,8), 8% (w/v) SDS, 20% (v/v) Glycerol, 100 mM DTT, 0,1 g/l Bromphenolblau

\_

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> 1x Proteinase-Inhibitor-Cocktail enthält die folgenden Inhibitorkonzentrationen: 200 mM AEBSF (inhibiert Serinproteasen wie Trypsin und Chymotrypsin), 100 mM EDTA (inhibiert Metalloproteasen), 13 mM Bestatin (inhibiert Aminopeptidasen), 1,4 mM E-64 (inhibiert Cysteinproteasen wie Calpain, Papain, Cathepsin B und L), 100 μM Leupeptin (inhibiert Serin- und Cysteinproteasen), 30 μM Aprotinin (inhibiert Serinproteasen)

**0,1M Natriumphosphatpuffer (pH 7,4):** 77,4% (v/v) 1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 22,6% (w/v) 1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

PBS (Phosphate Buffered Saline): 2,7 mM KCl, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 137 mM NaCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7,4

**Sammelgelpuffer:** 1 M Tris (pH 6,8)

Sammelgelzusammensetzung für ein 2,5%iges Gel: 2,5 ml 40% Acrylamid, 2,5 ml Sammelgelpuffer, 200  $\mu$ l 10% SDS, 30  $\mu$ l TEMED, 60  $\mu$ l 10% APS, 14,9 ml  $H_2O$ 

SDS-PAGE-Laufpuffer: 25 mM Tris, 250 mM Glycin (pH8,3), 0,1% (w/v) SDS

**S-EDTA:** 0,7 mM EDTA, 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,5 mM  $KH_2PO_4$ , pH 7,2

**Semi-Dry-Blotpuffer:** 190 mM Glycin, 25 mM Tris (pH 8,5), 0,1% (w/v) SDS, 20% (v/v) Methanol

**Strepwaschpuffer:** 100 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA (pH 8,0)

**TAE-Puffer:** 40 mM Tris-Acetat, 1 mM EDTA

**TBS-Puffer:** 150 mM NaCl, 25 mM Tris (pH 7,4)

**TBST-Puffer:** 150 mM NaCl, 25 mM Tris (pH 7,4), 0,1% Tween-20

**TE-Puffer (pH7,4):** 10 mM Tris (pH 7,4), 1 mM EDTA (pH 8,0)

**TEV-Puffer:** 10 mM Tris (pH 8,0), 150 mM NaCl, 0,1% NP-40, 0,5 mM EDTA, 1 mM DTT (frisch dazugeben!)

**Trenngelpuffer:** 1,5 M Tris (pH 8,8)

Trenngelzusammensetzung für ein 10%iges Gel: 10 ml Acrylamid, 10 ml Trenngelpuffer, 400  $\mu$ l 10% SDS, 80  $\mu$ l TEMED, 100  $\mu$ l 10% APS, 20 ml  $H_2O$ 

Trenngelzusammensetzung für Gradientengele: aus 8,5 ml 15%igen und 9,5 ml 7,5%igen Gel (**15%iges Gel**: 3,75 ml Acrylamid, 100  $\mu$ l 10% SDS, 1,5 g D-Saccharose, 2,5 ml Trenngelpuffer, 4  $\mu$ l TEMED, 10  $\mu$ l 10% APS, 3,6 ml H<sub>2</sub>O; **7,5%iges Gel:** 1,9 ml Acrylamid, 100  $\mu$ l 10% SDS, 2,5 ml Trenngelpuffer, 4  $\mu$ l TEMED, 10  $\mu$ l 10% APS, 5,6 ml H<sub>2</sub>O)

**Zytoskelettpuffer:** 5% SDS, 10 mM Natriumphosphatpuffer (pH 7,4)

## **2.1.6 Enzyme**

Alkalische Phosphatase (Roche), Aprotinin (Sigma), Benzonase (Novagen), BsrGI, EcoRI, Fibrinogen Typ I (Sigma), HindIII, HpaII, Klenow (exo-), KpnI, NheI, Phosphonukleotidkinase/ T4-PNK, SacII, SbfI, SwaI, T4-DNA-Ligase, T4-DNA-Polymerase, XbaI (New England Biolabs), Platinum-Pfx-DNA-Polymerase (Invitrogen), Taq-Polymerase (Invitrogen), Proteinase Inhibitor Cocktail (Sigma), Thrombin (Amersham Biosciences)

Das Trypsin für den Peptidverdau isolierter Proteine wurde von Promega erworben.

## 2.1.7 Antikörper und Affinitätsmatrizes

**Primäre Antikörper:** mouse anti-FlagM2 (Sigma), rabbit anti-Flag (Sigma), mouse anti-HA (Cell Signaling), rabbit anti-HA (Sigma), mouse anti-V5 (Invitrogen), mouse anti-beta Aktin (Sigma), sheep anti-gamma Aktin (Chemicon), Phalloidin-FITC (Molecular Probes), rabbit anti-ANKRD1 (Protein Tech Group), mouse anti-Caveolin3 (BD Biosciences), anti-alpha smooth muscle actin (Sigma), mouse anti-Paxillin (BD Biosciences), anti-Vinculin (Sigma), rabbit anti-alpha-Tubulin (Abcam), rabbit anti-beta-Tubulin (Abcam)

**Sekundäre Antikörper:** HRP-anti-mouse (Cell Signaling), HRP-anti-rabbit (Cell Signaling), FITC-anti-mouse (Jackson Immuno Research - JIR), TRITC-anti-mouse (JIR), FITC-anti-rabbit (JIR), TRITC-anti-rabbit (JIR), Alexa Fluor800 anti-mouse (Licor), AlexaFluor800 anti-rabbit (Licor), AlexaFluor680 anti-mouse (Licor), AlexaFluor680 anti-rabbit (Licor), AlexaFluor680 anti-sheep (Invitrogen), HRP-anti-goat (Sigma)

**Affinitätsmatrices:** IgG-Sepharose (Pharmacia), anti-Flag M2 Agarose Affinity Gel, StrepTactin Sepharose – 50% Suspension (IBA), StrataClean Resin (Stratagene), Cytodex-3-Microcarrier Beads (Amersham Pharmacia)

#### 2.1.8 Kits

High Molecular Weight Gel Filtration Calibration Kit (Pharmacia Biotech) für die Eichung der Gelfiltrationssäule, BCA Protein Kit (Pierce), Assay Immunoprecipitation Starter Pack (Amersham Biosciences), NucleoBond PC100/500 Midi/Maxi DNA Kit (Macherey Nagel), QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen), Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus (PerkinElmer)

## 2.1.9 Oligonukleotide/PCR-Primer

Alle Oligonukleotide wurden von Invitrogen erworben.

**Tabelle 2-2 Übersicht über die in der Arbeit hergestellten DNA-Fragmente aus einer PCR-Reaktion (2.2.1.1).** Fragmentgrößen sind in Basenpaaren (bp) ange-geben; *fwd*, forward-Primer; *rev*, reverse-Primer; für die genaue Beschreibung der genannten DNA-Matrices siehe 2.1.10.

Nr.	Name	DNA-Matrix	bp	°C	Primerpaar
P1	CARP-cDNA	Maus-cDNA	960	55	Fwd:AACATGATGGTACTGAGAGT Rev:TCAGAATGTAGCTATGCGAG
P2	DARP-cDNA	Maus-cDNA	918	55	<b>Fwd:</b> ATGGACTTCATCAGCATTGAGCAGTTG
Р3	CARP-cDNA	pGJ3-CARP-C-	960	56	Rev:GCACCGGGTACGGGGATG Fwd:AACATGATGGTACTGAGAGT
		Flag			Rev:TCAGAATGTAGCTATGCGAG
P4	DARP-cDNA	pGJ3-DARP-C- Flag	918	56	<b>Fwd:</b> ATGGACTTCATCAGCATTGAGCAG
					Rev:GCACCGGGTACGGGGATG
P5	CAGGS- Promotor	pCAGGS-FlpE	1800	56	Fwd:ATAGGATCCGTCGACATTGATTAT TGACTAGTT
					<b>Rev:</b> ATAGGTACCGGTGGCGGCGGTA ATTCTCTTTG
P6	Beta-Aktin	Sport 6- Gammaactin	1128	56	<b>Fwd:</b> ATGGAAGAAGAAATCGCCGCACTCGTCGTTGACAATGGCTCC
					Rev:GAAGCATTTGCGGTGGACGATGGA
					G
P7	Gamma-Aktin	Sport 6- Gammaactin	1128	56	Fwd:ATGGATGACGATATCGCCGCACTC GTCGTTGACAATGGCTCC Rev:GAAGCATTTGCGGTGGACGATGGA
					G

Tabelle 2-3 Übersicht über die in der Arbeit hergestellten DNA-Fragmente aus einer Oligonukleotid-Hybridisationsreaktion. Oligonukleotide wurden 10 min bei 95°C erhitzt und zur Hybridierung bis auf RT abgekühlt; Fragmentgrößen sind in Basenpaaren (bp) angegeben.

Nr.	Name	Oligo- nukleotid länge	- Oligonukleotidpaar
A1	Flag-Tag	69	<b>sense:</b> ACGACTACAAAGACCATGACGGTGATTATAAAGATCATGACATCGATTACAAGGATGACGATGACAAGG
A2	Linker	51	antisense:CTAGCCTTGTCATCGTCATCCTTGTAATCGATGTCATG ATCTTTATAATCACCGTCATGGTCTTTGTAGTCGTT sense:AACCGAGGTGGCGGTGGCAGTGGCGGTGGCAGTGTG GAACCTGCAGGC antisense:GCCTGCAGGTTCCACACTGCCACCGCCACCACTGCCA CCGCCACCTCGGTT
Nr.	Name	Oligo- nukleotid länge	- Oligonukleotidpaar
А3	Strep-Tag	32	sense:GGTGTGGTCTCATCCTCAATTTGAAAAATAAT
A4	Mono-Flag	39	antisense:GTACATTATTTTTCAAATTGAGGATGAGACCACACCGC sense:GGTGGCGGTGGCAGTGGCGGTGGCAGTACTGATTAC AA

A5	Um-klonierungI	39	antisense: CTAGCCTTGTCATCGTCATCCTTGTAATCAGTACTGCCACC sense:CTAGCGGAGAGAACCTGTACTTCCAGGGAGGTGACTATAA A
			antisense:GTACATTACCCCTTGTCGTCATCGTCTTTATAGTCACC
A6	Um-klonierungII	39	TCC sense:CTAGCCTGGTGCCCAGAGGCTAGGATGGTCACACCCACAG
AU	om-kiomerungn	39	antisense:CTAGAGCCTTTCTCGAACTGTGGGTGTGACCATCCTG
			AGCC
Α7	Um-klonierungIII	30	sense:CTAGCGGCATAGTCGGGCACGTCGTATGGGTACCCTGCA
			antisense:GGGTACCCATACGACGTGCCCGACTATGCCG
A8	Um-klonierungIV	39	sense:CTAGCTGGTCACACCCACAGTTCGAGAAAGGATCGATTT
	_		antisense:CTAGAAATCGATCCTTTCTCGAACTGTGGGTGTGACC
			AG

Tabelle 2-4 Übersicht über die in der Arbeit hergestellten DNA-Fragmente aus einer Restriktionsreaktion (2.2.1.6). Für die genaue Beschreibung der genannten Ursprungsplasmide siehe 2.1.10.

Nr.	Fragment- name	Ursprungsplasmid	Restriktionsenzym(e)
V1	TAP-Tag	pZome1-C	KpnI/BsrGI
V2	CARP-TAP <sub>w</sub>	pGJ3-CARP-C-TAP <sub>w</sub>	SwaI/BsrGI
V3	DARP-TAP <sub>w</sub>	pGJ3-DARP-C-TAP <sub>w</sub>	SwaI/BsrGI
V4	PGK-Puro	pSico-PGK-Puro	ScaI/EcoRI

## **2.1.10** Plasmide

Tabelle 2-5 Übersicht über die in der Arbeit erworbenen (A) und klonierten (B) Plasmide (für Insert-Information siehe 2.1.9, für TAP-Tag-Entwicklung siehe Kapitel 3.1)

A. Vektorname	Firma
pGJ3-CSCGW	freundliches Geschenk von Prof.Dr. Helmut Hanenberg (Leurs, et al. 2003); auf diesem Plasmid basieren sämtliche Klonierungen in dieser Arbeit, und es wird deshalb mit <b>pGJ3</b> abgekürzt.
pZome1-C	CellZome, basiert auf pBabe-Puro (Morgenstern und Land 1990) und beinhaltet den TAP-Tag (Rigaut, et al. 1999)
pSico-PGK-Puro	Addgene (Plasmidnr. 11586)
pCAGGS-Flpe	European Molecular Biology Laboratory, EMBL (Nr. A201)

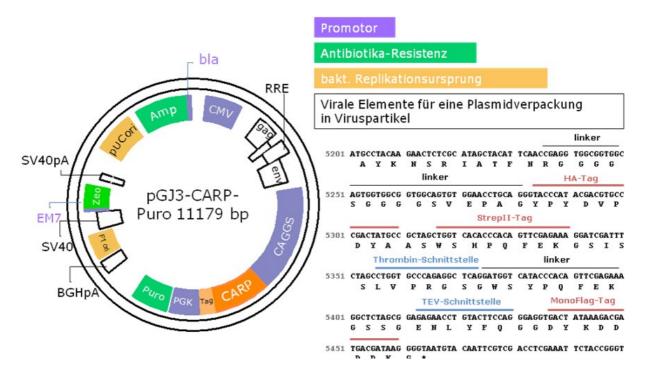
B. Vektorname	Restriktion	Insert	Endplasmid (TAP-Tag-Konstrukt)
pGJ3-CSCGW	KpnI/BsrGI	V1	pGJ3-C-Tag (CBP-TEV-ZZ)
pGJ3-C-Tag	HpaI/NheI	A1	pGJ3-C-Flag (3xFlag-TEV-ZZ)
pGJ3-C-Flag	HpaI	P1	pGJ3-CARP-C-Flag (CARP-3xFlag-TEV-ZZ)
pGJ3-C-Flag	HpaI	P2	pGJ3-DARP-C-Flag (DARP-3xFlag-TEV-ZZ)

## 2 Material und Methoden

pGJ3-C-Flag	HpaI	A2	pGJ3-C-FlexTag (linker-3xFlag-TEV-ZZ)
pGJ3-C-FlexTag	SacII/BsrGI	А3	pGJ3-C-StrepTag (linker-3xFlag-TEV-Strep)
pGJ3-C-StrepTag	HpaI	P3	pGJ3-CARP-C-Strep (CARP-linker-3xFlag-TEV-Strep)
pGJ3-C-StrepTag	HpaI	P4	pGJ3-DARP-C-Strep (DARP-linker-3xFlag-TEV-Strep)
pGJ3-CARP-C-Strep	SbfI/NheI	A4	pGJ3-CARP-C-Mono (CARP-linker-1xFlag-TEV-Strep)
pGJ3-DARP-C-Strep	SbfI/NheI	A4	pGJ3-DARP-C-Mono (DARP-linker-1xFlag-TEV-Strep)
pGJ3-CARP-C-Mono	NheI/BsrGI	A5	pGJ3-CARP-C-U1 (CARP-linker-1xFlag-TEV-TEV-1xFlag)
pGJ3-DARP-C-Mono	NheI/BsrGI	A5	pGJ3-DARP-C-U1 (DARP-linker-1xFlag-TEV-TEV-1xFlag)
pGJ3-CARP-C-U1	NheI	A6	pGJ3-CARP-C-U2 (CARP-linker-1xFlag-TEV-Strep-TEV-1xFlag)
pGJ3-DARP-C-U1	NheI	A6	pGJ3-DARP-C-U2 (DARP-linker-1xFlag-TEV-Strep-TEV-1xFlag)
pGJ3-CARP-C-U2	NheI/SbfI	A7	pGJ3-CARP-C-U3 (CARP-linker-Strep-TEV-1xFlag)
pGJ3-DARP-C-U2	NheI/SbfI	A7	pGJ3-DARP-C-U3 (DARP-linker-Strep-TEV-1xFlag)
pGJ3-CARP-C-U3	NheI	A8	pGJ3-CARP-C-TAP $_{\rm W}$ (CARP-linker-HA-Thrombin-Strep-TEV-1xFlag)
pGJ3-DARP-C-U3	NheI	A8	pGJ3-DARP-C-TAP <sub>w</sub> (DARP-linker-HA-Thrombin-Strep-TEV-1xFlag)
pGJ3-C-StrepTag	BamHI/KpnI	P5	pGJ3-C-CAGGS
pGJ3-C-CAGGS	SwaI/BsrGI	V2	pGJ3-CARP-C-TAP <sub>s</sub> (CARP-linker-HA-Thrombin-Strep-TEV-1xFlag)
pGJ3-C-CAGGS	SwaI/BsrGI	V3	pGJ3-DARP-C-TAP <sub>s</sub> (DARP-linker-HA-Thrombin-Strep-TEV-1xFlag)
pGJ3-CARP-C-TAPs	BsrGI	V4	pGJ3-CARP-C-Puro (CARP-linker-HA-Thrombin-Strep-TEV-1xFlag)

Exemplarisch für die erzeugten Plasmide zeigt Abbildung 2–5 den genauen Aufbau des finalen Expressionsplasmids, das eine Expression des getaggten CARP unter der Kontrolle des starken CAGGS-Promotors, der aus dem Cytomegalovirus-Enhancer, dem chicken  $\beta$ -Aktin Promotor und dem rabbit  $\beta$ -Globin poly(A) Signal besteht und dessen Name sich aus dem von Araki et al.

entwickelten pCAGGS-Vektor herleitet (Araki et al., 1997). Weiterhin ist die genaue Zusammensetzung des optimierten TAP-Tags zu sehen (für Tag-Entwicklung siehe Kapitel 3.1). Die weiteren Elemente des Expressions-plasmids sind bakterielle (Ampicillin/Amp) sowie eukaryotische Antibiotika-Resistenzgene (Puromycin/Puro und Zeocin/Zeo). Die Transkription dieser Antibiotika-Resistenzgene wird von dem β-Lactamase Promotor (bla), dem Phosphoglyceratkinase/PGK-Promotor bzw. dem EM7-Promotor reguliert. Die bakteriellen Replikationsursprünge sorgen weiterhin für die Herstellung doppelsträngiger Plasmidkopien (pUCori) sowie einzelsträngiger Plasmidkopien (F1 ori). Ferner treibt ein Cytomegalovirus-Promotor (CMV) mit Hilfe des SV40-Enhancers (SV40, SV40 poly-A-Schwanz) die Transkription der viralen RNA, die in Viruspartikel verpackt wird.



**Abbildung 2–5 Plasmidkarte von pGJ3-CARP-C-TAP**s **und die TAP-Tag-Sequenz** (siehe Text für die detaillierte Erklärung der Plasmideinzelelemente)

## 2.2 Methoden

## 2.2.1 Bearbeitung von Nukleinsäuren

Alle im Folgenden aufgeführten Methoden wurden, wenn nicht anders angegeben, nach den Standardprotokollen von Sambrook und Russell durchgeführt (Sambrook und Russell 2001).

## 2.2.1.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion wurde zur Amplifikation der cDNA, *copy* DNA, des Zielproteins, CARP, und die des homologen Proteins, DARP, angewandt. Für eine korrekte Amplifikation der DNA-Sequenz wurde die *Pfx*-DNA-Polymerase unter Beachtung der Reaktionsbedingungen laut Hersteller eingesetzt. Eine detaillierte Übersicht über die durchgeführten PCR-Reaktionen steht unter 2.1.9.

## 2.2.1.2 Agarosegelelektrophorese zur Auftrennung von DNA

DNA-Fragmente wurden gelelektrophoretisch in einem 1%-igen oder 1,5%-igen, Ethidiumbromid-haltigen (0,006% (v/v)) Agarosegel in 0,5x TAE-Puffer aufgetrennt und anschließend ausgewertet. Als DNA-Größenmarker wurde für Fragmentlängen über 500 bp der Lambda-EcoRI/HindIII-Marker, für Fragmentlängen unter 700 bp der pBluescript-HpaII-Marker benutzt. Nach ihrer Vorbereitung im DNA-Ladepuffer wurden die DNA-Proben ca. 1 h bei 100 V im Agarosegel aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel auf einem UV-Tisch belichtet, photographiert und das Bild mit dem Computerprogramm QuantityOne 4.5.2 (BioRad) ausgewertet.

#### 2.2.1.3 Kultivierung transformierter E.coli Bakterien

Zum Animpfen von 200 ml LB-Medium (mit 50  $\mu$ g/ml Ampicillin) wurde entweder eine Mini-Kultur (ca. 2 ml) verwendet oder eine auf einer Agarplatte gewachsene Kolonie gepickt. Anschließend wurde die angeimpfte Kultur über Nacht bei 37°C geschüttelt.

## 2.2.1.4 Präparation von Plasmid-DNA aus E.coli

Die Plasmidpräparation erfolgte nach dem Prinzip der alkalischen Lyse mit dem NucleoBond PC500 Maxi DNA Kit (Macherey & Nagel, Düren). Die nach der Lyse und Neutralisation gewonnene Plasmid-DNA wurde über Anionen-austauscher-Säulen gereinigt und mit Isopropanol bei 4°C gefällt, mit 70%-igem Ethanol gewaschen und in 1x TE-Puffer aufgenommen.

Bei Mini-Kulturen wurde der Reinigungsschritt über die Anionenaustauscher-Säulen nicht durchgeführt. Die DNA wurde direkt nach dem Neutralisationsschritt von kontaminierenden Zelltrümmern durch einen Zentrifugationsschritt abgetrennt, mit Isopropanol gefällt, mit 70%-igem Ethanol gewaschen und in 1x-TE-Puffer aufgenommen.

## 2.2.1.5 Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA

Die mit Hilfe des Photometers (Nanodrop) ermittelte  $OD_{260}$  ermöglichte die Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration. Der Quotient  $OD_{260}/OD_{280}$  wurde als Maß für den relativen Proteingehalt und damit für die Reinheit der Proben herangezogen. Sowohl die Bestimmung der Konzentration als auch des Reinheitsgrades erfolgte mit Hilfe der zum Nanodrop gehörigen Software ND-1000 3.2.1.

#### 2.2.1.6 DNA-Restriktionsendonuklease-Reaktion

Alle Reaktionen mit DNA-Restriktionsendonukleasen wurden laut den vom Hersteller empfohlenen Reaktionsbedingungen durchgeführt. In der Regel erfolgte eine Phenol-Chloroform-Extraktion zur Entfernung des Enzyms nach der Restriktionsreaktion. Dazu wurde das gleiche Reaktionsvolumen eines Phenol-Chloroform-Gemisches zum Reaktionsansatz addiert, vermischt und anschließend 15 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Die in der oberen, wässrigen Phase gelöste DNA wurde mit DNA-Ladepuffer gemischt und in einem Agarosegel aufgetrennt.

## 2.2.1.7 Reinigung von DNA aus Agarosegelen

Das Verfahren der Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen ermöglichte nach abgelaufener Gelelektrophorese die Entfernung des Gelmaterials zur Weiterverwendung der aufgereinigten, aufgetrennten DNA-Fragmente. Mit dem QIAquick *Gel Extraction Kit* wurden DNA-Fragmente (70-10000 bp) aus Agarosegelen mit Hilfe von Anionenaustauscher-Minisäulen gereinigt.

## 2.2.1.8 DNA-Ligation

Insert-DNA wurde mit Vektor-DNA sowohl im dreifachen als auch im fünffachen molaren Überschuss unter Einwirkung der T4 DNA-Ligase ligiert. Dabei wurden 100-150 ng Vektor-DNA eingesetzt. Die Ligation fand entweder bei RT für 4 hoder über Nacht bei 16°C statt.

## 2.2.1.9 Transformation kompetenter E.coli Zellen

Kompetente XL-1-Blue Zellen wurden 30 min mit dem Ligationsansatz auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock für 30 sec bei 42°C, gefolgt von einer unmittelbaren Abkühlung auf Eis für 1 min. Danach wurden 250  $\mu$ l LB-Medium ohne Zusatz von Ampicillin dazugegeben. Die transformierten Bakterien wurden 1h bei 37°C und 800 rpm im Wärmeblock geschüttelt. 225  $\mu$ l (90%) bzw. 25  $\mu$ l (10%) des Transformationsansatzes wurden auf eine Ampicillinhaltige LB-Agarplatte ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Gewachsene Kolonien wurden zum Animpfen von 2 ml-Minikulturen verwendet. Diese wurden wiederum über Nacht bei 37°C und 300 rpm geschüttelt.

#### 2.2.1.10 Sonstige Modifikationen von DNA-Fragmenten

Je nach Klonierungsstrategie wurden weitere DNA-Modifikationen vorgenommen. Zur Verhinderung der Re-Ligation der Vektor-DNA wurde diese mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert. Um eine Ligation mit der Insert-DNA trotzdem zu ermöglichen, wurde diese im Falle von Oligonukleotiden mit der Polynukleotidkinase phosphoryliert. Für blunt-end-Klonierungen wurden die DNA-Fragmente entweder am 5'-Überhang mit einer Klenow-Polymerase oder am 3'-Überhang mit einer T4-DNA-Polymerase aufgefüllt. Alle Enzyme wurden unter den vom Hersteller empfohlenen Reaktionsbedingungen eingesetzt.

## 2.2.2 Zellkultur eukaryontischer Zelllinien

## 2.2.2.1 Kultivierung von HEK293T- und HUVEC-Zellen

HEK293T-Zellen wurden im DMEM-Medium nach Zugabe der Mediumzusätze kultiviert. HUVEC-Zellen wurden dagegen im Endothelzellmedium kultiviert (siehe

2.1.2). Haben die Zellen eine 100%-ige Konfluenz erreicht, so wurden sie mit S-EDTA gewaschen (zwei S-EDTA-Waschschritte für die HUVEC-Zellen) und mit Trypsin-EDTA (0,5 g/l Trypsin, 0,2 g/l EDTA·4Na) von der Zellkulturschale abgelöst. Durch einen Zentrifugationsschritt wurden die gesammelten Zellen vom Trypsin (im Über-stand) befreit, auf neue Zellkulturschalen mit frischem Medium verteilt und jeden zweiten Tag mit frischem Medium versetzt.

#### 2.2.2.2 Transiente Transfektion von HEK293T-Zellen

Zur transienten Transfektion wurden 60-80% konfluente HEK293T Zellen auf einer 10cm-Zellkulturschale verwendet. Die Liopofektion erfolgte laut Angaben des Herstellers. In 1,5 ml Opti-Mem (Invitrogen, Karlsruhe) wurden 45  $\mu$ l Lipofectamin 5 min gelöst. In weiteren 1,5 ml Opti-Mem wurden 18  $\mu$ g Plasmid-DNA gelöst. Beide Lösungen wurden vereinigt, und nach 30 min wurde das DNA-Lipofectamin-Gemisch zu den Zellen gegeben. Die Zellen wurden nach drei Tagen geerntet.

## 2.2.2.3 Lentivirale stabile Transfektion

Für die Herstellung von Vektor-haltigen Lentiviren wurde zunächst eine transiente Transfektion mittels Lipofectamin in HEK293T Zellen durchgeführt (siehe 2.2.2.3). Aus Sicherheitsgründen sind die erforderlichen Gene für die Virusproduktion auf drei Plasmide verteilt. Die virale RNA, die später in Partikel verpackt werden soll, begründet sich auf den in dieser Arbeit erzeugten Plasmiden (siehe 2.1.10). Das Helferplasmid enthält die Gene gag und pol, die für das Matrix- und Kapsidprotein beziehungsweise für die reverse Transkriptase kodieren (Mochizuki, et al. 1998). Das Verpackungsplasmid pCZ-VSV-G enthält das Gen (env) für das Hüllprotein Glykoprotein G des Vesikulär-Stomatitisvirus (VSV-G), das den viralen Eintritt in die Wirtszelle ermöglicht. Dabei spielt es einerseits eine Rolle bei der Anhaftung des Viruspartikels an der Zellmembran und andererseits bei der Fusion der viralen Hülle mit der endosomalen Membran mit anschließendem Transfer des viralen Nukleokapsids in das Zytoplasma (Pietschmann, et al. 1999). Von allen drei Plasmiden wurden jeweils 5 µg DNA eingesetzt. 6 h nach Transfektion wurde die Expression der viralen Bestandteile durch Zugabe von 100 µl 1 M Natrium-butyrat (Endkonzentration: 10 mM) verstärkt. 24 h nach der Trans-fektion wurde das Medium gewechselt, die Viren wurden in 10 ml Medium gesammelt und nach 24 h geerntet. Nach Entfernung

der HEK293T Zellen mittels Sterilfiltration (0,45 µm Filterporengröße) wurden HEK293T- und HUVEC-Zellen mit dem Virusüberstand infiziert. Nach 24 h wurde der Virus-überstand entfernt. Die Zellen wurden gewaschen, mit frischem Medium versetzt und nach 24 h durch Zugabe von Puromycin selektioniert (1 µg/ml für HUVEC-Zellen bzw. 9 µg/ml für HEK293T-Zellen). Zellen, die die Plasmid-DNA in ihrem Genom integriert haben und das Zielprotein exprimierten, haben zusätzlich ein mitkloniertes Puromycin-Resistenzprotein exprimiert und haben dementsprechend die Selektion überlebt. Nach 3-5 Tagen wurde die Selektion aufgehoben, und die Zellen wurden weiter kultiviert. Die Expression des Zielproteins wurde anschließend im Western-Blot detektiert.

## 2.2.2.4 Zellsynchronisation

Die zu synchronisierenden Zellen wurden bei einer 40%-igen Konfluenz mit 100 ng/ml Nocodazol für einen G2/M-Block behandelt und über Nacht kultiviert. Am folgenden Tag wurden die Zellen durch frisches Medium vom Zellzyklus-Block befreit und zu unterschiedlichen Zeitpunkten fixiert und für immuncytochemische Zwecke verwendet (Whitfield, et al. 2002).

## 2.2.3 Bearbeitung von Proteinen

Alle im Folgenden aufgeführten Methoden wurden, wenn nicht anders angegeben, nach den Standardprotokollen von Sambrook und Russell durchgeführt (Sambrook und Russell 2001).

## 2.2.3.1 Präparation von Protein-Zellextrakten

Auf Zellkulturschalen gewachsene Zellen wurden in  $100\text{-}200~\mu\text{l}$  (für 6-Well-Platten), 1~ml (für eine 10cm-Schale) und 1,5~ml (für eine 15cm-Schale) Lysispuffer aufgenommen, mit einem Zellschaber geerntet und 5~min auf Eis lysiert. Anschließend wurde das Zelllysat 15~min bei  $4^{\circ}\text{C}$  abzentrifugiert. Die zytoplasmatische Fraktion befand sich im Überstand, die Kerne im Sediment.

## 2.2.3.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinen (BCA-Assay)

Die Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration erfolgte nach (Smith, et al. 1975). Dazu wurde der BCA Protein Assay Kit herangezogen. Eine BSA-Reihe (25-1000  $\mu$ g/ml) diente zur Eichung. Die Verwendung einer 96-Mikrotiterplatte ermöglichte eine Absorptionsmessung im ELISA-Reader bei 562 nm.

# 2.2.3.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) zur Auftrennung von Proteinen

Für die Auftrennung von Proteinen wurde die diskontinuierliche Elektrophorese angewandt. Im 10%-igen Trenngel wurden die Proteine nach ihrer Größe aufgetrennt. Die Proteine wurden vor dem Gelauftrag in Lämmli-Puffer bei 95°C denaturiert.

Die SDS-PAGE wurde mit der Hoefer-Elektrophoresekammer durchgeführt. Die Trennung erfolgte bei Spannungen zwischen 50-200 V, bis die Lauffront aus dem Gel in den Elektrodenpuffer ausgetreten war.

Anschließend wurden die Gele entweder auf eine Nitrocellulosemembran transferiert (geblottet) oder gefärbt.

### 2.2.3.4 Immundetektion von Proteinen im Western-Blot

Für den Transfer der aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulosemembran wurde die Semidry-Blotkammer verwendet. Dazu wurden sowohl die Nitrocellulosemembran als auch die Gele im Semidry-Blotpuffer äquilibriert. Der Transfer erfolgte 1,5 h bei konstanten 300 mA (2,5 mA/cm² Membranfläche).

Die Membran wurde anschließend 1 h in 5%-Magermilchpulver/TBS inkubiert. Die Inkubation mit dem primären bzw. sekundären Antikörper erfolgte für 1 h in 5%-Magermilchpulver/TBST in der entsprechenden Antikörperkonzentration. Alle Waschschritte wurden mit TBST durchgeführt und zum Schluss wurde die Membran in PBS gewaschen.

Bei HRP-konjugierten Sekundärantikörpern wurde die Membran in einer Dunkelkammer mit der ECL-Lösung 1 min inkubiert, und das Signal wurde auf einem Röntgenfilm (Hyperfilm der Firma GE Healthcare, Braunschweig) sichtbar gemacht.

Bei fluoreszenz-gekoppelten Sekundärantikörpern wurde die Odyssey-Infrarot-Imaging-Anlage zur Auswertung des Western-Blots verwendet. Diese ermöglicht im Gegensatz zur Chemilumineszenz eine quantitative und eine gleichzeitige Detektion zweier Proteine bei zwei unterschiedlichen Wellenlängen.

#### 2.2.3.5 Färbung aufgetrennter Proteine nach SDS-PAGE

Die Coomassie-Färbung von aufgetrennten Proteinen erfolgte nach einem modifizierten Protokoll, das von Kang, et al. (2002) entwickelt wurde. Durch die Verwendung von Aluminiumsulfat konnten die Sensitivität der Färbung erhöht und der Hintergrund minimiert werden. Dafür wurden die Gele 1 h mit  $H_2O_{dd}$  gewaschen, um störendes SDS zu entfernen. Anschließend wurde das Gel 3 h gefärbt, 1 h mit der Entfärbungslösung (10%Ethanol, 2%Ortho-Phosphorsäure) behandelt und schließlich in  $H_2O_{dd}$  gelagert.

Bei geringeren Proteinmengen wurde die empfindlichere Silberfärbung der Coomassie-Färbung vorgezogen. Dabei wurde ein Massensprektrometrie-kompatibles Protokoll verwendet (Shevchenko, et al. 1996):

20 min **Fixierer 1:** 5% (v/v) Essigsäure, 50% (v/v) Methanol

2x 10 min **Fixierer 2:** 50% (v/v) Methanol

10 min **Wasch:** aqua dest.

1 min **Thiosulfatreagenz:** 0,02% (w/v) Natriumthiosulfat

3x 20 sec **Wasch:** agua dest.

20 min **Silbernitratreagenz:** 12M Silbernitrat, 0,007% (v/v) Formaldehyd

3x 20 sec **Wasch:** agua dest.

5-10 min **Entwickler:** 30 g/L Natriumcarbonat, 0,019% (v/v) Formaldehyd,

0,0005% (w/v) Natriumthiosulfat

3x 20 sec **Wasch:** aqua dest.

5 min **Stop-Reagenz:** 5% (v/v) Essigsäure Lagerung **Lager-Reagenz:** 2% (v/v) Essigsäure

# 2.2.3.6 Aufarbeitung von Proteinen aus SDS-Akrylamid-Gelen zur Vorbereitung auf die Massenspektrometrie

Die Aufarbeitung von Proteinen aus dem Gel zur Vorbereitung auf die massenspektrometrische Messung erfolgte nach Gharahdaghi (1999).

Hierzu wurden Silber- oder Coomassie-gefärbte Banden aus dem SDS-Gel mit einem Skalpell möglichst knapp ausgeschnitten, in 1 mm² große Stücke geschnitten und in ein 0,5 ml LoBind-Eppendorf-Gefäß (silikonisiert) überführt. Zunächst wurden die Gelstückchen in der Vakuumzentrifuge 45 min bei 56-60°C getrocknet.

Mit 40  $\mu$ l eines 30 mM Kaliumhexacyanoferrat/100 mM Natriumthiosulfat 1:1-Gemisches wurden die silbergefärbten Banden entfärbt und dreimal mit 80  $\mu$ l 100 mM Ammoniumbicarbonat jeweils 15 min bei RT gewaschen. Anschließend wurden die entfärbten Gelstückchen in der Vakuumzentrifuge getrocknet. Coomassie-gefärbte Banden wurden ihrerseits mit der Entfärberlösung (siehe 2.2.3.5) entfärbt und direkt in der Vakuumzentrifuge getrocknet.

Mit 40  $\mu$ l eines 10 mM DTT/100 mM Ammoniumbicarbonat Reagenzes wurden die Cysteinreste von Disulfidbrücken 15 min bei 56°C reduziert. Anschließend wurden sie mit 40  $\mu$ L 55 mM Iodacetamid/100 mM Ammoniumbicarbonat alkyliert. Die Reduzierung und Alkylierung der Cysteinreste war nicht notwendig, führte aber zu einer verbesserten Sequenzabdeckung und wurde deswegen im Protokoll übernommen. Mit einem Acetonitril/Ammonium-bicarbonat 1:1-Gemisch wurden die Gele teilweise dehydriert und anschlie-ßend in der Vakuumzentrifuge komplett getrocknet.

Für die Trypsinspaltung wurden die Gelstückchen in der Trypsin-Lösung (12,5 ng/ µl Trypsin, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 50 mM Ammoniumbicarbonat) rehydratisiert und 45 min auf Eis inkubiert. Überschüssige Lösung wurde anschließend abge-nommen und verworfen. Die Gelstückchen wurden dann mit der Trypsin-Lösung (ohne Trypsin) überschichtet und 16 h bei 37°C inkubiert.

Die sich im Überstand befindenden Peptide wurden in ein neues 0,5 mL LoBind-Eppendorfgefäß überführt. Zur Extraktion weiterer Peptide wurden die Gelstückchen mit 20 µl 25 mM Ammoniumbicarbonatlösung 10 min gewaschen – dabei kräftig geschüttelt – und 5 min im Ultraschallbad inkubiert. Zum Schluss wurden 20 µl Acetonitril dazugegeben, 10 min kräftig geschüttelt und erneut 5 min im Ultraschallbad inkubiert. Die extrahierten Peptide wurden in das gleiche Eppendorfgefäß überführt, das den Überstand der tryptischen Spaltung enthielt.

Für den zweiten und dritten Extraktionsschritt wurde anstelle der 25 mM Ammoniumbicarbonatlösung 20  $\mu$ L 5% Ameisensäure verwendet. Alle nachfolgenden Schritte wurden wie beim ersten Extraktionsschritt durchgeführt. Zum Schluss wurden die extrahierten Peptide in der Vakuumzentrifuge getrocknet und somit für die massenspektrometrische Analyse vorbereitet.

# 2.2.3.7 Identifizierung isolierter Proteine in der Massenspektrometrie (ESI-MS/MS)

Die lyophilisierten Peptide wurden mit einer C18-ZipTip-Spitze entsalzt. Dafür wurde die ZipTip-Spitze dreimal in einem 60% Methanol/1% Ameisensäure-Gemisch und einmal in 4% Methanol/1% Ameisensäure äquilibriert. Die Peptide wurden durch wiederholtes Auf- und Abpipettieren an der ZipTip-Spitze gebunden, dreimal mit 4% Methanol/1% Ameisensäure gewaschen und mit 10  $\mu$ L 60% Methanol/1% Ameisensäure eluiert.

Die massenspektrometrische Analyse der eluierten Peptide wurde sowohl an der QStar-XL- als auch an der LTQ-ESI-MS/MS-Anlage durchgeführt. Während bei der QStar-XL-ESI-MS/MS die Peptidproben durch eine Nanosprayquelle in Primärtröpfchen von 200 nm Durchmesser durch den Massenspektrometer überführt wurden, wurden die einzelnen Peptide jeder Probe bei der Verwendung der LTQ-ESI-MS/MS zunächst über eine Nano-HPLC-Chromatographiesäule aufgetrennt, bevor sie als Ionenspray im Massen-spektrometer detektiert wurden. Die Messung erfolgte mit Hilfe der Software Analyst QS. Als erstes wurde die Anlage kalibriert, indem die 1,5 µl der Kalibrantenlösung (Cäsium 132,9049 Dalton, synthetisches Peptid 828,5559 Dalton) in eine Glaskapillare (Protana, Toronto) mit Hilfe einer Micro-loaderspitze (Eppendorf, Deutschland) pipettiert wurde. Nachdem die Kapillare in das dafür vorgesehene Halterungssystem befestigt wurde, wurde der Ionisierungsvorgang durch Anlegen einer Spannung von 1200 V an die Kapillarspitze gestartet und das Spektrum aufgenommen. Die Signalintensität der Peptide wurde in Abhängigkeit von ihrem m/z-Wert (Masse pro Ladung) aufgetragen. Da bei der Elektrosprayionisierung mehrfach geladene Ionen auftreten können, wurden die entstandenen Signale auf ihre Ladungszahl untersucht. Der jeweilige Ladungszustand ließ sich über das Isotopenmuster bestimmen<sup>2</sup>. Danach wurde die Masse des Peptids berechnet und dementsprechend wurde die Ionenfalle eingestellt, dass sie nur das zu analysierende Peptid durchlässt. Dieses Peptid wurde daraufhin mit einer Kollisionsenergie von 20 weiter fragmentiert. Somit wurde aus jedem Peptid, das

-

 $<sup>^2</sup>$  Die monoisotopische Masse eines Moleküls bezeichnet die Masse des leichtesten Isotops. Neben diesem sind natürlich vorkommende schwerere Isotope der einzelnen Moleküle in statistischer Verteilung in den Analytmolekülen enthalten. Als schweres Isotop ist bei Proteinen/ Peptiden vor allem  $^{13}$ C von Bedeutung. Der Massenunterschied von 1 Dalton für  $^{13}$ C/ $^{12}$ C ist im Massenspektrometer sichtbar.

im Übersichtsspektrum (MS) detektiert wurde, ein weiteres Fragmentierungsspektrum (MS/MS) gemessen. Mit dem entstandenen *Peptide Mass Fingerprint* konnte die Identifikation des Proteins über einen Vergleich mit Proteindatenbanken erfolgen. Dies wurde unter Verwendung von Algorithmen und Implementierung durch die Suchmaske Mascot durchgeführt.

#### 2.2.3.8 Tandem-Affinitätsaufreinigung (TAP)

Das vom Séraphin-Labor beschriebene TAP-Protokoll (Rigaut, et al. 1999) (Puig, et al. 2001) wurde im ersten Teil der Doktorarbeit mehrmals modifiziert und zur Aufreinigung vom TAP-getaggten CARP etabliert. Im Folgenden ist das erste Protokoll dargestellt, von dem die Optimierungsarbeit ausgegangen ist. Die genaueren Ergebnisse der Etablierungsarbeit und die entsprechenden Protokolländerungen sind in Kapitel 3.1 beschrieben.

Zunächst wurde der Proteinzellextrakt wie unter 2.2.3.1 beschrieben vorbereitet und auf Eis gelagert. Sowohl vom Zellextrakt der transfizierten als auch der untransfizierten Zellen wurden gleiche Proteinmengen für die TAP eingesetzt (für Proteinkonzentrationsbestimmung siehe 2.2.3.2). 50 μl IqG-Sepharose Suspension wurden auf C10/10-Säulen (Pharmacia, Freiburg) im Lysispuffer (ohne Protease-Inhibitoren) gewaschen und äguilibriert. Unter einer Flussrate von 1 ml/min wurde der Zellextrakt für 1 h rezirkulierend über die IgG-Säule gegeben. Nachdem der Durchlauf der Säule aufgefangen wurde, wurde die Säule zunächst mit 2 ml Lysispuffer und anschließend mit 2 ml TEV-Puffer gewaschen und so für die TEV-Behandlung äquilibriert. Gebundene Proteine wurden mit 1 ml TEV-Puffer eluiert, der 10 µl TEV-Protease enthielten (100 U). Dazu wurde die IgG-Sepharose mit dem TEV-Puffer vermischt und 1 h ohne Zirkulieren inkubiert. Anschließend wurde das Eluat gesammelt und die Säule mit weiteren 2 ml TEV-Puffer gewaschen. Schließlich wurde die IgG-Sepharose in 2 ml TBS aufgenommen.

Für die zweite Affinitätsreinigung wurden 50  $\mu$ l M2-Anti-Flag-Agarose-suspension auf der Säule mit TBS gewaschen und äquilibriert. Die Eluate der ersten Aufreinigung wurden 1 h lang durch die Anti-Flag-Säule bei einer Flussrate von 1 ml/min zirkuliert. Danach wurde die Durchlauffraktion aufgefangen und die Anti-Flag-Agarose mit 2 ml TBS gewaschen. Anschließend wurde die Anti-Flag-Agarose in 2 ml TBS resuspendiert und in ein Eppendorf-gefäß für die Elution

überführt. Diese erfolgte durch die Inkubation des Agarose-Pellets (Zentrifugation bei 13000 rpm für 1min) mit 1 ml der 3x Flagpeptidlösung (Konzentration zwischen  $100-1000~\mu g/ml$ ) für 5 min unter leichtem Schütteln. Schließlich wurden die Beads in 1 ml TBS resuspendiert.

Sämtliche Extrakt-, Durchlauf-, Wasch-, Elutions- und Beadfraktionen beider Aufreinigungen wurden gesammelt. 50-100 µg Gesamtprotein wurden von der Zellextraktfraktion auf das SDS-Gel aufgetragen und über einen Immunnachweis des gereinigten bzw. getaggten Protein analysiert (siehe 2.2.3.3 und 2.2.3.4). Weitere Fraktionen wurden äquivolumetrisch aufgetragen, um die Aufreinigungsqualität und eventuellen Proteinverlust erfassen zu können.

#### 2.2.3.9 Gelfiltration

Die Gelfiltrationschromatographie – auch Ausschlusschromatographie genannt – wurde für die Auftrennung von Proteinkomplexen unterschiedlicher Größen unter nativen Bedingungen benutzt. Sowohl Proteinextrakte als auch TAP-Eluate wurden somit in Fraktionen mit hoch- bzw. niedermolekularen Proteinkomplexen aufgetrennt. Mittels der ÄKTAexplorer Chromatographie-Anlage wurde die Auftrennung an der Superdex-200 10/30-Gelfiltrationssäule durchgeführt. Für die mobile Phase wurde der Lysispuffer ohne Protease-Inhibitoren eingesetzt (siehe 2.1.5). Unter einem konstanten Fluss von 0,5 ml/min wurden 1 ml-Fraktionen gesammelt. Dabei durfte der Druck auf der Gelfiltrationssäule 1,5 MPa nicht überschreiten. Zur Kalibrierung der Gelfiltrationssäule wurde der *High molecular weight gel filtration calibration Kit* herangezogen. Dieser enthielt die sechs Kalibranten BlueDextran2000 (2000 kDa), Thyroglobulin (669 kDa), Ferritin (440 kDa), Catalase (232 kDa), Aldolase (158 kDa), und Rinderserumalbumin (67 kDa). Gelagert wurde die Säule in 20%igem Ethanol.

#### 2.2.3.10 Koimmunpräzipitation

Zur Vorbereitung der Beads wurden 50  $\mu$ L Protein A/G Sepharose in 1 ml Lysispuffer gewaschen und 1 min bei 1000 rpm abzentrifugiert. Nach Entfernung des Lysispuffers wurde die gewaschene Sephrose mit 1-2  $\mu$ g Antikörper (Maus für G-, Kaninchen für A-Sepharose) 1 h bei 4°C gekoppelt (Gesamtvolumen < 100  $\mu$ l). Die Proteinextrakte wurden entweder mit der Antikörper-gekoppelten-ProteinA/G-Sepharose oder mit 30  $\mu$ l anti-Flag-Sepharose über Nacht bei 4°C invertiert. Anschließend wurde der Überstand entnommen und die Sepharose

dreimal in 1 ml PBS gewaschen und jeweils 5min bei RT invertiert. Schließlich wurden die Sedimente in einem kleinen Volumen PBS aufgenommen und mit Lämmli-Puffer zur Vorbereitung für eine SDS-PAGE-Auftrennung versetzt.

#### 2.2.3.11 Tubulin-Sedimentation

Zur Sedimentation von Tubulin und tubulinassoziierten Proteinen wurde das Protokoll von Sahyoun et al. verwendet (1982). Eine zytoplasmatische Proteinextraktion wurde zunächst durch die Inkubation eines Zellmonolayers in einem Digitonin-EDTA-Extraktionspuffer durchgeführt. Dazu wurden 3 ml Extraktionspuffer für eine 10 cm-Zellkulturschale aufgetragen und nach einer 10minütigen Inkubation (auf Eis unter leichtem Schütteln) dekantiert. Die sich in zytoplasmatischen Fraktion befindenden Tubulinfragmente anschließend samt ihrer assoziierten Proteine durch die Zugabe von 0,1 M MgCl<sub>2</sub> (Endkonzentration: 35 mM) unter 20-minütigem Rotieren bei Raumtemperatur sedimentiert und 8 min bei 14.000 rpm abzentrifugiert. Das weiße Pellet wurde mit 3 ml Imidazolpuffer (siehe 2.1.5) gewaschen. Das dadurch entstandene durchsichtige Pellet wurde schließlich in 3 mL Zytoskelett-Puffer resuspendiert und für die SDS-PAGE entsprechend vorbereitet.

#### 2.2.3.12 Immunzytochemische Färbung

Durch immunzytochemische Untersuchungen wurde die subzelluläre Lokalisation von Antigenen in kultivierten Zellen durch Antikörper ermöglicht. Die zu färbenden Zellen wurden auf Fibronectin-beschichteten ChamberSlide-Objektträger (Nunc, Langenselbold) über Nacht kultiviert. Nach ihrer Adhäsion wurden die Zellen mit PBS gewaschen und im Zamboni-Fixativ (4% Paraformaldehyd, 15% Pikrinsäure, 0,1 M Natriumphosphatpuffer, pH 7,4) fixiert. Nach einer 5-minütigen Permeabilisierung mit 0,1% Saponin/PBS wurden unspezifische Bindungsstellen 15 min mit 10% (v/v) NGS (VectorLabs, Eching) in 0,1% Saponin/PBS-Lösung blockiert. Sowohl der primäre als auch der sekundäre Antikörper wurden in einer 1:200 Verdünnung in 2% (v/v) NGS in 0,1% Saponin/ PBS-Lösung 1 h bei RT inkubiert. Nach jedem Antikörper-inkubationsschritt wurden die Zellen dreimal für 5 min in 0,1% Saponin/PBS gewaschen. Nach dem letzten Waschschritt wurde die feuchte Kammer abgenommen und die Zellen im DAPI-enthaltenden Einbettmedium (SlowFade Gold antifade reagent with DAPI,

Invitrogen) eingebettet. Nachdem das Einbettmedium hart geworden war, wurden die Zellen am Fluoreszenz-mikroskop fotographiert.

#### 2.2.3.13 Wundheilungsassay von HUVEC-Primärkulturen

Mit Hilfe von  $\mu$ -Dish $^{35\text{mm,high}}$  Culture-Inserts (Ibidi, Martinsried) konnte die Zellmigration erfasst werden. Auf einer Petri-Schale (Durchmesser: 35 mm, Höhe: 12 mm) befanden sich durch einen Kunsstoff-Aufsatz erzeugte Kammern. Diese wurden mit jeweils 50.000 HUVEC Zellen nach der ersten Passage besiedelt, und die Zellen bis zur Konfluenz kultiviert. Nach der Entfernung der Kunststoff-Trennwand wurde die entstandene "Wunde" 10 h lang stündlich fotographiert. Die Bilder wurden mit Hilfe der ImageJ-Software ausgewertet, indem die Laufstrecke der Zellen in die Wunde in Abhängigkeit von der Zeit dargestellt wurde.

## 2.2.3.14 Tube formation-Fibrinassay von HUVEC-Primärkulturen

Zur quantitiven Analyse des angiogenetischen Verhaltens von HUVEC-Zellen wurde das Fibringel-basierte tube formation Protokoll von Nehls und Drenckhahn (1995) und nach Angaben von E. Lammert (persönliche Mit-teilung) verwendet Die HUVEC-Zellen wurden über Nacht im Endothel-zellmedium EGM-2 inkubiert. 2500 Cytodex-3-Microcarrier wurden in 1,5 ml EGM-2-Medium mit 1x10<sup>6</sup> HUVEC-Zellen gemischt und 4 Stunden bei 37°C in einem Eppendorfgefäß inkubiert. Alle 20 min wurde die Microcarrier/ Zellmischung vorsichtig geschüttelt, um eine homogene Verteilung der Zellen auf der *Microcarrier*-Oberfläche zu gewährleisten. Die besiedelten Microcarrier wurden über Nacht in 5 ml EGM-2-Medium in einer T25-Flasche kultiviert, um die Oberfläche dicht bewachsen zu lassen. Gleichzeitig wurden MEF-Zellen im EGM-2-Medium über Nacht kultiviert.

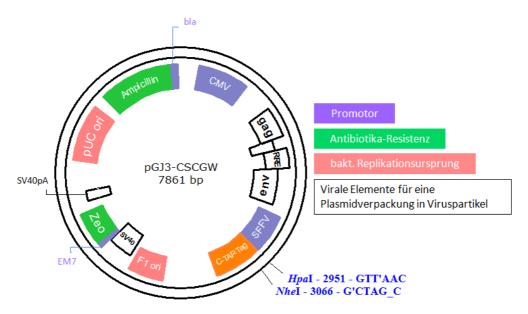
Am darauffolgenden Tag wurde eine 2,5 mg/mL Fibrinogen-Lösung mit 0,15 Units/ ml Aprotinin versetzt. Die bewachsenen *Microcarrier* wurden dreimal in 1 ml EGM-2-Medium gewaschen und schließlich in der Fibrinogen-Aprotinin-Lösung in einer Konzentration von ca. 500 *Microcarrier*/ml aufgenommen. 0,3 Units Thrombin wurden in die Vertiefungen einer 24-Well-Platte vorgelegt und mit jeweils 500 µl der *Microcarrier*/Fibrinogen-Suspension vorsichtig ver-mischt. Innerhalb von 15 min bildeten sich feste Fibringele, die mit 1 ml EGM-2-Medium und 20.000 Fibroblasten/ml überschichtet wurden.

#### 2 Material und Methoden

Am nächsten Tag wurden pro Ansatz 25 *Microcarrier* ausgewählt, die im Laufe von 10 Tagen beobachtet und fotographiert wurden. Dabei wurde das Medium jeden zweiten Tag gewechselt. An Tag 10 wurden die *Microcarrier* in Bezug auf die Anzahl, Länge und Verzweigungsereignisse der entstandenen Gefäße/Sprosse (*tubes/sprouts*) mit der ImageJ-Software ausgewertet.

# 3.1 Etablierung der TAP-Technologie

Die heterologe Expression des getaggten CARP-Proteins in Säugerzellen zur darauffolgenden Proteininteraktionsanalyse basierte auf dem Expressions-vektor pGJ3-CSCGW (Abbildung 3-1), der den Original*tag* nach Séraphin (Puig, et al. 2001) enthält. Dieser besteht aus dem Calmodulin bindenden Peptid, der TEV-Proteaseschnittstelle und der IgG-bindenden ZZ-Domäne des Protein A von *Staphylococcus aureus* (CBP-TEV-ZZ).



**Abbildung 3–6 Plasmidkarte des Ausgangsplasmids pGJ3-CSCGW.** Dargestellt sind Promotor-, Antibiotikaresistenz-, bakterielle Replikations- und virale Elemente des Plasmids. Der Original*tag* befindet sich *downstream* des SFFV-Promotors. Hervorgehoben sind die Restiktionsschnittstellen HpaI und NheI (Enzymname – Schnittstelle – Consensus-Sequenz), die für das weitere Klonierungsvorgehen von Bedeutung sind.

# 3.1.1 Klonierung von pGJ3-C-Flag³ (Tag: 3xFlag-TEV-ZZ)

Der Originaltag nach Séraphin (CBP-TEV-ZZ) konnte für die vorliegende Studie nicht übernommen werden, weil CBP ein Calcium-abhängiges Verfahren voraussetzt. Da das Zielprotein, CARP, primär ein kardiales Protein ist, könnte die Bindung zu seinen Bindungspartnern eventuell Calcium-abhängig sein und wäre durch die CBP-Aufreinigung gestört. Außerdem besitzen viele Proteine aus

-

<sup>&</sup>lt;sup>3</sup> Die Namenszusätze für die *Tag*-Konstrukte beziehen sich auf die Plasmid- und *Tag*namen, wie sie Tabelle 2-5 zu entnehmen sind.

dem Säugerzellproteom eine hohe Affinität zu Calmodulin (Kneusel, et al. 2003). Diese könnten dann zu falsch positiven Interaktionspartnern führen, die nur aufgrund des *Tag*s mit CARP interagieren. Deswegen wurde zunächst die CBP-Domäne gegen einen *Triple-*Flag (3xFlag)-*Tag* ausgetauscht. Dies erfolgte im Expressionsvektor pGJ3-CSCGW (Abbildung 3-1) über die Restriktionsschnittstellen HpaI und NheI. Anschließend wurde die CARP-cDNA über HpaI inseriert (Abbildung 3-2). Als Kontrolle für die spätere Interaktionsanalyse wurde das CARP-Homolog DARP ebenfalls mit dem gleichen *Tag* versehen.

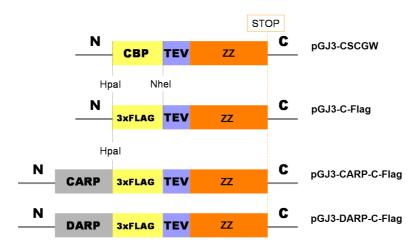
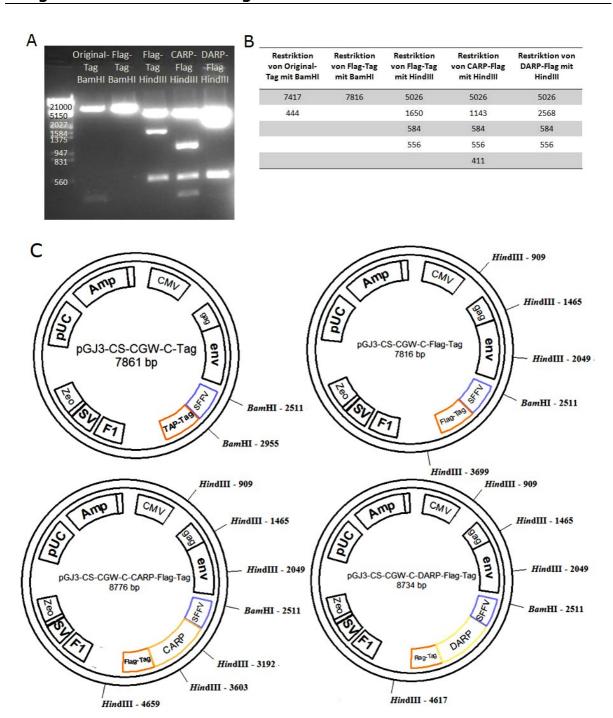


Abbildung 3-7 Klonierungsstrategie zur Substitution der CBP-Domäne durch einen 3xFlag-*Tag.* 

Bei allen Klonierungen wurde das neu klonierte Plasmid über geeignete diagnostische Restriktionsreaktion auf die Insertion und die richtige Orientierung der neu eingeführten Sequenz überprüft (Abbildung 3-3).

Weiterhin wurde die Richtigkeit der inserierten DNA-Sequenz durch DNA-Sequenzierungen mittels geeigneter Insert-flankierender Primer überprüft.



**Abbildung 3–8 Restriktionsanalyse der klonierten Plasmide pGJ3-C-Flag, pGJ3-CARP-C-Flag und pGJ3-DARP-C-Flag. A:** Links ist der Größenstandard λ-EcoRI/ HindIII aufgetragen. **B:** Tabellarisch dargestellt sind die theoretisch erwarteten Fragmentgrößen in Basenpaaren (bp) nach der Restriktionsreaktion. **C:** Plasmidkarten der analysierten Plasmide. Hervorgehoben sind die verwendeten Restriktionsenzyme und ihre Schnittstelle(n) im Plasmid. **Amp:** Ampicillin-Resistenz, **CMV:** Cytomegalovirus-Promotor, **Zeo:** Zeocin-Resistenz, **pUC:** pUC Replikationsursprung, **F1:** F1 Repli-kationsursprung, **SV:** SV40 Enhancer, **gag/env:** Elemente zur Plasmidverpackung in viralen Partikeln.

### 3.1.2 Heterologe Expression von CARP/DARP-C-Flag

Die mit pGJ3-CARP-C-Flag sowie pGJ3-DARP-C-Flag transient transfizierten HEK293T-Zellen zeigten eine erfolgreiche Expression der getaggten Proteine. Das überexprimierte Protein zeigte zusätzlich ein um 10 bzw. 20 kDa kleineres Abbauprodukt im Western-Blot (Abbildung 3-4).

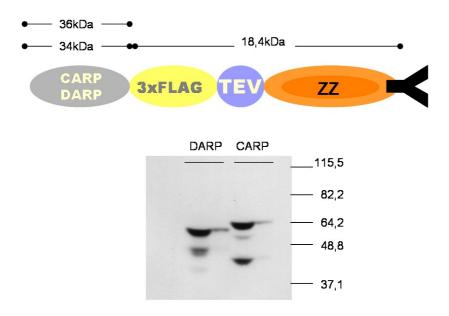


Abbildung 3–9 Schematische Darstellung des rekombinanten CARP- bzw. DARP-Proteins und genaue Zusammensetzung des modifizierten TAP-*Tags* (oben). Western-Blot Analyse der transient in HEK293T-Zellen exprimierten getaggten Proteine (unten) Molekulargrößen der Proteindomänen und des Längenmarkers sind in kDa wiedergegeben. Die Detektion der Proteine erfolgte über die Immunreaktion mit der Protein A-ZZ-Domäne mittels eines HRP-anti-mouse-Antikörpers (Verdünnung: 1:10000); Protokoll nach Weser, et al. (2006).

# 3.1.3 Komplexanalyse von CARP/DARP-C-Flag

Um zu überprüfen, ob CARP-C-Flag in HEK293T-Zellen Proteinkomplexe ausbildet, wurde eine Fraktionierung des Zelllysats mittels Gelfiltrationschromatographie durchgeführt.

In Abbildung 3-5 ist die Eichung der Gelfiltrationssäule Superdex200 gezeigt. Sechs Größenstandards mit einem Molekulargewicht von 67-2000 kDa wurden in unterschiedlichen Kombinationen auf die Säule gegeben und ihre Elution mittels UV-Detektion registriert (Abbildung 3-5). Die gemessenen Elutionsvolumina, in denen die einzelnen Standards von der Säule eluierten, wurden gegen das Molekulargewicht aufgetragen (Abbildung 3-6).

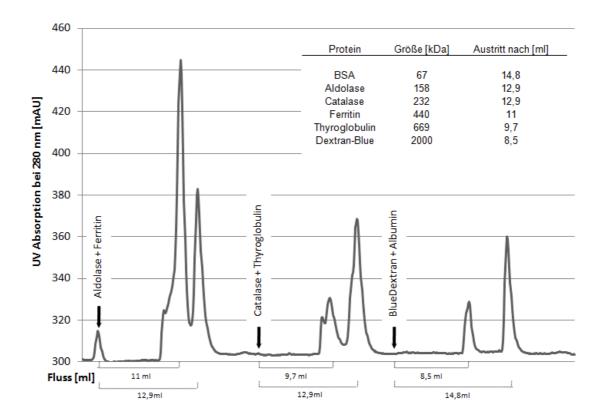
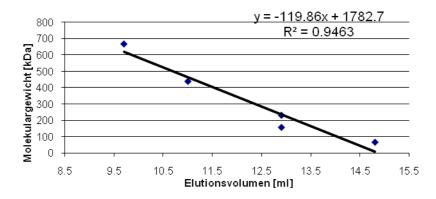


Abbildung 3–10 UV-Diagramm von den Eichläufen der Gelfiltrationssäule. Die Pfeile stellen den Injektionszeitpunkt der jeweiligen Kalibrantenmischung dar. Die Kalibranten eluierten von der Säule und zeigten dabei ein erhöhtes UV-Signal nach einem entsprechenden Laufvolumen. Molekulargrößen und Austrittvolumina sind oben links aufgeführt. Das Signal bei der ersten Injektion (Aldolase und Ferritin) ist eine Verunreinigung des Systems und beeinflusst die Eichung nicht.

Die Eichgerade (Abbildung 3-6) zeigte einen guten Korrelationskoeffizienten von 0,9463. Für die Bestimmung des Ausschlussvolumens wurde Blue-Dextran2000 verwendet, das keinerlei Diffusion durch das Säulenmaterial aufweist. Als kleinstes Protein wurde Rinderserumalbumin (BSA) gewählt. Somit wurde die Säule zwischen 67 kDa und 2000 kDa geeicht.



**Abbildung 3–11 Eichgerade der Gelfitrationssäule.** Aufgetragen sind die Molekulargewichte der Kalibranten gegen ihre Austrittvolumina von der Säule.

CARP-C-Flag wurde in den Fraktionen 10 bis 16 (≜ 10-16 ml) detektiert. Dabei zeigte die CARP-Verteilung ein Maximum in der Fraktion 11 (ca. 440kDa, enthält CARP-Komplexe) und ein weiteres in der Fraktion 15 (60kDa, enthält CARP-Monomere). Dies deutet darauf hin, dass das rekombinante CARP sowohl mit Proteinen interagiert als auch monomer vorkommt. Ähnlich verhielt sich DARP, wobei DARP fast ausschließlich in hochmolekularen Komplexen lag (Maximum bei Fraktion 10) (Abbildung 3-7).

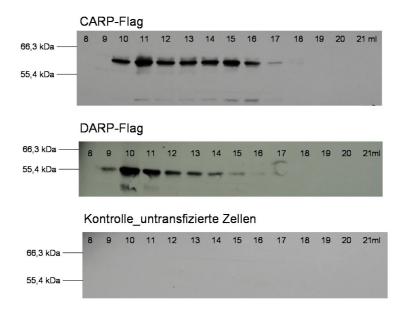


Abbildung 3–12 Gelfiltrationsanalyse der Zellextrakte von CARP- und DARP-C-Flag transfizierten sowie untrasfizierten HEK293T-Zellen. Aufgetragen sind die Konzentrate der einzelnen 1 mL-Fraktionen zwischen Fraktion 8 und 21; Antikörper: HRP-anti-mouse-Antikörper (Verdünnung 1:10000).

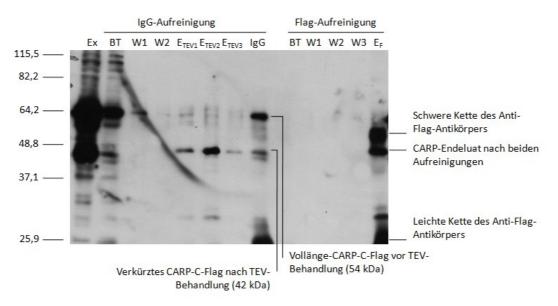
# 3.1.4 Ergebnisse der TAP von CARP-C-Flag

Nachdem eine Komplexbildung von CARP in HEK293T-Zellen nachgewiesen war, wurde ein erster Versuch unternommen, die Proteinkomplexe mittels Tandem-Affinitätsreinigung zu isolieren. Die Reinigung erfolgte nach dem TAP-Protokoll (2.2.3.8). Abbildung 3-8 zeigt die Western-Blot-Analyse der TAP. Aufgetragen wurden neben dem Zellextrakt die Durchlauf-, Wasch-, Elutions- und Affinitätssäulefraktionen der beiden Affinitätsreinigungen. Von allen Fraktionen wurde der gleiche Anteil des Gesamtprobenvolumens (50  $\mu$ l von 1 ml  $\pm$  1/20) aufgetragen, um Aussagen über den Proteinverlust und die Aufreinigungsqualität treffen zu können. So zeigte die TAP, dass die Bindung an die IgG-Säule unvollständig war. Ein großer Anteil von CARP-C-Flag hatte an die Säule nicht

gebunden (siehe Durchlauf (BT)-Spur). In dem ersten Waschschritt der IgG-Säule (W1) ging ein geringer Anteil von CARP-C-Flag verloren. Obwohl die TEV-Spaltung durchaus erfolgreich verlief (siehe Elutionen  $E_{\text{TEV}}1-3$ ), blieb ein Teil von CARP auf der IgG-Sepharose und konnte nicht eluiert werden (siehe IgG-Spur).

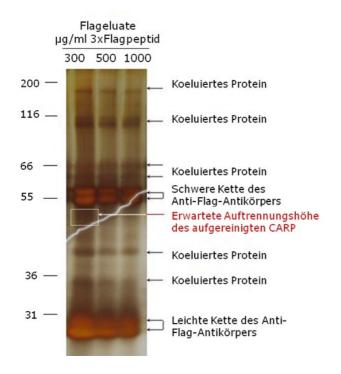
Die Bindung des TEV-Eluats an die anti-Flag Säule verlief vollständig, und das gebundene Protein wurde durch Aufkochen der Anti-Flag-Sepharose freigesetzt. Dies führte allerdings zu einer hohen Kontamination durch die Antikörperketten (siehe Hintergrund der schweren Kette bei ca. 60 kDa und der leichten Kette bei ca. 25 kDa im Flageluat). Abgesehen von der Kontamination durch die Antikörperketten, hatte die Elution durch das Aufkochen der IgG-Sepharose einen weiteren Nachteil. Proteine, die unspezifisch an die IgG-Säule gebunden haben, wurden miteluiert und erhöhten damit den Anteil an falsch positiven Interaktionspartnern.

In weiteren Optimierungsversuchen führte die alternative Elution mittels eines kompetierenden 3xFlag-Peptid ( $300~\mu g/ml$ ) zwar zur Verminderung der miteluierten falsch positiven Bindungsproteine, jedoch die anti-Flag-IgGs des Säulenmaterials traten weiterhin in den Flageluaten auf. Dies zeigte eine Silberfärbung der TAP-Endeluate, in denen sehr intensive Banden der leichten und schweren IgG-Kette auftraten (Abbildung 3-9).



**Abbildung 3–13 Ergebnis der TAP von CARP-C-Flag.** Ex, Zellextrakt; BT, Durchlauf der Aufreinigungssäule; W, Waschfraktionen;  $E_{TEV}$ , TEV-Eluat; IgG, IgG-Sepharose;  $E_F$ , Flageluat. **1. Antikörper:** mouse-anti-Flag (Verdünnung 1:7500); **2. Antikörper:** HRP-anti-mouse (Verdünnung 1:10000); Molekulargewicht des Größenmarkers in kDa.

Abbildung 3-14 Silberfärbung der

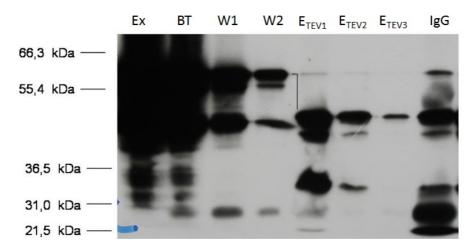


**Peptidelutionsproben der Flag-Aufreinigung.** Zu sehen ist der hohe Hintergrund durch die IgGs des Säulenmaterials (siehe die Banden der schweren Kette bei 55 kDa und der leichten Kette bei 30 kDa). Dieser Hintergrund war unabhängig von der eingesetzten 3xFlagpeptidkonzentration (300-1000 μg/ml).

Die großen Mengen des kontaminierenden miteluierten Antikörpers übertraf die wichtigeren Banden von CARP-C-Flag (weißer Pfeil) und seinen miteluierten Komplex-proteinen (siehe schwarze Pfeile).

Molekulargewicht des Größen-markers ist in kDa angegeben.

Die Wiederholungen dieser Aufreinigung zeigten erneut eine unbefriedigende Bindung an die IgG-Säule und eine unvollständige TEV-Elution. Ein Optimierungsversuch, die TEV-Inkubation über Nacht bei 4°C durchzuführen, zeigte keine Verbesserung der Aufreinigungsqualität. Eine deutlich große Menge an CARP-C-Flag ging im Durchbruch der ersten Affinitätssäule verloren (siehe BT-Spur in Abbildung 3-10), und vom gebundenen CARP-C-Flag blieb desweiteren ein großer Anteil an der IgG-Säule (siehe IgG-Spur).



**Abbildung 3–15 Optimierung der IgG-Aufreinigung durch eine 16h-langen TEV-Behandlung:** Ex, Zellextrakt, BT, Durchlauf der IgG-Säule, W, Waschfraktion,  $E_{TEV}$ , TEV-Eluate, IgG, IgG-Sepharose; **1. Antikörper:** mouse-anti-Flag (Verdünnung 1:7500); **2. Antikörper:** HRP-anti-mouse (Verdünnung 1:10000).

Ein Grund für die variable Aufreinigungsqualität wurde darin vermutet, dass die CARP-Bindungspartner den *Tag* verdecken und die Bindung verhindern. Dadurch schwankt die Aufreinigungsqualität mit der Zusammensetzung und der Größe der jeweiligen Proteinkomplexe. Dies würde auch bedeuten, dass der Proteinanteil, der im Durchlauf verloren geht, nicht wegen der Sättigung der Säule sondern aufgrund der mangelnden *Tag*-Exposition nicht binden kann. Dies bestätigte ein weiterer Versuch, in dem die erneute Bindung des Durchlaufs an frische IgG-Sepharose (Abbildung 3-11) durchgeführt wurde. Die sich im ersten Durchbruch befindenden CARP-Komplexe hatten keine Affinität zu der IgG-Säule und zeigten bei erneuter Bindung an frische Sepharose keine Affinität zu der IgG-Säule. Während der zweite Durchbruch (BT²) ein starkes CARP-Signal zeigte, blieb an der IgG-Säule (IgG) ein minimaler Anteil von CARP-C-Flag gebunden.

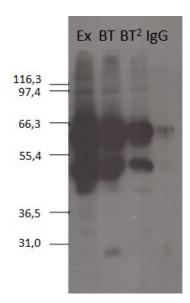


Abbildung 3–16 Durchführung der IgG-Aufreinigung mit erneutem Binden des Durchlaufs an der IgG-Säule. Ex, Zellextrakt, BT, Durchlauf der IgG-Säule, BT<sup>2</sup>, Durchbruch beim Auftragen des ersten Durchbruchs auf eine neue IgG-Säule; 1. Antikörper: mouse-anti-Flag (Verdünnung 1:7500); 2. Antikörper: HRP-anti-mouse (Verdün-nung 1:10000); Molekulargewicht des Größen-markers in kDa.

Die CARP-Bande ist die obere der beiden hier zu sehenden Banden. Bei der unteren Bande handelt es sich um ein Abbauprodukt von CARP-C-Flag, das aufgrund der hohen Überepxression eine hohe Degra-dationsrate zeigte.

# **3.1.5 Klonierung von pGJ3-C-FlexTag (***Tag:* linker-3xFlag-TEV-ZZ**)**

Um den *Tag* für die Bindung an die IgG-Säule besser zu exponieren, bestand die nächste Optimierungsstrategie darin, einen *Linker* bzw. *Spacer* zwischen das Protein und den *Tag* zu setzen. Bestehend hauptsächlich aus Glycinen (freie Drehbarkeit, ohne sperrige Seitenketten) besitzt der *Linker* (RGGGGSGGGSVE) eine hohe Flexibilität, und der *Tag* sollte stets für die Bindung exponiert bleiben (Fischer, et al. 1997). Ausgehend von dem pGJ3-C-Flag-Plasmid wurde sowohl

die Oligonukleotidsequenz des flexiblen *Linkers* als auch im weiteren Schritt die CARP-cDNA über die HpaI Restriktionsschnittstelle eingebaut (Abbildung 3-12).

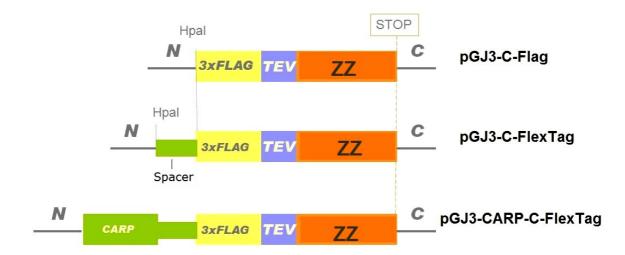


Abbildung 3–17 Umklonierungsstrategie zur Einführung von einem flexiblen Linker zwischen der CARP-Sequenz und dem TAP-Tag.

Wiederum wurden die umklonierten Plasmide durch eine diagnostische Restriktionsreaktion mittels SbfI und BamHI auf die Richtigkeit ihrer Sequenz und ihrer Orientierung überprüft (Abbildung 3-13).

Weiterhin wurde die Richtigkeit der inserierten DNA-Sequenz durch DNA-Sequenzierungen mittels geeigneter Insert-flankierender Primer überprüft.

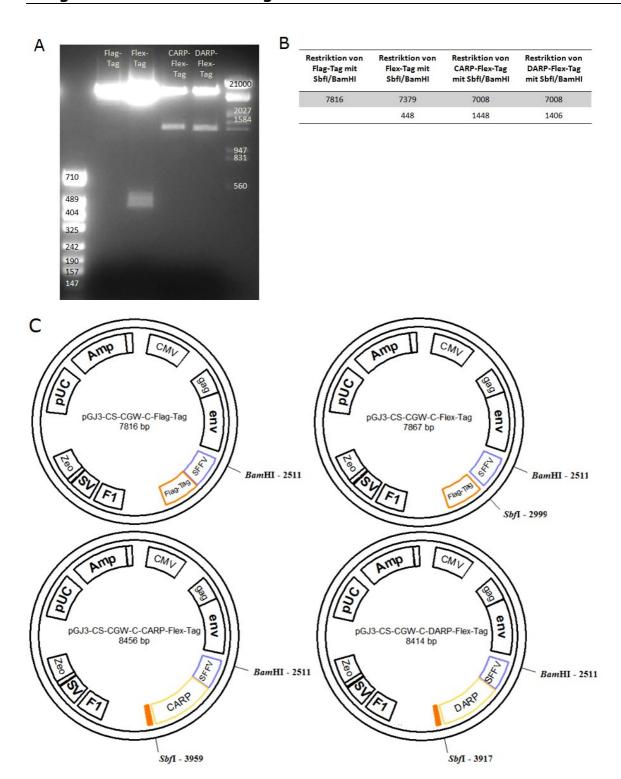


Abbildung 3–18 Restriktionsanalyse der umklonierten Plasmide pGJ3-C-Flex-Tag, pGJ3-CARP-C-Flex-Tag und pGJ3-DARP-C-Flex-Tag. A: Rechts ist der Größenstandard  $\lambda$ -EcoRI/ HindIII, links der Größenstandard  $\lambda$ -HpaII aufgetragen. B: Tabellarisch dargestellt sind die theoretisch erwarteten Fragmentgrößen in Basenpaaren (bp) nach der Restriktionsreaktion. C: Plasmidkarten der analysierten Plasmide. Hervorgehoben sind die verwendeten Restriktionsenzyme und ihre Schnittstelle im Plasmid. Amp: Ampicillin-Resistenz, CMV: Cytomegalovirus-Promotor, Zeo: Zeocin-Resistenz, pUC: pUC Replikationsursprung, F1: F1 Replikationsursprung, SV: SV40 Enhancer, gag/env: Elemente zur Plasmidverpackung in viralen Partikeln.

### 3.1.6 Ergebnisse der TAP von CARP-C-FlexTag

Um die Qualität der Komplexaufreinigung des neuen Konstrukts zu beurteilen, wurde die Gelfiltration erneut herangezogen. Dazu wurde ein Proteinextrakt transifizierter Zellen über eine IgG-Affinitätssäule gegeben. Anschließend wurden sowohl der Gesamtextrakt als auch der IgG-Durchbruch mittels Gelfiltration auf die Komplexbildung analysiert. Diese zeigte, dass trotz der Einführung des flexiblen *Linker*s die CARP-Komplexe nicht an die Säule binden können. Abbildung 3-14 zeigt, dass CARP-C-FlexTag im Zelllysat wiederum sowohl in Fraktionen großer als auch niedriger Molekulargrößen vorkam (Zelllysat). Nach der Bindung an die IgG-Säule war CARP-C-FlexTag im Durchbruch der Säule in den Fraktionen 9-13 (>200 kDa) nachweisbar. Demzufolge haben nur die Fraktionen 14-18 (50-200 kDa) an die Säule gebunden, was der Größe des monomeren bzw. wenig komplexen CARP-C-FlexTag entsprechen würde. Der größte Anteil an CARP-C-FlexTag, der in den hochmolekularen Fraktionen 9-14 vorkam, zeigte aber keine Affinität zur IgG-Säule und ging im Laufe der Aufreinigung verloren.

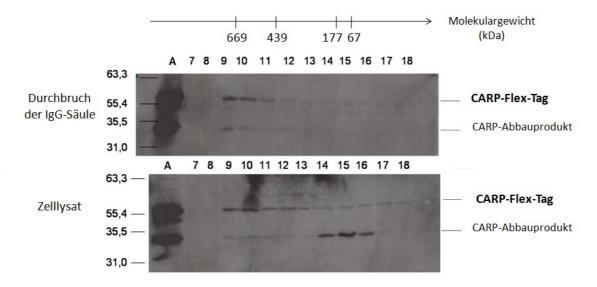


Abbildung 3–19 Gelfiltrationsanalyse des Zelllysats sowie des IgG-Durchlaufs von CARP-C-FlexTag. Aufgetragen sind die 1 ml-Fraktionen von 7-18; *A,* Ausgangsprobe; **1.Antikörper:** mouse-anti-Flag (Verdünnung 1:7500); **2.Antikörper:** HRP-antimouse (Verdünnung 1:10000); Molekulargewicht des Größenmarkers in kDa.

Die Tatsache, dass trotz des flexiblen *Linker*s die großen CARP-Proteinkomplexe verloren gehen, deutet eher darauf hin, dass die mangelhafte Exposition des *Tags* weniger an den CARP-Bindungspartnern lag, sondern vielmehr durch *Tag*eigene Komplexe verursacht wurde. Die im Vergleich zum Flag-*Tag* große ZZ-

Domäne des Protein A (12kDa) könnte ihre eigenen Komplexe bilden und so die Affinität zur IgG-Säule verlieren.

Für das CARP-FlexTag ließ sich aus den bisherigen Experimenten zusammenfassen, dass für eine quantitative TAP-Aufreinigung von CARP-Proteinkomplexen aus Säugerzellen die ZZ-Domäne des Protein A als *Tag* ungeeignet zu sein scheint, da sie eigene Proteinkomplexe ausbildet, die die Bindung des getaggten CARP an die IgG-Säule verhindern.

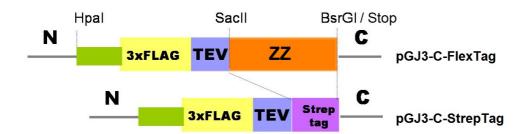
Auch die Flag-Aufreinigung erscheint trotz ihrer hohen Bindungseffizienz als zweiter Reinigungsschritt der TAP ebenfalls ungeeignet, da die anti-Flag-IgGs des Säulenmaterials in großen Mengen miteluierten (Abbildung 3-9). Außer-dem stellt der exzessive Überschuss des 3xFlag-Elutionspeptids (300-1000  $\mu g/ml$ ) einen großen Störfaktor für weitere MS-Analysen dar (Kneusel, et al. 2003).

# **3.1.7 Klonierung von pGJ3-C-StrepTag (***Tag:* linker-3xFlag-TEV-Strep**)**

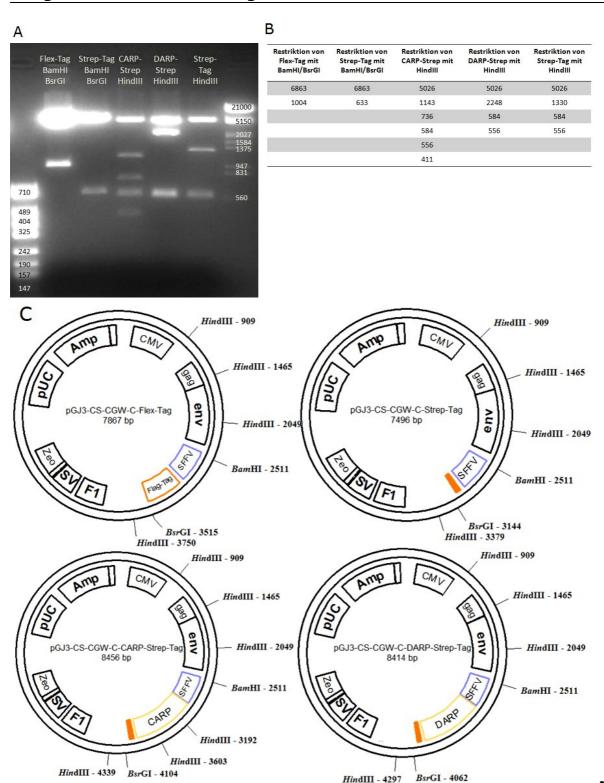
Aufbauend auf den bisherigen Erkenntnissen sollte die ZZ-Domäne des Protein A durch einen anderen *Tag* ersetzt werden, der eine reine Elution ermöglichen und als zweiter Schritt nach der Flag-Aufreinigung eingesetzt werden konnte. Als eine gute *Tag*-Alternative zur ZZ-Domäne des Protein A bot sich der Strep(II)-*Tag* an (IBA, Göttingen). Dabei handelt es sich um ein Peptid, das eine hohe Affinität zum Streptavidin-Derivat, StrepTactin, besitzt. Da StrepTactin immer noch eine hohe Affinität zu Biotin aufweist, lassen sich an StrepTactin gebundene Proteine, die den Strep(II)-*Tag* tragen, mit 2,5mM Desthiobiotin mit der Möglichkeit zur Regeneration des Säulenmaterials mit 4-Hydroxy-Azobenzene-2-Carboxylsäure eluieren (Terpe 2003). Alternativ kann die Elution mit 2,5mM Biotin durchgeführt werden. Ein weiterer Vorteil des Strep(II)-*Tag*s ist seine im Vergleich zu Protein A deutlich kleinere Struktur (8 Aminosäuren: WSHPQFEK). Dadurch wird einerseits das Risiko zur eigenen Komplexbildung reduziert. Andererseits stört das niedermolekulare Biotin die MS-Analyse nicht.

Ausgehend von dem pGJ3-C-FlexTag erfolgte die Substitution der ZZ-Domäne des Protein A durch den Strep(II)-*Tag* über die Restriktionsschnittstellen SacII und BsrGI (Abbildung 3-15). Der flexible *Linker* wurde beibehalten, um den ziemlich kleinen *Tag* (8 kDa) für die Bindung und die Elution effizient zu

exponieren. In einem weiteren Klonierungsschritt wurde sowohl die CARP- als auch DARP-cDNA in die HpaI-Restriktionsschnittstelle eingebaut. Wiederum wurden alle erzeugten Plasmide durch geeignete diagnostische Restrikitionsreaktionen auf den richtigen Einbau des StrepII-*Tag*s überprüft (Abbildung 3-16). Weiterhin wurde die Richtigkeit der inserierten DNA-Sequenz durch DNA-Sequenzierungen mittels geeigneter Insert-flankierender Primer überprüft.



**Abbildung 3–20 Umklonierung des pGJ3-C-FlexTag-Plasmids.** Die ZZ-Domäne des Protein A wurde durch ein für den StrepII-*Tag* kodierende Oligonukleotid über die Restriktionsschnittstellen SacII und BsrGI ersetzt.



bbildung 3–21 Restriktionsanalyse der Plasmide pGJ3-C-FlexTag, pGJ3-C-StrepTag, pGJ3-C-StrepTag und pGJ3-DARP-C-StrepTag. A: Rechts ist der Größenstandard  $\lambda$ -EcoRI/ HindIII, links der Größenstandard  $\lambda$ -HpaII aufgetragen. B: Tabellarisch dargestellt sind die theoretisch erwarteten Fragmentgrößen in Basenpaaren (bp) nach der Restriktionsreaktion. C: Plasmidkarten der analysierten Plasmide. Hervorgehoben sind die verwendeten Restriktionsenzyme und ihre Schnittstelle(n) im Plasmid. Amp: Ampicillin-Resistenz, CMV: Cytomegalovirus-Promotor, Zeo: Zeocin-Resistenz, pUC: pUC Replikationsursprung, F1: F1 Repli-kationsursprung, SV: SV40 Enhancer, gag/env: Elemente zur Plasmidverpackung in viralen Partikeln.

### 3.1.8 Komplexanalyse und TAP-Ergebnisse von CARP-C-Strep

In einem ersten Experiment wurde mittels Gelfiltration untersucht, ob der Ersatz der ZZ-Domäne zu einem veränderten Komplexbildungsverhalten führte. Dies war insofern wichtig, da die bisherigen Experimente darauf hindeuteten, dass die ZZ-Domäne eigene Proteinkomplexe in HEK293T-Zellen ausgebildet hat.

Abbildung 3-17 zeigt, dass CARP-C-FlexTag vor allem in Proteinkomplexen >400 kDa auftrat. Im Gegensatz dazu verteilte sich CARP-C-Strep über den gesamten Komplexgrößenbereich, wobei eine deutliche Anreicherung im mittel- (Fraktion 13, ca. 200 kDa) und niedermolekularen (Fraktion 16, ca. 50 kDa) Bereich festzustellen war.

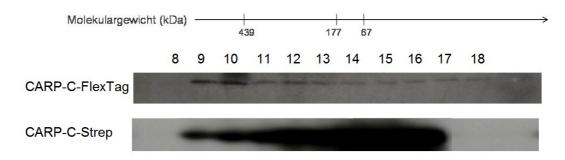


Abbildung 3–22 Gelfiltrationsanalyse der Zelllysate von CARP-C-FlexTag und CARP-C-Strep. 1. Antikörper: mouse-anti-Flag (Verdünnung 1:7500); 2. Antikörper: HRP-antimouse (Verdünnung 1:10000).

In einem weiteren Experiment wurde untersucht, ob die Proteinkomplexe von CARP-C-Strep auch nach einer Aufreinigung über die StrepTactin-Säule stabil blieben. Zu diesem Zweck wurden die CARP-Gelfiltrationsprofile des Gesamtzelllysats, des im Durchlauf der StrepTactin-Säule nicht gebundenen CARP-C-Strep und des mittels Desthiobiotin von der StrepTactin-Säule eluierten CARP-C-Strep untersucht (Abbildung 3-18).

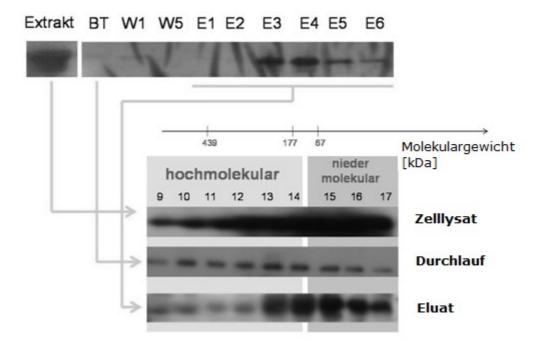


Abbildung 3–23 Aufreinigung von CARP-C-Strep über die StrepTactin-Säule (oben) und Gelfiltrationsanalyse des Zelllysats, Durchlaufs der Säule und des Endeluats (unten). *BT*, Durchbruch; *W1-5*, Wasch; *E1-6*, Elution mit 2,5 mM Desthiobiotin; 1. Antikörper: mouse-anti-Flag (Verdünnung 1:7500); 2. Antikörper: HRP-anti-mouse (Verdünnung 1:10000).

Abbildung 3-18 zeigt, dass die Aufreinigung von CARP-C-Strep über die StrepTactin-Säule mit minimalen Proteinverlusten im Durchbruch verlief. Ausgehend vom CARP-Signal im Proteinextrakt (siehe Extrakt-Spur) konnte CARP-C-Strep über 6 Elutionsschritte mittels Desthiobiotin vollständig von der Säule eluiert werden (siehe E1-E6-Spuren). Die Gelfiltrationsanalyse des Zelllysats zeigte eine Verteilung von CARP-C-Strep zwischen hoch- (>400 kDa, Fraktion 10) und niedermolekularen (<60 kDa, Fraktion 15) Fraktionen, wobei die stärkste Intensität zwischen Fraktionen 13-15 festzustellen war, die Proteinkomplexe in der Größe 50-200 kDa enthielten (Zelllysat-Profil, Abbildung 3-18 unten). Eine ähnliche Verteilung der CARP-C-Strep-Proteinkomplexe zeigte ebenfalls das Endeluat nach der StrepTactin-Aufreinigung (Eluat-Profil, Abbildung 3-18 unten). Das Gelfiltrationsprofil des Durchlaufs der StrepTactin-Säule zeigte, dass der relativ kleine Anteil der CARP-C-Strep-Komplexe, der nicht an die StrepTactin-Säule gebunden hatte, Proteinkomplexe aller Größen (Fraktion 9-17, Durchlauf-Profil, Abbildung 3-18 unten) enthielt.

In weiteren Versuchen wurde die Aufreinigung über die StrepTactin-Säule optimiert. Einerseits wurden die Aufreinigungssäulen in EconoColumns-Chromatographiesäulen (Biorad, München) selbst hergestellt und ebenso selbst

angesetzte Pufferlösungen soweit optimiert, dass auf die kommerziell erhältlichen Säulen und Puffer verzichtet werden konnte. Andererseits wurde der Elutionspuffer von Desthiobiotin auf Biotin umgestellt, da die Biotinelution eine reproduzierbare und effizientere Elution der CARP-C-Strep-Komplexe lieferte (Abbildung 3-19).

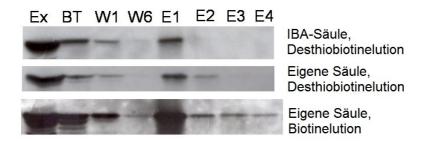


Abbildung 3–24 Optimierung der Strep-Aufreinigung am Beispiel von DARP-C-Strep und Vergleich zwischen der kommerziell erhältlichen Säule und der selbst hergestellten Säule mit unterschiedlichen Elutionspuffer. *BT*, Durchlauf; *W1-6*, Wasch; *E1-4*, Elution mittels 2,5 M Desthiobiotin bzw. Biotin; **1. Antikörper:** mouseanti-Flag (Verdünnung 1:7500); **2. Antikörper:** HRP-anti-mouse (Verdünnung 1:10000).

Nachdem die Reinigung über die StrepTactin-Säule erfolgreich etabliert worden war, wurde nun die Flag-Aufreinigung von CARP-C-Strep ausgetestet. Auffällig war die eindeutige Verbesserung der Bindung an die Anti-Flag-Säule (Abbildung 3-20). Auch das gereinigte Eluat zeigte einen hohen Anteil an hochmolekularen CARP-Komplexen (Fraktion 9-10, ca. 400kDa), jedoch ließ sich ein hoher Anteil der gebundenen Komplexe an der Anti-Flag-Säule nicht wieder gewinnen und war sogar mit der hohen Konzentration des 3xFlag-Peptids (1000 µg/mL) nicht eluierbar. Erst nach dem Kochen des Säulenmaterials in Lämmlipuffer wurde dieser Anteil freigesetzt (Abbildung 3-20).

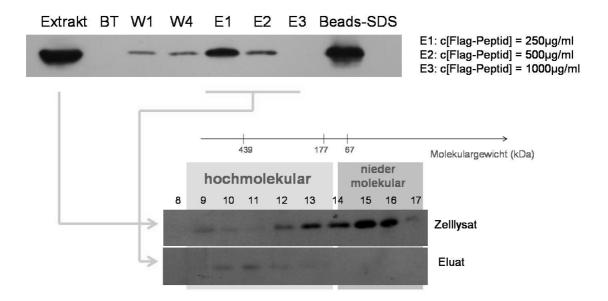


Abbildung 3–25 Optimierung der Flag-Reinigung unter Verwendung der 3xFlag-Peptidelution und Gelfiltrationsanalyse der erhaltenen Eluate. *BT*, Durchbruch; *W1-4*, Wasch; *E1-3*, Elution; *Beads-SDS*, aufgekochtes Säulenmaterial nach der Elution in SDS-haltigem Lämmlipuffer; **1. Antikörper:** mouse-anti-Flag (Verdünnung 1:7500); **2. Antikörper:** HRP-anti-mouse (Verdünnung 1:10000).

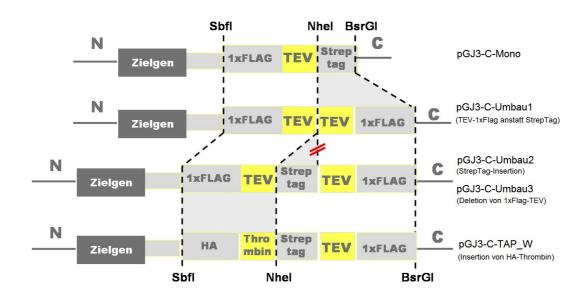
Die gleiche Affinität des *Tag*s und des kompetierenden Peptids zur Anti-Flag-Säule könnte möglicherweise der Grund für die ineffiziente Elution sein. Da in früheren Versuchen das 3xFlag-Peptid eine einfach getaggte alkalische Phosphatase (1xFlag-BAP, Kontrollprotein der Firma Sigma) quantitativ von der Anti-Flag-Säule eluierte, sollte in einem weiteren Optimierungsschritt der 3xFlag-*Tag* durch einen 1xFlag-*Tag* ersetzt werden. Da durch diese Optimierung eine weitere Modifikation des *Tag*s anstand, wurde ein massiver Umbau des bisher entwickelten 3xFlag-TEV-Strep-*Tags* durchgeführt. Die neu eingeführten Modifikationen sind im folgenden Kapitel dargestellt.

# 3.1.9 Klonierung von pGJ3-C-TAP<sub>w</sub> (Tag: linker-HA-Thrombin-Strep-TEV-1xFlag)

Die letzten Modifikationen des Tag-Konstrukts umfassten:

- 1. Ein 1xFlag-*Tag* ersetzte den 3xFlag-*Tag*, um eine bessere Elutionseffizienz mit dem 3xFlag-Peptid zu erreichen.
- Die Reihenfolge von StrepII- und 1xFlag-Tag wurde umgedreht, um eine schlechte Bindungs- und Elutionseffizienz der Flagaufreinigung aufgrund der

- internen Position des *Tag*s auszuschließen. Ein C-terminaler Flag-*Tag* sollte durch seine bessere Exposition eine bessere Elution ermöglichen.
- 3. Eine weitere Proteaseschnittstelle (Thrombin) sollte das Protein von dem kompletten *Tag* trennen und damit eine alternative Elutionsstrategie zur Strep-Aufreinigung anbieten, falls die Biotinelution aufgrund der internen *Tag*-Position beeinträchtigt werden sollte.
- 4. Ein Hämagglutinin (HA)-*Tag* wurde vor dem TAP-*Tag* hinzugefügt, um das Protein noch detektieren zu können, falls die Thrombinprotease für die Elution der StrepTactin-Säule eingesetzt werden musste. Die 9-Aminosäurenlange Sequenz aus dem Hämagglutinin-Protein (YPYDVP DYA) hat sich bereits in einer Vielzahl von Anwendungen als *Tag* bewährt (Anderson, et al. 1998).



**Abbildung 3–26 Klonierungsstrategie über drei Umklonierungsschritte zur Herstellung von pGJ3-C-TAP**<sub>w</sub> bestehend aus einem HA-, StrepII- und MonoFlag-*Tag*, einer Thrombin- und einer TEV-Proteaseschnittstelle und einem flexiblen *Linker* zwischen dem *Tag* und dem Zielgen. Durch die Insertion des StrepTags wurde die NheI-Schnittstelle vor den Tag gesetzt, um die nachfolgenden Klonierungen zu ermöglichen.

Die Umklonierung erfolgte über drei Klonierungsschritte unter Verwendung der Restriktionsschnittstellen SbfI, NheI und BsrGI (Abbildung 3-21). Wiederum wurden die neu klonierten Elemente auf ihre korrekte Sequenz und Orientierung durch Restriktionsanalyse und mittels Sequenzierung überprüft (Abbildung 3-22).

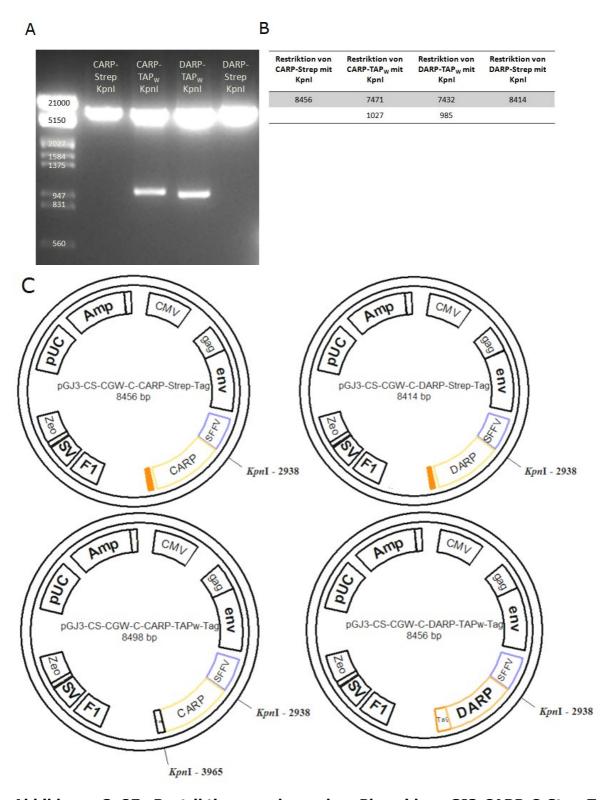
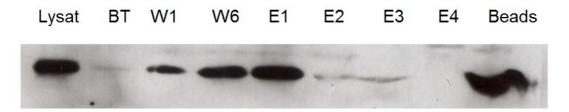


Abbildung 3–27 Restriktions-analyse der Plasmide pGJ3-CARP-C-StrepTag, pGJ3-DARP-C-Strep Tag, pGJ3-CARP-C-TAPw, pGJ3-DARP-C-TAPw. A: Links ist der Größenstandard  $\lambda$ -HpaII aufgetragen. B: Tabellarisch dargestellt sind die theoretisch erwarteten Fragmentgrößen in Basenpaaren (bp) nach der Restriktionsreaktion. C: Plasmidkarten der analysierten Plasmide. Hervorgehoben sind die verwendeten Restriktionsenzyme und ihre Schnittstelle(n) im Plasmid. Amp: Ampicillin-Resistenz, CMV: Cytomegalovirus-Promotor, Zeo: Zeocin-Resistenz, pUC: pUC Replikationsursprung, F1: F1 Repli-kationsursprung, SV: SV40 Enhancer, gag/env: Elemente zur Plasmidverpackung in viralen Partikeln.

### 3.1.10 Ergebnisse der TAP von CARP-C-TAPw

Der Austausch des 3xFlag-Tags gegen einen 1xFlag-Tag zeigte in den folgenden Aufreinigungen über die Anti-Flag-Säule erstaunlicherweise kaum einen Unterschied zur Elution des 3xFlag-getaggten Proteins. Nach dem Kochen des Säulenmaterials im Lämmli-Puffer, wurde immer noch ein großer Anteil des 1xFlag-getaggten CARP freigesetzt (siehe Beads in Abbildung 3-23), der selbst mit hohen 3xFlag-Peptidkonzentrationen (bis  $1000~\mu g/ml$ ) nicht eluiert werden konnte (siehe E1-E4).



**Abbildung 3–28 Optimierung der Flag-Aufreinigung durch Verwendung eines 1xFlag-***Tags* in Kombination mit einem 3xFlag-Elutionspeptid. *BT*, Durchlauf; *W1-6*, Wasch; *E1-4*, Elution mit 100 (E1), 250 (E2), 500 (E3) und 1000 (E4) μg/mL 3xFlag-Peptid; **1. Antikörper:** mouse-anti-Flag (Verdünnung 1:7500); **2. Antikörper:** HRP-anti-mouse (Verdünnung 1:10000).

Als Alternative wurde untersucht, ob eine proteolytische Spaltung mit Thrombin eine quantitative Elution von der Säule erlaubt. Abbildung 3-24 zeigt den Vergleich der Protease-Elution (1 Unit/mL, Inkubation im Eppendorfgefäß für 1 h bei RT unter leichtem Schütteln) und einer 3xFlag-Peptidelution. Es zeigt sich, dass in beiden Fällen eine vergleichbare CARP-Menge nur durch Denaturierung im Lämmli-Puffer vom Säulenmaterial abzulösen war (siehe Beads-Spuren).



Abbildung 3–29 Vergleich zwischen der Protease- und der Peptidelution bei der Flag-Aufreinigung. E1-2, Protase-Elutionen;  $E^{100}$ , Elution mit 100  $\mu$ g/mL 3xFlag-Peptid;  $E^{300}$ , Elution mit 300  $\mu$ g/mL 3x-Flag-Peptid.

Trotz des Proteinverlustes an dem Säulenmaterial wurde die TAP mit CARP-C-TAP<sub>w</sub> durchgeführt (Abbildung 3-25). Die Aufreinigung erfolgte dabei sukzessive

über eine Anti-Flag-Säule und anschließend über eine StrepTactin-Säule. Man erkennt, dass aus dem Gesamtextrakt ein erheblicher Anteil des CARP-C-TAP $_{\rm W}$  an die Säule gebunden wurde und mittels 3xFlag-Peptid eluiert werden konnte (Abbildung 3-25 A, E1). Allerdings wurde ebenso ein erheblicher Anteil nicht an die Säule gebunden (Abbildung 3-25 A, BT und  $_{\rm WE}$ ).



Abbildung 3–30 TAP-Aufreinigung von CARP-C-TAP<sub>w</sub>: A: Aufreinigung über die Anti-Flag-Säule (1. Schritt der TAP); Ex, Zelllysat transfizierter HEK293T-Zellen; BT, Durchlauf der Anti-Flag-Säule;  $W_E$ , letzter Waschschritt; E1-5, Peptidelutionen mit 100  $\mu$ g/mL 3xFlag-Peptid. B: Aufreinigung über die StrepTactin-Säule (2. Schritt der TAP); BT, Durchlauf;  $W_E$ , letzter Waschschritt; E1-6, Biotinelutionen; Beads, denaturiertes Säulenmaterial im Lämmli-Puffer.

Die weitere Aufreinigung über die StrepTactin-Säule zeigt, dass auch in diesem Schritt ein Teil des getaggten CARP-Proteins nicht an die Säule band (Abbildung 3-25 B, BT). Das gesamte eluierte CARP wurde im ersten Biotinelutionsschritt von der Säule eluiert (Abbildung 3-25 B, E1). Die Denaturierung des Säulenmaterials ergab, dass außerdem eine nicht eluierbare CARP-Fraktion an die StrepTactin-Säule gebunden blieb (Abbildung 3-25 B, Beads).

Das erste Strepeluat (Abbildung 3-25 B, E1) und die letzte Waschfraktion (Abbildung 3-25 B,  $W_E$ ) wurden aufkonzentriert. Ebenso wurden die vergleichbaren Fraktionen einer TAP nicht transfizierter Kontrollzellen behandelt. Die vier angezeigten Fraktionen wurden auf einem Polyacrylamidgel aufgetragen und die Proteine mittels Silberfärbung dargestellt (Abbildung 3-26). Dieses Experiment zeigte, dass im Vergleich zum fast proteinfreien Kontrolleluat die TAP der CARP-transfizierten Zellen mehrere aufgereinigte Proteine ergab, von denen das intensivste das getaggte CARP war (siehe Pfeil), wie später durch eine massenspektrometrische Analyse gezeigt wurde.

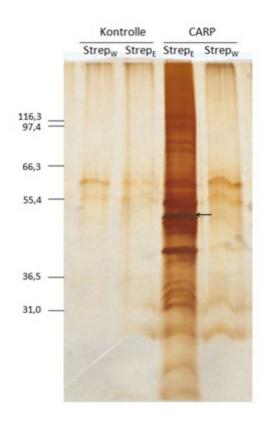
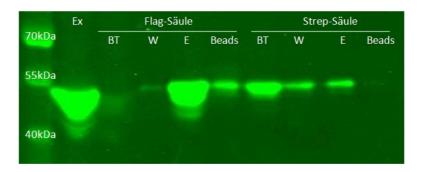


Abbildung 3–31 Silberfärbung der konzentrierten Strepeluate aus der TAP in (Abb. 4-30 und Abb. 4-31). Strep<sub>w</sub>= letzte Waschfraktion der Strep-Säule, Strep<sub>E</sub>= konzentriertes Eluat der Strep-Säule.

Dieses Ergebnis war soweit erfolgreich, jedoch ließ sich die TAP unbefriedigend reproduzieren. Dies lag meistens an der immer noch schwankenden Qualität der Flag-Bindung und -Elution. Als letzter Optimierungsschritt wurde die Aufreinigung über die Anti-Flag-Säule nicht über das *Batch*-Verfahren (im Eppendorfgefäß unter Rotation), sondern mittels *gravity-flow* (Schwerkraft-induzierter Fluss) durchgeführt. Diese kleine Veränderung führte zu einer besseren Flag-Aufreinigungsqualität, die sich auch reproduzieren ließ (Abbildung 3-27). Die Bindung an die Anti-Flag-Säule lief nahezu vollständig (Flag-Säule, BT) und nur ein relativ kleiner Anteil des gebundenen CARP blieb nach der Elution auf der Säule (Flag-Säule, Beads). Die Aufreinigung über die StrepTactin-Säule zeigte einen erneuten Proteinverlust im Durchlauf und in den Waschschritten (Strep-Säule, BT und W). Die relative Quantität des aufgereinigten CARP (Strep-Säule, E) ließ sich allerdings in allen folgenden Aufreinigungen reproduzieren und erwies sich als befriedigend für die weitere Identifizierung der Bindungspartner von CARP.

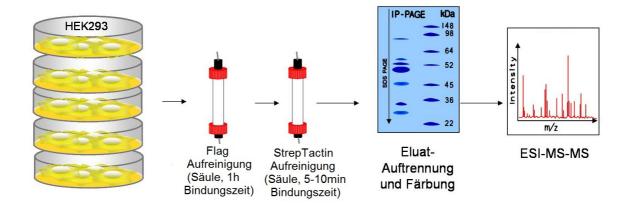


**Abbildung 3–32 Ergebnis der TAP von CARP-TAP<sub>w</sub>-Tag im** *gravity flow-***Verfahren.** *Ex,* Proteinextrakt; *BT,* Durchlauf; *W,* Wasch; *E,* Eluat; **1. Antikörper:** rabbit anti-Flag (Verdünnung: 1:5000), **2. Antikörper:** AlexaFluor800-anti-rabbit (Verdünnung: 1:15000).

Somit lässt sich das optimierte TAP-Aufreinigungsprotokoll wie folgt zusammenfassen (vergleiche Originalprotokoll nach Séraphin unter 2.2.3.8). Dieser Arbeitsablauf ist ebenfalls in Abbildung 3-28 schematisch dargestellt:

- 1. Zunächst wird der Proteinzellextrakt wie unter 2.2.3.1 beschrieben vorbereitet und auf Eis gelagert.
- 2. Sowohl vom Zellextrakt der transfizierten als auch der untransfizierten Zellen wurden die gleichen Proteinmengen für die TAP eingesetzt (für Proteinkonzentrationsbestimmung siehe 2.2.3.2).
- 3. 200 µl M2-Anti-Flag-Agarose wurden in EconoColumns im Lysispuffer (ohne Protease-Inhibitoren) unter *gravity flow* gewaschen und äquilibriert.
- 4. Der Zellextrakt wurde dann 1 h auf die Anti-Flag-Säule gegeben. Dabei wurde die Probe je nach ihrem Volumen mehrmals gebunden.
- 5. Nachdem der Durchlauf der Säule aufgefangen worden war, wurde die Säule mit 2 ml TBS gewaschen
- 6. Eluiert wurde in 1 ml 100  $\mu$ g/ml 3xFlagpeptid in TBS. Dabei wurden fünfmal 200  $\mu$ l zur Elution auf die Säule gegeben, um einen langsamen Fluss und eine bessere Elution zu garantieren.
- 7. Schließlich wurde die Anti-Flag-Agarose in 1 ml TBS aufgenommen, und die Säule wurde gewaschen und auf den zweiten Aufreinigungsschritt mit der StrepTactin-Säule vorbereitet.
- 8. Hierfür wurden 200 µl StrepTactin-Sepharose in der Säule mit Strepwaschpuffer gewaschen und äquilibriert.

- 9. Das Eluat der ersten Aufreinigung wurde in 200  $\mu$ l-Schritten einmalig auf die Säule gegeben.
- 10. Danach wurde die StrepTactin-Sepharose mit 2 ml Strepwaschpuffer gewaschen und die Proteine mit 1 ml 2,5 mM Biotin in Strepwaschpuffer eluiert.
- 11. Anschließend wurde die StrepTactin-Sepharose in 1 ml Strepwaschpuffer aufgenommen.
- 12. Zum Schluss wurden die Proteine des Strepeluats mittels Ionenaustauscher (StrataClean-Beads) unter Rotation bei 4°C konzentriert, auf einem Gradientengel (7,5-15%) aufgetrennt und anschließend mittels Coomassie- bzw. Silberfärbung dargestellt.
- 13. Koeluierte Banden konnten dann ausgeschnitten und in der Tandem-Massenspektrometrie identifiziert werden.



**Abbildung 3–33 Optimierter TAP-Aufreinigungsablauf** (für Details siehe Text)

Weitere Aufreinigungen nach dem optimierten Protokoll wurden außer für CARP auch für weitere getaggte Proteine durchgeführt. Dabei ließ sich nicht nur die TAP-Qualität hervorragend reproduzieren, sondern die Spezifität der etablierten Methode konnte zusätzlich bestätigt werden (merke das unterschiedliche Reinigungs- bzw. Koelutions-Muster von CARP-, DARP- und GSK3β-C-TAP<sub>W</sub>-Tag in (Abbildung 3-29).

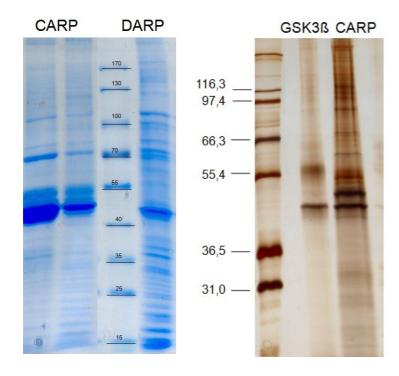


Abbildung 3-34 Silberund Coomassiefärbung
unter-schiedlicher
TAP-Aufreinigungen
mit einem Vergleich
zwischen CARP-,
DARP- und GSK3ßStrepeluaten (GSKß:
Glykogensynthase-Kinase
3ß)

# 3.1.11 Letzte Optimierung zur Durchführung von Lentivirusbasierten stablien Transfektionen

Da neben den problemlos zu transfizierenden HEK293T-Zellen auch Primärkulturen humaner Endothelzellen aus der Nabelschnurvene untersucht werden sollten, wurde der Expressionsvektor weiter verändert:

1. Einerseits sollte der Austausch des bisher verwendeten SFFV (*spleen focus-forming virus*)-Promotors gegen den stärkeren CAGGS-Promotor für eine höhere Expression sorgen. Dieser besteht aus dem β-Aktin-Promotor und dem Cytomegalovirus-Enhancer (Araki, et al. 1997). Die CARP-Expression würde nämlich durch die stabile Transfektion im Vergleich zu den bisher durchgeführten transienten Transfektionen aufgrund niedriger Kopienzahl drastisch abnehmen. Außerdem hatten Versuche von Kolleginnen und Kollegen gezeigt, dass der SFFV-Promotor nicht in allen Zelltypen stark aktiv ist (M. Czerwinska, persönliche Mitteilung). Der Austausch des SFFV-Promotors erfolgte in zwei Schritten. Zunächst wurde das CAGGS-Promotor-Amplifikat über BamHI und KpnI in pGJ3-C-Strep eingesetzt und ersetzte damit den SFFV-Promotor und den kompletten *Tag*-Konstrukt. Somit entstand der Vektor pGJ3-C-CAGGS. Im Anschluss wurde die CARP-Tag Sequenz aus pGJ3-C-TAP<sub>W</sub> über SwaI und BsrGI in pGJ3-C-CAGGS eingesetzt. Dieser

Vektor wurde pGJ3-C-TAP $_{\rm S}$  gennant, wobei die Indizes S bzw. W für die starke ( $\underline{\rm s}$ trong) und die schwache ( $\underline{\rm w}$ eak) Expression des getaggten CARP steht. Abbildung 3-30 zeigt die Expressionsanalyse nach einer transienten Expression von CARP-C-TAP $_{\rm W}$  (Spur 2) und das deutlich erhöhte Expressionsniveau von CARP-C-TAP $_{\rm S}$  (Spuren 3-5).

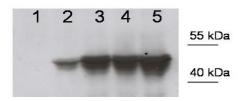


Abbildung 3–35 Transiente Expressionsanalyse von CARP-C-TAP<sub>w</sub> mit dem SFFV-Promotor im Vergleich zu CARP-C-TAP<sub>s</sub> mit dem stärkeren CAGGS-Promotor: 1: untransfizierte Zellen, 2: SFFV-CARP, 3-5: CAGGS-CARP.

2. Durch das Einfügen einer Puromycin-Resistenz (Puro) und des dazugehörigen PGK (Phosphoglycerat)-Promotors in die unmittelbare Nähe der CARP-Expressionskassette sollte nach dem Einbau der DNA ins Genom eine Selektion der CARP-exprimierenden Zellen gewährleistet werden. Das eingefügte Puro-Gen kodiert für die Puromycin-N-Acetyltransferase (Pac). Die Behandlung mit Puromycin-Hydrochlorid inhibiert den Peptidyltransfer am Ribosom während der Biosynthese. Nur Zellen, die die Puromycin-N-Acetyltransferase exprimieren, können trotz der Antibiotikabehandlung eine ungestörte Biosynthese durchführen. Die Insertion des Pac-Gens (Puro) erfolgte über die BsrGI-Restriktionsschnittstelle.

Abbildung 3-31 zeigt die diagnostische Restriktionsnalyse der CAGGS- sowie Puro-Klonierung. Zum Schluss stellt Abbildung 3-32 das Endergebnis der Klonierungsarbeit dar. Der optimierte Expressionsvektor ermöglicht die Expression des CARP-Fusionsproteins unter der Kontrolle des starken CAGGS-Promotor. Dabei ist die CARP c-DNA mit der Sequenz des optimierten TAP-*Tags* (linker-HA-Thrombin-Strep-TEV-1xFlag) fusioniert. Die zu transfizie-renden Zellen können über die Puromycin-Resistenz selektioniert werden, um nur CARP-exprimierende Zellen weiterzukultivieren. Mit diesen stabil transfizierten Zellen wurden die in den nächsten Kapiteln aufgeführten Experimente durchgeführt.

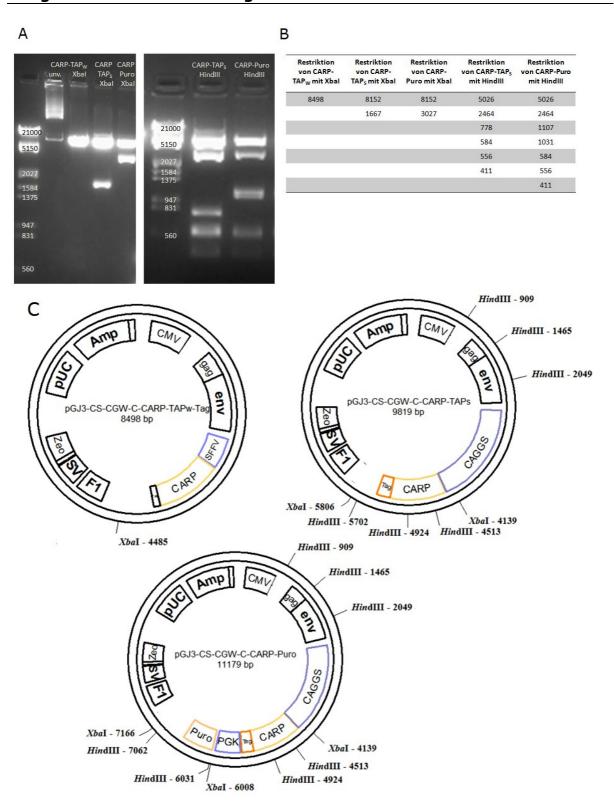
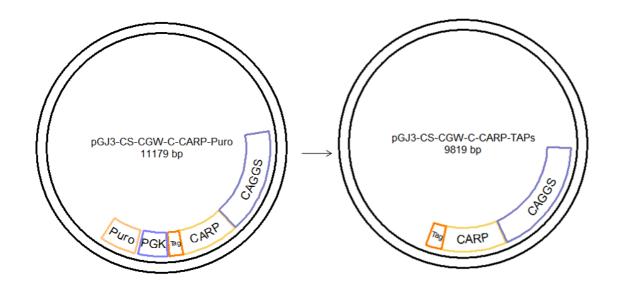


Abbildung 3–36 Diagnostische Restriktionsanalyse der Plasmide pGJ3-CARP-C-TAP<sub>w</sub>, pGJ3-CARP-C-TAP<sub>s</sub> und pGJ3-CARP-C-Puro A: Links ist der Größenstandard  $\lambda$ -HpaII aufgetragen; unv= unverdautes Plasmid B: Tabellarisch dargestellt sind die theoretisch erwarteten Fragmentgrößen in Basenpaaren (bp) nach der Restriktionsreaktion. C: Plasmidkarten der analysierten Plasmide. Hervorgehoben sind die verwendeten Restriktionsenzyme und ihre Schnittstelle(n) im Plasmid. Amp: Ampicillin-Resistenz, CMV: Cytomegalovirus-Promotor, Zeo: Zeocin-Resistenz, pUC: pUC Replikationsursprung, F1: F1 Repli-kationsursprung, SV: SV40 Enhancer, gag/env: Elemente zur Plasmidverpackung in viralen Partikeln.



**Abbildung 3–37 Herstellung des endgültigen Expressionsvektor pGJ3-CARP-C-Puro.** Der Expressionsvektor pGJ3-CARP-C-TAP<sub>w</sub> wurde durch die Substitution des SFFV-Promotors durch den stärkeren CAGGS-Promotor und die Insertion einer Puromycin-Resistenz unter der Kontrolle des PGK-Promotors modifiziert. Die weiteren Elemente auf den Plasmiden entsprechen denen des Plasmids pGJ3-CS-CGW-C-Tag (vgl. Abb. 3-3).

# 3.2 Identifizierung und Verifizierung aufgereinigter Interaktionspartner von CARP

# 3.2.1 Massenspektrometrische Analyse und Identifizierung möglicher Interaktionspartner von CARP

Die TAP-Aufreinigung wurde sowohl von Lysaten transient (n=8) als auch stabil transfizierter HEK293T-Zellen (n=2) durchgeführt und jeweils die koeluierten Proteine mittels Tandem-Massenspektrometrie identifiziert (insgesamt n=10 Experimente, in der Massenspektrometrie wurden n=5 analysiert, davon 4 Analysen transient transfizierter Zellen). Koeluiert wurden  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin,  $\beta/\gamma$ - Aktin, Hitzeschockprotein 70 sowie weitere Proteine, die in Tabelle 3-1 zusammengefasst sind. Aus Abbildung 3-33 wird einerseits ersichtlich, dass die Aufreinigung der untransfizierten Kontrollzellen keinen Hintergrund zeigte. Andererseits konnte die Zahl der koeluierten Proteine durch die Aufreinigung von Lysaten stabil transifizierter Zellen (TAP5) reduziert werden, die ein deutlich niedrigeres CARP-Expressionsniveau im Vergleich zu den transient transifizierten Zellen zeigten (TAP1-4). Die in der Massenspektrometrie gefundenen Peptide der koeluierten Proteine, die Sequenzabdeckung der jeweiligen Proteine und die

#### 3 Ergebnisse und Auswertung

Häufigkeit ihres Auftretens zusammen mit dem getaggten CARP sind im Detail in Tabelle 3-1 aufgelistet.

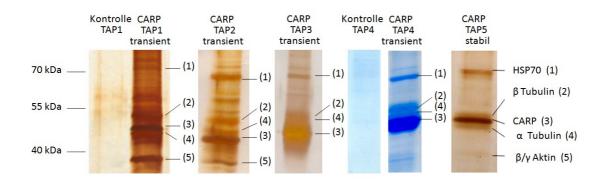


Abbildung 3-38 Silber- bzw. Coomassie-gefärbte Gele der aufgetrennten Eluate TAP-Versuchen. Hervorgehoben sind die Proteinbanden, die mittels Massenspektrometrie identifiziert wurden (für Details siehe Tabelle 3-1). identifizierten Proteine sind am rechten Gel (TAP5) dargestellt und mit Nummern versehen, die für die Beschriftung der Gele TAP 1-4 verwendet werden.

Tabelle 3-6 Übersicht über die in der Massenspektrometrie identifizierten Peptide des aufgereinigten CARP und seiner koeluierten Proteine

#### CARP (IPI00004294.4)

K.VEELVTGK.N

K.AALENKLPVVEK.F

K.LMEAGAQIEFR.D

R.DKLLSTALHVAVR.T

R.EGDTPLHDAVR.L

K.AIFDSLK.E

LLMTFGADLK

K.LLSTALHVAVR.T

**LMEAGAQIEFR** 

DREGDTPLHDAVR

**NSNGAAGEFLPGEFR** 

**TPMDLVLHWQSGTK** 

**EPEPEIMTEPVDVPR** 

NGEYEAAVALEK

GSGWSYPQFEK (TAP-Tag-Peptid)

GSISSLVPR (TAP-Tag-Peptid)

**Proteinlänge:** 319 Aminosäuren (aa)

Molekulargröße: 36kDa Sequenzabdeckung: 55,48%

(177aa/319aa)

**Anzahl gefundener Peptide: 14** 

Häufigkeit des Auftretens: n=5

Proteinlänge inkl. TAP-Tag: 396 aa Molekulargröße inkl. TAP-Tag: 44kDa

Sequenzabdeckung inkl. TAP-Tag:

53,28% (211aa/396aa)

Sequenzabdeckung des TAP-Tags:

25,97% (20aa/77aa)

#### **β-Tubulin (IPI00007752.1)**

K.NSSYFVEWIPNNVK.T

K.GHYTEGAELVDSVLDVVR.K

R.ISVYYNEATGGK.Y

R.ALTVPELTQQVFDAK.N

R.AILVDLEPGTMDSVR.S

K.MAVTFIGNSTAIQELFK.R

R.FPGQLNADLR.K

K.NSSYFVEWIPNNVK.T

K.EVDEQMLNVQNK.N

K.IREEYPDR.I

K.LAVNMVPFPR.L

R.YLTVAAVF.R

Proteinlänge: 445 Aminosäuren (aa)

Molekulargröße: 49,67kDa

Sequenzabdeckung: 48,53%

(219aa/445aa)

**Anzahl gefundener Peptide: 15** Häufigkeit des Auftretens: n=5

**Proteinfunktion:** 

Mitglied der Mikrofilament-Familie des

tubulären Zytoskeletts

#### 3 Ergebnisse und Auswertung

R.IMNTFSVVPSPK.V R.LHFFMPGFAPLTSR.G R.ISEQFTAMFR.R

a-Tubulin (IPI00007750.1)

K.TIGGGDDSFNTFFSETGAGK.H

R.IHFPLATYAPVISAEK.A

K.DVNAAIATIK.T

K.VGINYQPPTVVPGGDLAK.V

R.NLDIERPTYTNLNR.L R.QLFHPEQLITGK.E K.EDAANNYAT.G

K.EIIDLVLDR.I

R.AVFVDLEPTXVDEVR.T

R.FDGALNVDLTEFQTNLVPYPR.I

R.LISQIVSSITASLR.F R.TIQFVDWCPTGFK.V

R.LSVDYGKK.S K.YMACCLLYR.G Proteinlänge: 448 Aminosäuren (aa)

Molekulargröße: 49,92kDa Sequenzabdeckung: 48,21%(216aa/448aa)

Anzahl gefundener Peptide: 14 Häufigkeit des Auftretens: n=5

**Proteinfunktion:** 

Mitglied der Mikrofilament-Familie des

tubulären Zytoskeletts

Hitzeschock-Protein 70 (IPI 00304925.3)

R.IINEPTAAAIAYGLÓR.T R.TTPSYVAFTDTER.L R.LVNHFVEEFKR.K K.AQIHDLVLVGGSTR.I K.VEIIANDOGNR.T

R.TTPSYVAFTDTER.L

Proteinlänge: 641 Aminosäuren (aa)

Molekulargröße: 70,05kDa Sequenzabdeckung: 14,04%

(90/641aa)

Anzahl gefundener Peptide: 6 Häufigkeit des Auftretens: n=5 Proteinfunktion: Mitglied der Hitzeaktivierten Proteinfamilie (Chaperone)

 $\beta/\gamma$ -Aktin (IPI00021439:1)

R.VAPEEHPVLLTEAPLNPK.A K.SYELPDGQVITIGNER.F

R.GYSFTTAER.E K.AGFAGDDAPR.A R.AVFPSIVGRPR.H K.DSYVGDEAQSK.R **Proteinlänge:** 375 Aminosäuren (aa)

Molekulargröße: 41,73kDa

**Sequenzabdeckung:** 23,2% (87/375aa)

Anzahl gefundener Peptide: 6 Häufigkeit des Auftretens: n=3 Proteinfunktion: Mitglied des

Aktinzytoskeletts

ATP Synthase β-Kette (IPI00303476.1)

R.FTQAGSEVSALLGR.I R.VALTGLTVAEYFR.D R.DQEGQDVLLGIDNIFR.F Proteinlänge: 529 Aminosäuren (aa)

Molekulargröße: 56,56kDa

**Sequenzabdeckung:** 9,26% (49/529aa)

Anzahl gefundener Peptide: 3 Häufigkeit des Auftretens: n=2 Proteinfunktion: Untereinheit der ATP-

**Synthase** 

ATP Synthase a-Kette (IPI00440493.2)

R.VLSIGDGIAR.V R.ILGADTSVDLEETGR.V Proteinlänge: 553 Aminosäuren (aa)

Molekulargröße: 59,75kDa

Sequenzabdeckung: 5,24% (29/553aa)

Anzahl gefundener Peptide: 2 Häufigkeit des Auftretens: n=2 Proteinfunktion: Untereinheit der ATP-

Synthase

Translation Elongationsfaktor 1q1 (IPI00736975.1)

K.IGGIGTVPVGR.V R.EHALLAYTLGVK. K.STAISLYAK.F R.LPLQDVYK.I **Proteinlänge:** 462 Aminosäuren (aa)

Molekulargröße: 50,14kDa Sequenzabdeckung: 10,17%

(47aa/462aa)

Anzahl gefundener Peptide: 4 Häufigkeit des Auftretens: n=2 Proteinfunktion: Translationsfaktor bei

der Proteinsynthese

D-3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase (IPI00011200.4)

K.VTADVINAAEK.L K.GTIQVITQGTSLK.N **Proteinlänge:** 499 Aminosäuren (aa)

Molekulargröße: 53,08kDa

**Sequenzabdeckung:** 5,61% (28/499)

Anzahl gefundener Peptide: 2 Häufigkeit des Auftretens: n=1 Proteinfunktion: Aminosäuren-

Biosynthese (Serin)

Vimentin (IPI00418471.5)

R.SLYASSPGGVYATR.S

**Proteinlänge:** 466 Aminosäuren (aa)

Molekulargröße: 53,65kDa

Sequenzabdeckung: 3,59% (16/446) Anzahl gefundener Peptide: 1 Häufigkeit des Auftretens: n=1 Proteinfunktion: Mitgliedprotein der Intermediärfilamente des Zytoskeletts

Aus den oben genannten potentiellen Interaktionspartnern wurden a-,  $\beta$ -Tubulin und Aktin näher analysiert, da diese am häufigsten zusammen mit CARP koeluiert wurden und bei der massenspektrometrischen Analyse die größte Sequenzabdeckung aufwiesen. Sowohl die Interaktion mit a- und  $\beta$ -Tubulin als auch mit dem zytoplasmatischen Aktin sollte durch weitere Methoden verifiziert werden.

# 3.2.2 Verifikation der Interaktion von CARP mit $\alpha$ - und $\beta$ - Tubulin

#### Western-Blot-Analyse

Für die Verifikation der CARP-Tubulin-Interaktion wurden die Flageluate im Western-Blot mit  $\alpha$ - und mit  $\beta$ -Tubulin spezifischen Antikörpern analysiert. Die Tubuline konnten im Zellextrakt, im Durchlauf der Anti-Flag-Säule und in geringen Mengen auch im Flageluat nachgewiesen werden (siehe Pfeil in Abbildung 3-34).

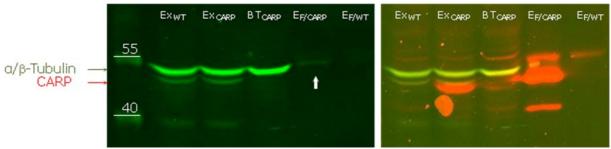


Abbildung 3–39 Nachweis von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin in dem Flageluat ( $E_F$ ) im Western-Blot: Ex: Proteinzellektrakt, BT: Durchbruch,  $E_F$ : Flageluat, 1.Antikörper: rabbit-anti- $\beta$ -Tubulin (1:50000) gemischt mit rabbit-anti- $\alpha$ -Tubulin (1:20000), bzw. rabbit-anti-Flag (1:5000), 2.Antikörper: AlexaFluor680/800-anti-rabbit (1:10000), Größenangaben des Proteinstandards sind in kDa.

#### **Tubulin-Sedimentationsassay**

Als eine weitere Methode zur Verifikation der CARP-Tubulin-Interaktion wurde die Tubulin-Kosedimentation herangezogen. Aus Digitonin permeabilisierten Zellen wurde ein Extrakt hergestellt, der unter anderem die Tubuline und Tubulinassoziierte Proteine enthält. Durch Zugabe von 0,1 M MgCl<sub>2</sub> können diese Tubulinkomplexe ausgefällt und durch Zentrifugation sedimentiert werden. In Abbildung 3-35 ist die gelungene Tubulinsedimentation aus der zytoplasmatischen Proteinfraktion stabil transfizierter HEK293T-Zellen mittels Magnesiumchloridfällung gezeigt. Obwohl >50% der Tubuline im Pellet detektiert werden konnten, war CARP nur im Zelllysat und im Überstand der Fällung nachweisbar.

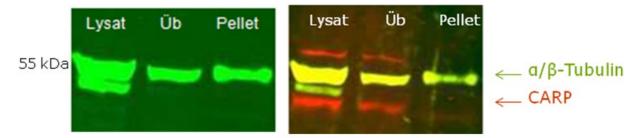
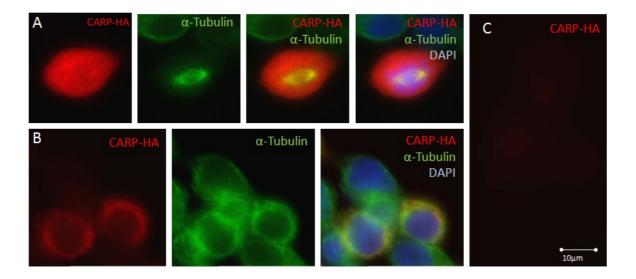


Abbildung 3–40 Kosedimentation von CARP und den Tubulinen aus dem Zytoplasma stabil transfizierter HEK293T-Zellen: Üb: Überstand; 1.Antikörper: rabbit-anti- $\alpha$ -Tubulin (1:20000) gemischt mit rabbit-anti- $\beta$ -Tubulin (1:50000) ,bzw. rabbit-anti-Flag (1:5000); 2.Antikörper: AlexaFluor-680/800 anti-rabbit (1:10000).

#### Immunzytochemische Färbung

Weiterhin wurden immunzytochemische Färbungen von stabil transfizierten HEK293T-Zellen zur Lokalisation von CARP und Tubulinen durchgeführt. Diese

Färbungen gaben keinen Aufschluss über eine mögiche Kolokalisation innerhalb der Zelle.



**Abbildung 3–41 Kolokalisationsfärbung von CARP mit α-Tubulin in stabil transfizierten HEK293T-Zellen: A**: CARP wird koexprimiert, zeigt allerdings keine Kolokalisation mit dem tubulären Spindelapparat einer mitotischen Zelle. **B**: CARP zeigt keine distinkte Kolokalisation mit α-Tubulin in ruhenden HEK293T Zellen. **C**: Die Immundetektion von untransfizierten Zellen dient als eine Negativkontrolle; die CARP-Färbung ist mit dem anti-HA-Antikörper aus der Maus (Verdünnung: 1:200), die α-Tubulin-Färbung mit einem anti-α-Tubulin-Antikörper aus dem Kaninchen (Verdünnung 1:200), die Kernfärbung mit DAPI (SlowFade Gold) erfolgt.

Abbildung 3-36 zeigt den immunozytochemischen Nachweis von CARP und a-Tubulin in einer mitotischen HEK293T Zelle. CARP ist ubiquitär in der Zelle verteilt, während das a-Tubulin in der Zelle im Spindelapparat konzentriert ist. Die Überlagerung beider Kanäle zeigt zum einen eine Gelbfärbung des Spindelapparates, doch zeigt diese angesichts der wenig distinkten Verteilung des CARP keine Kolokalisation im Sinne eines Proteinkomplexes an. Gleiches gilt für die Darstellung von CARP und a-Tubulin in Interphase-Zellen (Abbildung 3-36 B). Eine zusätzliche Färbung mit dem  $\beta$ -Tubulin Antikörper konnte leider wegen der schlechten Antikörperqualität in immunzyto-chemischen Untersuchungen nicht ausgewertet werden.

Zusammenfassend ließ sich die Interaktion von CARP mit den in der Massenspektrometrie identifizierten Tubulinen durch die in diesem Kapitel aufgeführten Experimente nicht verifizieren.

#### 3.2.3 Verifikation der Interaktion von CARP mit Aktin

Die massenspektrometrische Analyse der in der TAP koeluierten Proteine lieferte mit dem zytoplasmatischen Aktins einen weiteren, möglichen Interaktionspartner von CARP. Es konnte zwar ausgeschlossen werden, dass es sich dabei um die  $\alpha$ -Isoform handelte, da  $\beta/\gamma$ -spezifische Peptide gefunden wurden. Alle gefundenen Peptide waren allerdings homologe Peptide der  $\beta$ - und  $\gamma$ -Isoform.

**Abbildung 3–42 Peptidsequenzabgleich des N-Terminus von** β- und γ-Aktin. N-terminal sind die vier Isoform-spezifischen Aminosäuren hervorgehoben (:). Weiterhin ist das tryptische Peptid ( $aa^{96}$ - $aa^{113}$ ) hervorgehoben, das in der Massenspektrometrie identifiziert wurde und eine für die β- und die γ-Aktinisoformen spezifische Aminosäure (**rot**) beinhaltet.

Der Unterschied zwischen den zu ca. 98% homologen Isoformen besteht in nur vier Aminosäuren des N-Terminus. Dies zeigt der Sequenzabgleich des N-Terminus der  $\beta$ - und  $\gamma$ -Aktin Isoformen in Abbildung 3-37. Daher musste in den folgenden Versuchen nicht nur die Interaktion mit Aktin verifiziert, sondern auch die interagierende Aktinisoform definiert werden.

#### Western-Blot Analyse

Für die Verifikation der CARP-Aktin-Interaktion und vor allem für die Aufklärung der interagierenden Aktin-Isoform wurden die TAP-Eluate im Western-Blot sowohl mit  $\gamma$ - als auch mit  $\beta$ -Aktin-spezifischen Antikörpern untersucht. Während  $\gamma$ -Aktin lediglich im Proteinzellextrakt detektierbar war, jedoch nicht im Flag- und Strepeluat (Abbildung 3-38), konnte  $\beta$ -Aktin sowohl im Proteinzellextrakt als auch im Flageluat nachgewiesen werden (Abbildung 3-39).

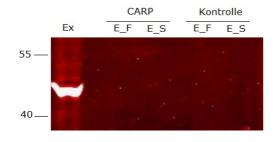


Abbildung 3–43 Nachweis von  $\gamma$ -Aktin in den Flag- (E\_F) und Strepeluaten (E\_S) im Western-Blot: 1.Antikörper: anti- $\gamma$ -Aktin (1:3000), 2.Antikörper: AlexaFluor680-anti-goat (1:2000), Molekulargrößen in kDa.

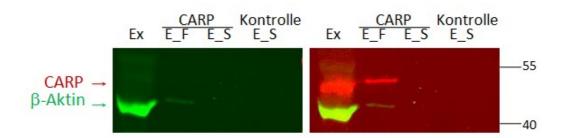


Abbildung 3–44 Nachweis von  $\beta$ -Aktin in dem Flageluat (E\_F) im Western-Blot. 1.Antikörper: mouse-anti- $\beta$ -Aktin (1:2000) bzw. rabbit-anti-Flag (1:5000), 2.Antikörper: AlexaFluor680-anti-mouse (1:10000), AlexaFluor800-anti-rabbit (1:10000), Molekulargrößen in kDa.

#### Immunzytochemische Färbung

Weiterhin zeigten immunzytochemische Färbungen von stabil transfizierten HEK293T-Zellen eine Koexpression und Kolokalisation des getaggten CARP und β-Aktin (Abbildung 3-40A). Beide Proteine lokalisierten im Kern und im Zytoplasma von HEK293T-Zellen. Besonders auffällig waren die Zellsprossen sich ausbreitender Zellen, in denen β-Aktin intensiver auftrat (siehe Pfeile). Dort war ebenfalls eine Anreicherung von CARP, das teilweise mit β-Aktin kolokalisierte, festzustellen. In einigen Zellen wurde weiterhin eine Kolokalisation von CARP mit β-Aktin im Kern beobachtet. Um zu untersuchen, ob die Kernlokalisation von β-Aktin von der CARP-Überexpression abhängig ist, wurden insgesamt 60 Zellen bezüglich dieser Kolokalisation ausgezählt. Abbildung 3-40B zeigt drei Nachbarzellen mit einer starken β-Aktin Lokalisation im Kern, allerdings mit unterschiedlicher CARP-Expression und Lokalisation. Während Zelle 1 nahezu keine CARP-Expression zeigt, ist β-Aktin hauptsächlich im Kern lokalisiert. Dies ist auch der Fall in den beiden anderen Zellen, und zwar unabhängig von der CARP-Lokalisation, die in Zelle 2 ausschließlich zytoplasmatisch und in Zelle 3 hauptsächlich nukleär ist.

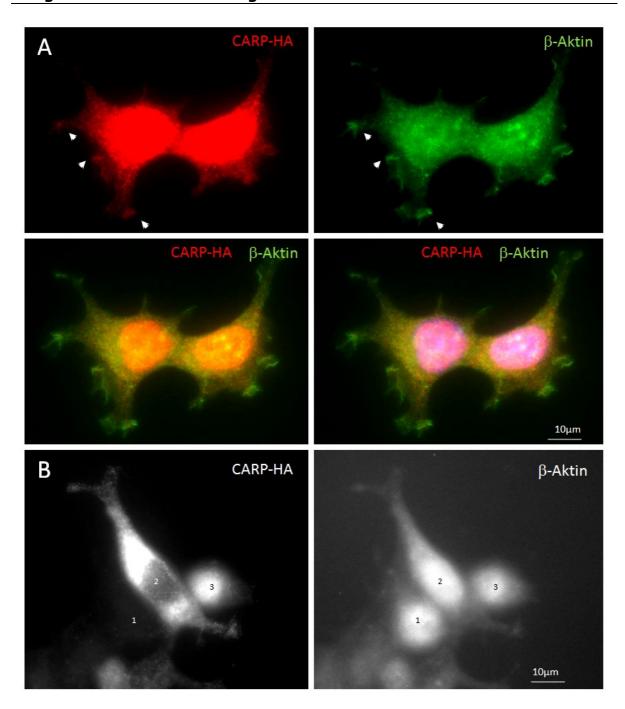


Abbildung 3–45 Kolokalisationsfärbung von CARP mit β-Aktin in stabil transfizierten HEK293T Zellen. A: CARP wird koexprimiert und teilweise kolokalisiert an den wachsenden Zellsprossen mit β-Aktin (Pfeile). B: Die β-Aktin Lokalisation im Kern ist unabhängig sowohl von der CARP-Expression (siehe Zelle 1) als auch von der CARP-Lokalisation (Zellen 2 und 3). β-Aktin blieb im Kern vorhanden, obwohl CARP eine ausschließlich zytoplasmatische Lokalisation zeigte (Zelle 2), und kolokalisierte mit CARP im Kern von anderen Zellen (Zelle 3).

Die CARP-Färbung ist mit dem anti-HA-Antikörper aus der Maus (Verdünnung: 1:200), die  $\beta$ -Aktin Färbung mit einem anti- $\beta$ -Aktin-Antikörper aus dem Kaninchen (Verdünnung 1:200), die Kernfärbung mit DAPI (SlowFade Gold) erfolgt.

Die genaue Zellauszählung führte zu dem Ergebnis, dass die Kolokalisation von CARP und  $\beta$ -Aktin im Kern nicht in allen Zellen vorhanden war. Während 92% der untersuchten Zellen eine Kernlokalisation für  $\beta$ -Aktin zeigten, konnte CARP in nur 61% dieser Zellen mit  $\beta$ -Aktin im Kern kolokalisiert werden. Die  $\beta$ -Aktin Lokalisation im Kern scheint von der stabilen Expression von CARP in diesen Zellen unabhängig zu sein. Auch scheint die virale Tranksfektion keinen Einfluss auf die  $\beta$ -Aktin Lokalisation in den HEK293 Zellen zu haben, da untransfizierte Zellen eine mit den transfizierten Zellen vergleichbare nukleäre  $\beta$ -Aktin-Subpopulation zeigen (Daten nicht gezeigt). Diese unerwartet starke  $\beta$ -Aktin Lokalisation im Kern müsste daher eine Eigenschaft der kultivierten HEK293-Zellen sein.

#### 3.2.4 Subzelluläre CARP-Lokalisation

Der Nachweis der Interaktion von CARP mit dem  $\beta$ -Aktin warf weiterhin die Frage auf, inwieweit sich die subzelluläre Verteilung von CARP während dynamischen Umbauten des Zytoskeletts verändert. Abbildung 3-41 zeigt eine quanitative Auswertung der CARP-Verteilung in 250 HEK293T-Zellen. Dabei wurde zwischen einer Kern-, einer zytoplasmatischen oder einer Kern- und zytoplasmatischen Lokalisation unterschieden.

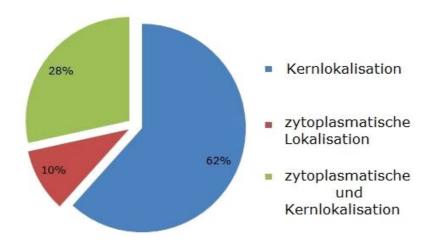


Abbildung 3-46 Subzelluläre Verteilung des getaggten CARP in stabil transfizierten HEK293T-Zellen (n=250)

Abbildung 3-42 zeigt exemplarisch transfizierte HEK293T-Zellen, bei denen sich CARP in manchen Zellen ausschließlich im Zytoplasma (A, oben rechts), in

weiteren nahezu vollständig im Kern (B) und in anderen Zellen sowohl im Zytoplasma als auch im Kern (A, unten links) befand.

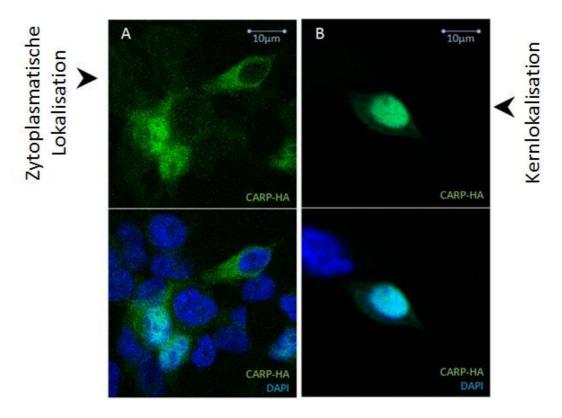


Abbildung 3–47 Konfokale Lasermikroskopische Aufnahmen des getaggten CARP in transfizierten HEK293T-Zellen. A: Während sich CARP teilweise nur im Zytoplasma aufhielt, verteilte sich das CARP-Signal in anderen Zellen gleichmäßig zwischen dem Kern und dem Zytoplasma. B: Andere Zellen zeigten ein CARP-Signal ausschließlich im Kern; die CARP-Färbung ist mit dem anti-HA-Antikörper aus der Maus (Verdünnung: 1:200), die Kernfärbung mit DAPI (SlowFade Gold) erfolgt.

#### CARP-Verteilung in synchronisierten Zellen

In weiteren Analysen wurde untersucht, ob sich die subzelluläre Verteilung von CARP während des Zellzyklus ändert. Zu diesem Zweck wurden HEK293T-Zellen mit Nocodazol in der G2 (gap)-Phase und direkt vor der M (Mitose)-Phase arrestiert (G2/M-Block). Nach 16h wurden die Zellen aus dem Arrest entlassen. In den so synchronisierten Zellen wurde die CARP-Verteilung über 20 h verfolgt (Abbildung 3-43).

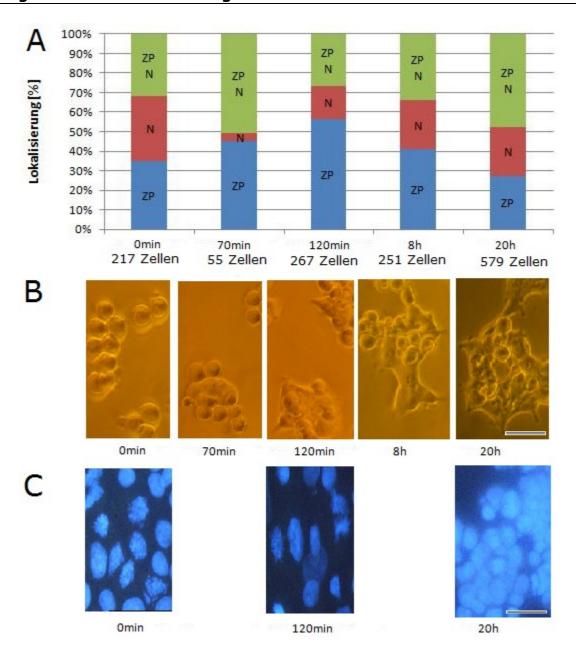


Abbildung 3–48 Subzelluläre Umverteilung des getaggten CARP in Noco-dazole synchronisierten CARP-HEK293T-Zellen. A: N=Kern-, ZP= zyto-plasmatische, NZP= Kern- und zytoplasmatische Lokalisation. Die Zahl der analysierten Zellen ist ebenfalls vermerkt. B: Hellfeldaufnahmen der synchronisierten Zellen als morphologische Kontrolle des Zellwachstums nach dem Aufheben des Zellblocks; Maßstab  $\leftrightarrow$  40µm. C: DAPI-Färbung der Kerne zeigen kondensierte DNA (0min), Spindel-organisierte DNA (120min) und das Chromatin sich nicht teilender Zellen (20h); Maßstab  $\leftrightarrow$  40µm.

Die Hellfeldaufnahmen (Abb. 3.43B) zeigten, wie sich die Zellen infolge der Nocodazol-Behandlung abgerundet haben (Omin). Da Nocodazol den Aufbau des Spindelapparates blockiert, befanden sich die Zellen in einem promitotischen Zustand. Nach dem Aufheben des Zellblocks traten sie in die Mitose ein und breiteten sich später auf der Oberfläche der Zellkulturschale aus (20h).

#### 3 Ergebnisse und Auswertung

Die Färbung der DNA (Abb.3.43C) zeigte, wie die DNA in vielen Zellen infolge des Zellblocks kondensiert wurde und ein punktiertes Muster annahm (Omin). Erst nach dem Aufheben des Zellblocks konnten die Zellen sich teilen (siehe die Metaphase DNA nach 120 min). Die Tatsache, dass nicht alle Kerne eine kondensierte DNA-Form zum Zeitpunkt Omin zeigten, deutet darauf hin, dass die Block-Effizienz unter 100% lag. Noch deutlicher zeigt das Bild der DNA-Färbung nach 120 min, wie einige Zellen entweder sich noch nicht geteilt haben oder sich noch teilen müssten (unkondensierte Kerne in der Mitte), sich in der Metaphase der Mitose (links) oder in der Anaphase der Mitose (rechts) befinden. Eine genaue Quantifizierung der Synchronisationsqualität, z.B. durch die Bestimmung des Spindel-Index, wurde nicht durchgeführt. Daher können die Ergebnisse dieses Versuches lediglich qualitativ betrachtet werden.

Trotz der unvollständigen Synchronisationseffizienz zeigten sich erhebliche Unterschiede in der CARP Lokalisation nach dem Auswaschen des Nocodazols. Besonders deutlich war die Abnahme der CARP Lokalisation im Kern (N, 70min). Im weiteren Verlauf (120 min) nahm die CARP Lokalisation im Zytoplsama (ZP, 120min) zu. Dieser transiente Zustand wurde zu späteren Zeiten (8h und 20h) zugunsten einer ansteigenden nukleären Lokalisation von CARP wieder aufgehoben.

Zusätzlich zu dieser Beobachtung zeigten weitere immunzytochemische Färbungen des getaggten CARP in mitotischen Zellen eine vermehrte zytoplasmatische Lokalisation. Dabei waren sich auch distinkte CARP-Lokalisationen zu beobachten, z.B. an den Polen der sich teilenden Zelle (Abbildung 3-44) oder in der Einschnürung zwischen den entstehenden Tochterzellen (Abbildung 3-45). Diese distinkte räumliche Anordnung und die durch die Synchronisationsversuchen festgestellte dynamische intrazelluläre Translokation von CARP stellten weitere Indizien auf die Assoziation von CARP mit dem Zytoskelett dar.

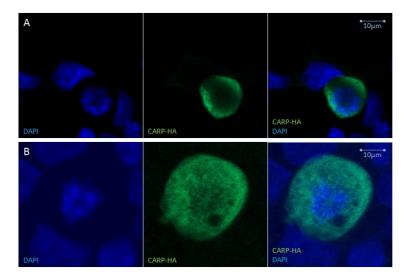


Abbildung 3-49 Konfokale lasermikroskopi-Aufnahmen sche des getaggten CARP in mitotischen HEK293T-Zellen: Zellen, die sich gerade in der Metaphase befinden zeigen sowohl eine polare (A) als auch eine ubi-(B) CARP-Verguitäre teilung; die CARP-Färbung mit dem anti-HA-Antikörper aus der Maus (Verdünnung: 1:200), die Kernfärbung DAPI mit (SlowFade Gold) erfolgt.

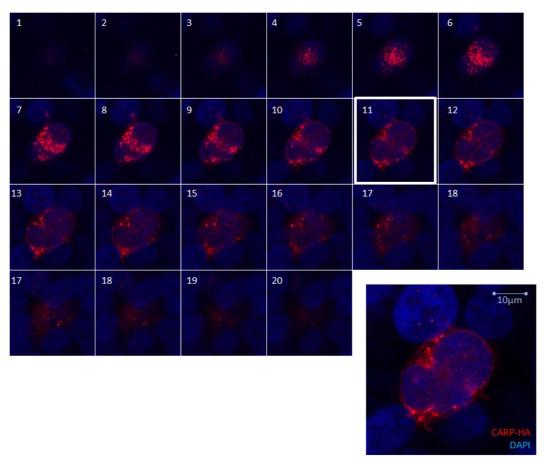


Abbildung 3–50 Konfokale lasermikroskopische Z-Stack-Aufnahme des getaggten CARP während der Zytokinese einer transfizierten HEK293T-Zelle: CARP zeigt eine distinkte Verteilung zwischen den sich teilenden Zellen. Unten rechts ist die mittlere Zellschicht (Schicht 11) größer dargestellt, wobei deutlich wird, dass das CARP-Signal an der Einschnürung (Aktinring) zwischen den entstehenden Tochterzellen lokalisiert ist; die CARP-Färbung ist mit dem anti-HA-Antikörper aus der Maus (Verdünnung: 1:200), die Kernfärbung mit DAPI (SlowFade Gold) erfolgt.

#### CARP-Verteilung in trypsinisierten Zellen

Um eine massive Reorganisation des Zytokskeletts zu induzieren und dabei die resultierende intrazelluläre CARP-Verteilung weiter untersuchen zu können, wurden CARP exprimierende HEK293T-Zellen trypsinisiert, gewaschen und dann erneut ausgesät. Die Verteilung von CARP wurde vor dem Trypsinisieren, 4 und 8h nach dem Aussäen immunozytochemisch analysiert (n=100 Zellen). Während der Zelladhäsion und Migration auf der Zellkulturschale zeigte sich eine Umorganisation von CARP mit vermehrter Translokation ins Zytoplasma 4h nach dem Aussäen. Nach 8 h pendelte sich die Ausgangsverteilung zwischen dem Kern und dem Zytoplasma wieder ein (Abbildung 3-46).

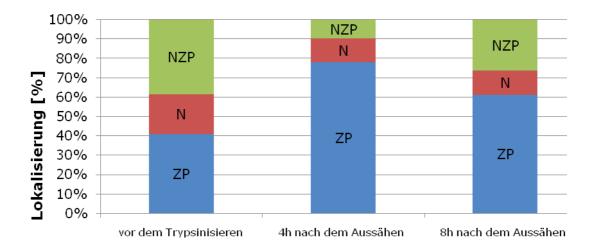


Abbildung 3–51 Subzelluläre CARP-Umverteilung in frisch ausgesäten CARP-HEK293T-Zellen (n=100). N: Kern-, ZP: zytoplasmatische, NZP: Kern- und zytoplasmatische Lokalisation.

Interessanterweise zeigten die Zellen während ihrer Ausbreitung eine ver-mehrte CARP-Lokalisation an der Zellfront der Lamellipodien, der migrierenden Zellfront (Abbildung 3-46). Dieser Befund war besonders intressant, da bekanntermaßen  $\beta$ -Aktin die Isoform ist, welche mit CARP interagiert und in den Lamellipodien migrierender Zellen lokalisiert ist (Hoock, et al. 1991).

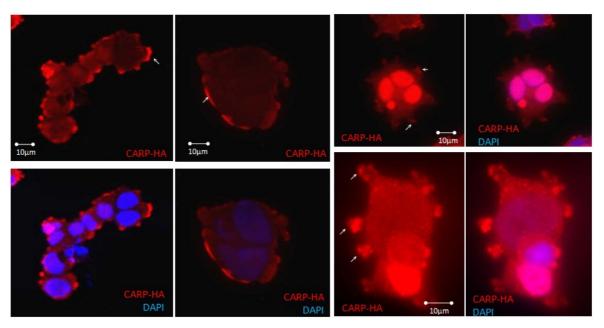


Abbildung 3–52 Subzelluläre CARP-Verteilung in frisch ausgesäten stabil transfizierten HEK293T-Zellen. Die Pfeile zeigen auf die konzentrierte Lokalisation von CARP an der Membran und in den Lamellipodien der expandierenden Zellen; die CARP-Färbung ist mit dem anti-HA-Antikörper aus der Maus (Verdünnung: 1:200), die Kernfärbung mit DAPI (SlowFade Gold) erfolgt.

Damit legen die bisherigen Versuchsergebnisse zusammen mit den Massenspektrometriedaten die Vermutung nahe, dass CARP nicht nur mit dem Zytoskelett assoziiert, sondern insbesondere in enger Verbindung mit der  $\beta$ -Isoform des Aktinzytoseletts in migrierenden Zellen stehen könnte.

## 3.3 CARP in migrierenden Endothelzellen

Bisher wurde gezeigt, dass mit Hilfe der TAP-Aufreinigung und der anschließenden massenspektrometrischen Analyse mögliche Interaktions-partner von CARP in HEK293T-Zellen identifiziert werden konnten. Während die Interaktion mit  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin nicht verifiziert werden konnte, ließ sich die CARP-Interaktion mit  $\beta$ -Aktin durch immunzytochemische Untersuchungen bestätigen. Dabei zeigte CARP eine dynamische intrazelluläre Translokation ins Zytoplasma während der Zelladhäsion und –migration, indem es mit  $\beta$ -Aktin an den Lamellipodien der motilen HEK293T-Zellen assoziierte.

Für die genaue Untersuchung des Zusammenhangs zwischen CARP und  $\beta$ -Aktin bei der Zellmigration wurden Primärkulturen humaner Endothelzellen aus der Nabelschnurvene (HUVEC-Zellen) herangezogen. CARP wurde bereits im Endothel gefunden, wo es während der Wundheilung heraufreguliert wurde.

#### 3 Ergebnisse und Auswertung

Ebenso wurde berichtet, dass eine CARP-Überexpression in HUVEC-Zellen zu einem verbesserten Überleben und einer schnelleren Migration im Vergleich zu Wildtypzellen führte (Shi, et al. 2005). Aufgrund dieser Befunde sollte die Rolle von CARP bei der HUVEC-Zellmigration untersucht werden, wobei der Zusammenhang zur Interaktion mit  $\beta$ -Aktin ebenfalls analysiert werden sollte.

## 3.3.1 Intrazelluläre CARP-Lokalisation in migrierenden Endothelzellen

Primärkulturen von HUVEC-Zellen wurden durch lentivirale Transfektion mit pGJ3-CARP-C-Puro stabil transfiziert. Anschließend wurden die CARP-exprimierenden Zellen durch eine Puromycin-Behandlung selektioniert. Als Kontrolle dienten Zellen der gleichen Passage, die mit einem Kontrollvektor transfiziert wurden, der nur die Puromycin-Resistenz trug. Insgesamt wurden fünf verschiedene Transfektionen durchgeführt. Die Expressionsanalyse mittels Western-Blot ergab ein vergleichbares Expressionsniveau des getaggten CARP, da jeweils  $100~\mu g$  des Gesamtzellextrakts im Polyacrylamidgel aufgetrennt wurden (Abbildung 3-48).

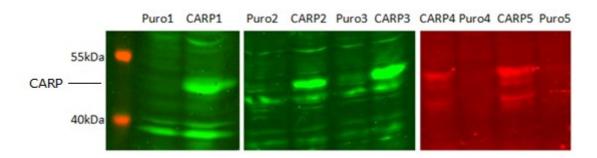


Abbildung 3–53 CARP Expressionskontrolle von CARP-TAP-Tag exprimierenden HUVEC-Primärzellen, die durch lentivirale Transfektion hergestellt wurden. **1.Antikörper:** rabbit anti-Flag (Verdünnung 1:5000); **2.Antikörper:** AlexaFluor680 bzw. AlexaFluor800 anti-rabbit (Verdünnung 1:10000).

Immunzytochemische Färbungen des getaggten CARP in stabil transfizierten HUVEC-Zellen zeigten eine Lokalisation im Kern und im Zytoplasma (Abbildung 3-49 A und B). Zusätzlich zu dieser dualen Lokalisation trat CARP in migrierenden Zellen am Aktinbogen der Lamellipodien auf. Dort kolokalisierte CARP sowohl mit F-Aktin (B) als auch mit β-Aktin (C).

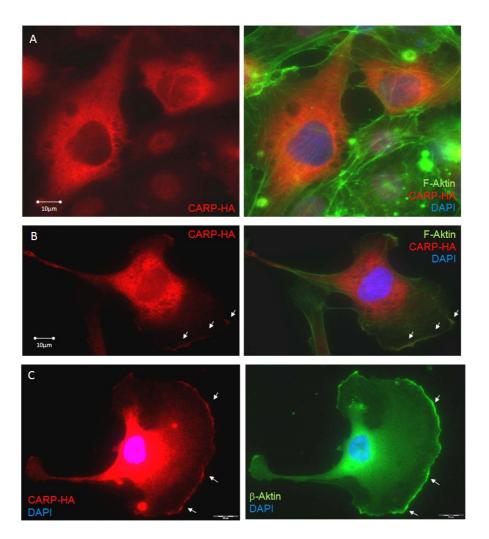
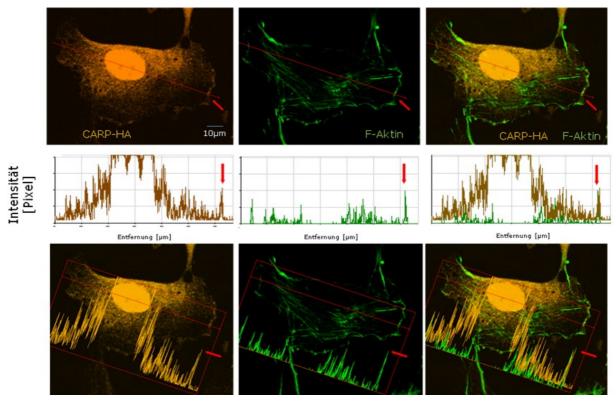


Abbildung 3–54 Kolokalisation von CARP mit Aktin in migrie-renden HUVEC-Zellen. Während CARP eine Kern- und zytoplasma-tische Lokalisation in ruhenden HUVEC-Zellen zeigt (B), er-scheint es zusätz-lich in migrieren-den Zellen am Aktinring der La-mellipodien, wo es mit F-Aktin (A) und mit  $\beta$ -Aktin (C) kolokalisiert ; die CARP-Färbung ist mit dem anti-HA-Antikörper aus der Maus (Verdünnung: 1:200), die F-Aktin-Färbung mit FITC-Phalloidin (Verdünnung: 1:25), die  $\beta$ -Aktin Färbung mit einem anti- $\beta$ -Aktin-Antikörper aus dem Kaninchen (Verdünnung: 1:200), die Kernfärbung mit DAPI (SlowFade Gold) erfolgt.

Um diese Kolokalisation im Detail zu analysieren, wurden die migrierenden Zellen mittels konfokaler Laserscanningmikroskopie (LSM) untersucht (Abbildung 3-50). Um eine objektive Beurteilung der Verteilung von CARP vornehmen zu können, wurde eine Intensitätsmessung entlang der gezeigten Linie durchgeführt. Für CARP ergab sich eine intensive nukleäre und perinukleäre Fluoreszenz, wie die Kofärbung mit F-Aktin gezeigt hat. Die Intensität nahm innerhalb des vermessenen Lamellipodiums ab und stieg dann am Rand der migrierenden Zelle an (siehe Pfeil im Intensitätsprofil).

Das F-Aktin konnte im Zytoplasma und nicht im Kern nachgewiesen werden. Auch hier war am äußeren Rand des Lamellipodiums (der Aktinbogen) eine hohe F-Aktin Intensität nachweisbar. Die Überlagerung der beiden Intensitätsmessungen zeigten dass am Lamellipodium CARP und der Aktinbogen kolokalisierten.



Auffällig ist, dass die diskrete Kolokalisation von CARP und F-Aktin nur am Aktinbogen nachweisbar war. Intrazelluläre F-Aktinfilamente (Stressfaser) zeigten keine prominente Kofärbung.

Abbildung 3–55 Konfokale lasermikroskopische Aufnahmen stabil transfizierter HUVEC-Zellen und quantitative LSM-Analyse zur Kolokalisation von CARP mit F-Aktin am Aktinbogen des Lamellipodiums (Pfeile) Die Intensitätsmessung erfolgte entlang der roten Linie in Richtung der Migration (von links nach rechts). Eine weitere Darstellungsart (unten) zeigt die direkte Zuordnung der Signalintensität zur zellulären Lokalisation; die CARP-Färbung ist mit dem anti-HA-Antikörper (Verdünnung: 1:200), die F-Aktin-Färbung mit FITC-Phalloidin (Verdünnung 1:25) erfolgt.

Um zu überprüfen, ob dieser Unterschied auf die heterogene Verteilung spezifischer Aktin-Isoformen in Stressfasern und dem Aktinbogen der Lamellipodien zurückzuführen war, wurden entsprechende Untersuchungen mit  $\beta$ -Aktin spezifischen Antikörpern durchgeführt. Die Abbildung 3-52 zeigt, dass der  $\beta$ -Aktin Antikörper ebenso wie das Phalloidin den Aktinring der Lamellipodien darstellte. Allerdings wurde durch diesen Antikörper keine intrazellulären

#### 3 Ergebnisse und Auswertung

Stressfaser angefärbt. Auch in diesem Fall zeigte sich ein distinkter Anstieg der CARP Expression am Aktinbogen des Lamellipodiums.

Es soll an dieser Stelle darauf hingewiesen werden, dass die Kolokalisation von CARP und  $\beta$ -Aktin spezifisch an der Zellfront des Lamellipodiums auftritt, nicht aber am "hinteren" Ende der Zelle nachgewiesen werden kann.

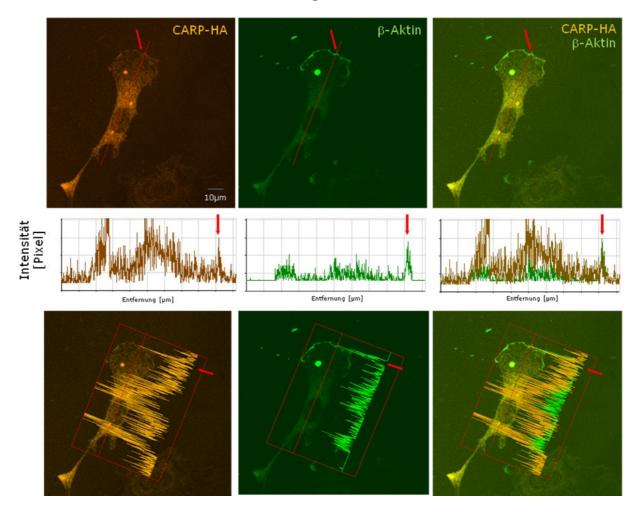
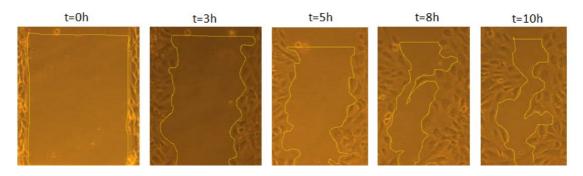


Abbildung 3–56 Konfokale lasermikroskopische Aufnahmen stabil transfizierter HUVEC-Zellen und quantitative LSM-Analyse zur Kolokalisation von CARP mit  $\beta$ -Aktin am Aktinbogen des Lamellipodiums (Pfeile). Die Intensitätsmessung erfolgte entlang der roten Linie in Richtung der Migration (von unten nach oben). Eine weitere Darstellungsart (unten) zeigt die direkte Zuordnung der Signalintensität zur zellulären Lokalisation; die CARP-Färbung ist mit dem anti-HA-Antikörper aus der Maus (Verdünnung: 1:200), die  $\beta$ -Aktin Färbung mit einem anti- $\beta$ -Aktin-Antikörper aus dem Kaninchen (Verdünnung 1:200), die Kernfärbung mit DAPI (SlowFade Gold) erfolgt.

### 3.3.2 Analyse der Zellmigration im Migrationsassays

Der Effekt der CARP-Überexpression auf der Zellmigration wurde in fünf HUVEC-Präparationen (Abbildung 3-52) durch einen funktionellen Test analysiert. Dazu wurde die Einwanderung einer Zellfront in eine zellfreie Region über einen Zeitraum von 10h beobachtet und nach der folgenden Formel quantitativ erfasst:

$$Laufstrecke\ einer\ Zellfront\ = \frac{Ausgangsfläche-Restfläche}{2\times H\"{o}he\ des\ ausgewerteten\ Wundenausschnitts}$$



**Abbildung 3–57 Ablauf des Migrationsassays:** Exemplarisch dargestellt ist die zuwachsende "Wunde" durch die Migration von HUVEC-Zellen der Puromycinselektionierten Kontrollgruppe gemessen an der Rest-Freifläche mit Hilfe von ImageJ.

Im Vergleich zu den Puromycin-selektionierten Kontroll-HUVEC-Zellen zeigten die CARP exprimierenden Zellen (n=5) keinen Unterschied in ihrem Migrationsverhalten (Abbildung 3-53).

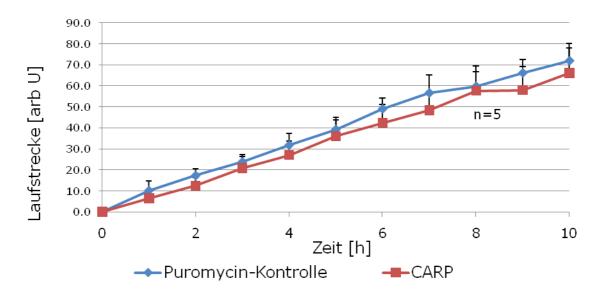


Abbildung 3-58 Analyse des zeitabhängigen Migrationsverhaltens von CARP exprimierenden HUVEC-Zellen im Vergleich zu den Puromycin-selektionierten Kontrollzellen (pro Gruppe n=5)

## 3.3.3 Analyse der Angiogenese mit Hilfe des *Tube-Formation*-Fibrinssays

Zusätzlich zum Migrationsverhalten wurde auch der Einfluss der CARP-Überexpression auf die Bildung von kapillären Strukturen in einem *in vitro* "Angiogenesemodell" untersucht (Nehls und Drenckhahn 1995). Dazu wurden CARP exprimierende HUVEC-Zellen sowie Kontrollvektor-transifzierte HUVEC-Zellen auf Mikrocarrier kultiviert und in ein Fibringel eingebettet. Die aussprossenden Gefäße wurden ausgezählt und vermessen. Als Parameter wurde die Länge, die Zahl der Gefäße und die Zahl der Verzweigungen, die nach 10 Tagen entstanden sind, quantifiziert.

Die Abbildung 3-54 zeigt eine Phasenkontrastaufnahme eines Mikrocarriers, aus dem vier Gefäße unterschiedlicher Längen entstanden sind (A). Eine DAPI-Kernfärbung zeigte die Zellen entlang des Lumens eines neu entstandenen Gefäßes. Eine Verzweigung des Gefäßes ist ebenfalls mehrmals gefunden worden (B). Immunzytochemische Detektion des getaggten CARP mit dem HA-Antikörper zeigte CARP-exprimierende Zellen sowohl auf der Mikrocarrieroberfläche als auch im neu entstandenen Gefäß (C).

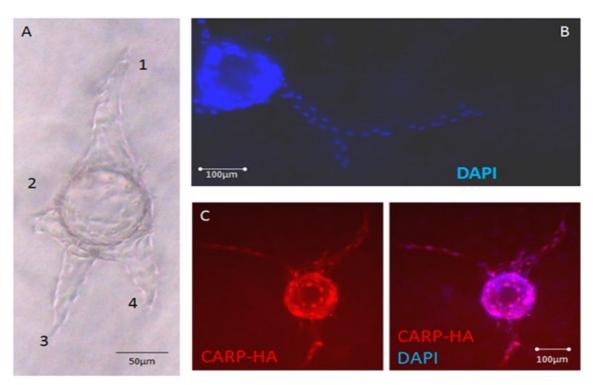


Abbildung 3–59 Phasenkontrastaufnahmen und immunzytochemische Detektion des überexprimierten CARP in den neu gebildeten Gefäßen. Die CARP-Färbung ist mit dem anti-HA-Antikörper aus der Maus (Verdünnung: 1:200), die Kernfärbung mit DAPI (SlowFade Gold) erfolgt.

#### 3 Ergebnisse und Auswertung

Im Vergleich zu den Puromycin-selektionierten Kontroll-HUVEC-Zellen bildeten die CARP exprimierenden Zellen (n=3) nach 10 Tagen eine vergleichbare Anzahl von Gefäßen. Weder Unterschiede in der Länge noch im Verzweigungsgrad der neugebildeten Gefäße konnten festgestellt werden (Abbildung 3-55).

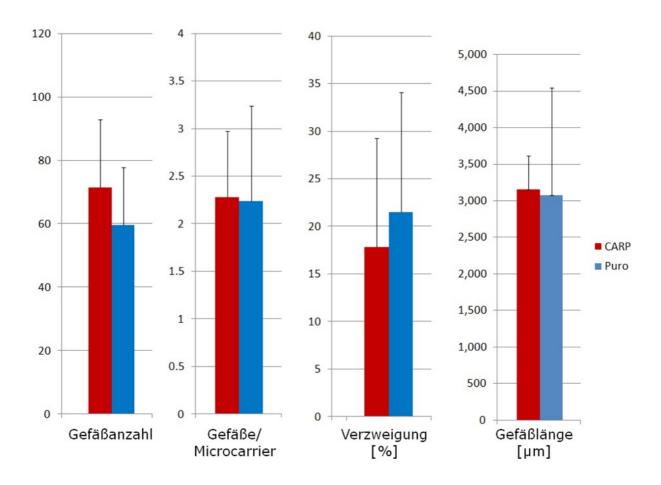


Abbildung 3–60 Analyse des Tube-Formation-Verhaltens von CARP-TAP-Tag exprimierenden HUVEC-Zellen im Vergleich zu den Puromycin-selektionierten Kontrollzellen (pro Gruppe n=3). Dargestellt sind die Anzahl und Länge der entstandenen Gefäße, die Anzahl der entstandenen Gefäße pro *Microcarrier* und der Anteil entstandener Gefäßverzweigungen.

#### 4 Diskussion

Mit der vollständigen Sequenzierung des humanen Genoms wurde deutlich, dass Zellkomplexe Organismen mit ihrer Vielzahl spezialisierter und Gewebeverbände lediglich auf die Information von ca. 25.000 im Genom gespeicherten Genen zurückgreifen können. Man geht aber davon aus, dass aus dieser Information über eine Million Proteine generiert werden können (Alberts 1998). Durch posttranskriptionelle Prozesse wie alternatives Splicing bzw. Modifikationen wie Phosphorylierung, posttranslationale Acetylierung, Arginylierung, Sumoylierung etc. gewinnt das Proteom erheblich an Komplexität. Diese wird weiterhin durch die Assemblierung mehrerer Proteine Proteinkomplexen, die ihre Funktion wiederum sowohl zeit- als auch ortsspezifisch ausführen, enorm gesteigert (Bauer und Kuster 2003). Diesen Erkenntnissen tragen viele Forschungsrichtungen des post-genomischen Zeitalters Rechnung. Nach der Entschlüsselung des humanen Genoms lautet die aktuelle Herausforderung der molekularbiologischen Forschung, Komplexität des Proteoms, Interaktoms bis hin zum Toponom zu analysieren, und in Anlehnung an den seit langem geprägten Begriff "Genomics" heißen diese Forschungsrichtungen Proteomics, Interactomics und Toponimcs.

Die Bildung von Proteinkomplexen als funktionelle Einheiten der Zelle ist keine neue Erkenntnis. Prominente, seit langem bekannte Beispiele solcher Proteinkomplexe sind das Ribosom, das Spliceosom oder der Kern-porenkomplex. Relativ neu hingegen ist die Erkenntnis, dass nahezu alle Proteine über individuelle und unterschiedlich stabile Komplexbildungen und Interaktionen mit anderen Proteinen ihre Rolle in der Zelle erfüllen (Gingras, et al. 2007). Diese Erkenntnis beruht vor allem auf den wegweisenden Arbeiten in der Hefe Saccharomyces cerevisiae, in der mittels systematischer Isolierung und massenspektrometrischer Analyse von Proteinkomplexen ein weit-reichendes Netzwerk von Proteininteraktionen nachgewiesen wurde (Gavin, et al. 2006). Damit eröffnet sich die Möglichkeit, die Proteinfunktion eines bisher nicht charakterisierten Proteins über die Identifizierung seiner Interaktions-partner, deren Funktionen bereits bekannt sind, aufzuklären (Gingras, et al. 2005).

Methodisch haben bisher Proteininteraktionsstudien vom *Yeast-Two-Hybrid-*System sowie von Koimmunpräzipitationen Gebrauch gemacht. Während die erste Methode mit einer Fehlerrate von 45-80% und die zweite mit einer Fehlerrate von 50% behaftet ist, wird für die Tandem-Affinitätsreinigung (TAP), das Verfahren, das für die Interaktionsstudien in der Bäckerhefe genutzt wurde, eine Fehlerrate von lediglich 15% festgestellt (Dziembowski und Séraphin 2004). In Kombination mit der mittlerweile weiterentwickelten, hochsensitiven Massenspektrometrie (MS) stellt die TAP-MS daher die Methode der Wahl dar.

In der vorliegenden Arbeit sollte die Funktion des kardialen Ankyrin-Repeat-Proteins, CARP, anhand der Identifizierung seiner Interaktionspartner in Säugerzellen untersucht werden. Methodisch sollte dies über die Methodenkombination TAP-MS verwirklicht werden.

Insgesamt lassen sich die Ergebnisse dieser Arbeit wie folgt zusammenfassen:

- 1. Ein optimiertes TAP-Aufreinigungsprotokoll wurde für die Aufreinigung von Proteinkomplexen aus Säugerzellen etabliert (3.1).
- 2. Die Aufreinigung von CARP-Proteinkomplexen aus sowohl transient als auch stabil transfizierten HEK293T-Zellen und die anschließende Analyse der gereinigten Proteinkomplexe mittels der Massenspektrometrie ergab eine Reihe von möglichen CARP-Interaktionspartnern, von denen drei Proteine zur weiteren Verifikation näher analysiert wurden (3.2.1).
- 3. Die Interaktion mit  $\alpha$  und  $\beta$ -Tubulin erwies sich durch immunzytochemische Untersuchungen als falsch positiv (3.2.2).
- 4. Die Interaktion mit dem zytoplasmatischen Aktin ließ sich durch immunzytochemische Analysen in HEK293T-Zellen bestätigen. Dabei stellte sich heraus, dass es sich bei der CARP-Interaktion um die  $\beta$ -Aktinisoform handelt (3.2.3).
- 5. CARP zeigte eine Translokation ins Zytoplasma während der Zellteilung und in migrierenden HEK293T-Zellen, wobei sich CARP zusammen mit  $\beta$ -Aktin in den Lamellipodien kolokalisieren ließ (3.2.4).
- 6. Auch in Endothelzellen (HUVEC) wurde CARP mit  $\beta$ -Aktin am Aktinbogen des Lamellipodiums in migrierenden Zellen lokalisiert (3.3.1).
- 7. Die Überexpression von CARP in HUVEC-Zellen induzierte im Vergleich zu den Kontrollzellen keine Unterschiede im Migrationsverhalten oder der Gefäßausbildung (Angiogenese) (3.3.2 und 3.3.3).

Am Anfang der Arbeit wurde die in der Hefe (*S. cerevisiae*) erfolgreich etablierte TAP-MS für Proteinaufreinigungen von Säugerzellrohextrakten optimiert. Dabei stellte sich heraus, dass die Wahl eines für das Zielprotein passenden TAP-*Tags* optimierungsbedürftig ist. Somit bestand der erste Teil dieser Arbeit (siehe 3.1) in der Generation eines TAP-*Tags*, das eine gute und effiziente Aufreiniugng der CARP-Proteinkomplexe aus Säugerzellen ermö-glicht.

Ausgehend vom Original-TAP-*Tag* (Calmodulin-bindendes Protein – *Tobacco Etch Virus* Protease-Schnittstelle – ZZ-Domöne des Protein A / [CBP-TEV-ZZ]) (Puig, et al. 2001) wurde zunächst die CBP-Domäne durch einen Flag-*Tag* ersetzt, da endogene Proteine in Abhängigkeit von Calciumionen mit CBP interagieren könnten (Head 1992).

In einem weiteren Optimierungsschritt wurde ebenfalls die ZZ-Domäne von Protein A durch einen StrepII-*Tag* ersetzt (Skerra und Schmidt 2000). Dieser Schritt war erforderlich, da meine Analysen darauf hindeuteten, dass die ZZ-Domäne durch eigene Komplexbildung die Bindung der CARP-Komplexe an die IgG-Affinitätssäule stark beeinträchtige. Außerdem war aufgrund dieser Befunde zu befürchten, dass falsch positive Bindungspartner wegen der Interaktion mit der ZZ-Domäne identifiziert werden würden.

Nicht nur schlechte Bindungsverhältnisse und falsch positive Ergebnisse sondern Proteinverluste eine weitere Herausforderung auch waren der Optimierungsarbeit. Proteolyse während der TEV-Behandlung und die unvollständige Freisetzung des geschnittenen Proteins von der IgG-Affinitätssäule erwiesen sich als weitere Nachteile des Original-TAP-Tags, die auch von anderen Arbeitsgruppen berichtet wurden (Witte, et al. 2004). Außerdem wurde berichtet, dass die Effizienz der TEV-Spaltung von der Struktur des Tags und insbesondere vo den C-terminal liegenden Proteinsequenzen – in unserem Fall der ZZ-Domäne - abhängig ist (Terpe 2003). Dieses Problem wurde nicht nur durch die Entfernung der Protein A-Domäne, sondern durch den Verzicht auf das Schneiden mit der TEV-Protease zur Elution gelöst. Die Elution der Anti-Flag-Affinitätssäule mit dem synthetischen Triple Flag-Peptid ermöglichte eine zufriedenstellende Ausbeute.

Insgesamt führte die Optimierungsarbeit zur Substitution des Original-TAP-*Tags* (CBP-TEV-ZZ) mit dem optimierten TAP-*Tag* (1x Flag-TEV-StrepII). Diese für unsere präparativen Bedürfnisse optimierte *Tag*-Kombination ermöglichte die

schnelle und effiziente Aufreinigung von CARP aus Rohextrakten über eine Anti-Flag-Affinitätssäule gefolgt von einer StrepTactin-Affinitätssäule.

Die Durchführung des optimierten TAP-Protokolls zeigte bei der Aufreinigung von CARP-Proteinkomplexen aus HEK293T-Zellen die reproduzierbare Ko-Elution von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin, vom zytoplasmatischen Aktin, der ATP-Synthase, dem Hitzeschockprotein 70 (Hsp70) und dem Elongationsfaktor 1a (EF1 $\alpha$ ).

Angesichts des bekannten Problems, dass im Rahmen von Interaktionsstudien immer wieder auch falsch positive Proteine identifiziert werden, ist eine weitere Bestätigung der identifizierten Bindungspartner eine wesentliche Aufgabe. Insbesondere ist es inzwischen bekannt, dass nicht selten die stark exprimierten Proteine in der TAP-MS als falsch positiv identifiziert werden (Gingras, et al. 2007).

Ein weiteres technisches Problem kann bei der Überexpression des getaggten Proteins auftreten. Massive Expression des getaggten Proteins auf supraphysiologischem Niveau kann einerseits eine Komplexbildung mit nichtphysiologischen Bindungspartnern forcieren und andererseits Interaktionspartner in den Hintergrund drücken, insbesondere wenn diese in einem niedrigen stöchiometrischen Verhältnis mit dem getaggten Protein wechselwirken. Die zweite Möglichkeit führt zu falsch negativen Ergebnissen der TAP-MS.

Um diesen Überlegungen gerecht zu werden, wurde angesichts der Identifizierung von  $\beta$ -Aktin bzw. Tubulinen der Verfizierung der Interaktionen große Bedeutung beigemessen. Um das Problem der Überexpression zu eliminieren, wurde die TAP nicht nur von transient transfizierten Zellen durchgeführt, sondern auch von stabil transfizierten Zellen, die im Vergleich zu den transient transfizierten Zellen ein viel geringeres Expressionsniveau aufwiesen. Beide Ansätze führten aber prinzipiell zu denselben Ergebnissen. Für den Nachweis einer spezifischen Interaktion wurden außerdem noch zusätzliche Methoden (Kopräzipitation, Kolokalisation) eingesetzt.

Tubuline stellen die Hauptkomponenten des Zytoskeletts dar. Die Interaktion mit CARP konnte mittels Tubulinpräzipitationsexperimenten (Sahyoun, et a. 1982) nicht bestätigt werden. Auch immunzytochemische Färbung von sowohl HEK293T-Zellen als auch HUVEC-Zellen zeigten keine eindeutige Kolokalisation von CARP mit den Microtubuli. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Tubulin

bei der TAP von CARP koeluiert werden kann, allerdings scheint CARP nicht mit den Tubulinen präzipitierbar zu sein. Tubulin könnte aufgrund seiner hohen Expression in der Zelle ein falsch positives Ergebnis der TAP sein (Gingras, et al. 2007). Diese Interpretation wird auch dadurch unterstützt, dass die Tubuline in anderen TAP Experimenten (AKT1, AKT2, GSK3β; K. Bottermann und M. Gerlach, persönliche Mitteilung) mit dem in dieser Arbeit ent-wickelten TAP-Tag immer wieder als möglicher Kandidat in der MS identifiziert wird. Ob die Koelution über zwei Affinitätssäulen das Ergebnis einer Bindung an *Tag*-Sequenzen darstellt oder ob das hohe Expressionsniveau der Tubuline ausreicht, um eine detektierbare Kontamination der eluierten Probe zu gewährleisten, ist bisher nicht untersucht.

Im Gegensatz zum Tubulin konnte im Rahmen dieser Arbeit zum ersten Mal eine Interaktion zwischen CARP und dem zytoplasmatischen β-Aktin mittels TAP-MS festgestellt werden. Aktine bilden eine Multigen-Familie, deren Isoformen über die Evolution hoch konserviert sind und durch struktur-verwandte Gene kodiert werden. Der hohe Grad an Sequenzidentität der Aktinisoformen erschwerte die genaue Zuordnung zu einer der Aktin-Isoformen. In der MS wurden nur solche Peptide identifiziert, die den Kreis der möglichen Aktin-Isoformen auf die β- oder  $\gamma$ -Isoform beschränkten. Allerdings wurde das N-terminale Peptid, das die Isoform-Spezifität festlegt, nicht nachgewiesen. Es ist bekannt, insbesondere das N-terminale Ende der Aktine vielfältig posttranslational modifiziert wird (Kashina 2006), so dass dies die Ursache für das Fehlen des entsprechenden Peptids sein könnte. Mit Hilfe spezifischer Antikörper gelang aber der Nachweis, dass das  $\beta$ -Aktin, nicht aber die  $\gamma$ -Isoform mit CARP assoziiert war. Dies wurde in weiterführenden Unter-suchungen durch die immunzytochemische Kolokalisation von CARP und β-Aktin bestätigt. Dabei wurde eine überraschende Beobachtung in den HEK293-Zellen gemacht, die eine starke nukleäre β-Aktin-Subpopulation gezeigt haben. Weitere Analysen zeigten, dass weder die virale Transfektion noch die CARP-Überexpression der Grund für die starke nukleäre β-Aktin Lokalisation waren. Dies scheint eine Eigenschaft der kultivierten HEK293-Zellen zu sein, über die in der Literatur nichts Weiteres bekannt ist. Interessanterweise konnte CARP in den Lamellipodien von sich anheftenden HEK293T-Zellen und migrierenden humanen Endothelzellen aus der Nabelschnur (HUVEC) nachgewiesen werden. Hier wurde eine spezifische Lokalisation von CARP am Aktinbogen der Lamellipodien gezeigt.

Aus (G-Aktin) globulären Aktin-Monomeren können unter hoher Salzkonzentration und ATP-Hydrolyse Filamente (F-Aktin) gebildet werden. Viele Studien zeigen, dass die sechs Säugerzell-Isoformen von Aktin trotz ihrer 90%igen Identität unterschiedliche Funktionen ausüben (Hermann 1993). Dabei sind die  $\beta$ - und  $\gamma$ -Isoformen basischer als die  $\alpha$ -Isoform, die vor allem in Muskelzellen exprimiert wird. Eine posttranslationale Arginylierung von β-Aktin führt zur lockeren Filamentbildung aufgrund der positiven Ladung des Arginin-Restes. Damit unterscheiden sich die  $\beta$ -Aktin-Filamente von den kompakteren  $\gamma$ -Aktin Filamenten, die mehr wie Stressfasern aussehen (Kashina 2006). β-Aktin stellt die bevorzugte Isoform von Aktin in den Lamellipodien migrierender Zellen dar (Hoock, et al. 1991). Außerdem wurde gezeigt, dass die β-Aktin mRNA sich um das 2-3fache in migrierenden Zellen erhöht und nach der Bildung des Monolayers wieder zurückgeht.

Die Spezifität der subzellulären Kolokalisation von  $\beta$ -Aktin und CARP wurde dadurch unterstrichen, dass CARP und  $\beta$ -Aktin spezifisch am Aktinbogen der Lamellipodien, dem "Vorderende" migrierender Endothelzellen auftraten und nicht am entgegengesetzten "Hinterende" nachzuweisen waren. Darüber hinaus assoziierte CARP nicht mit Stressfasern, die zwar durch Phalloidin als F-Aktin detektiert wurden, nicht aber durch  $\beta$ -Aktin-spezifische Antikörper.

Wie oben erwähnt kommt dem  $\beta$ -Aktin eine wichtige Funktion bei der Zellmigration zu. In ruhenden Zellen bedeckt das  $\beta$  actin capping protein 73 -  $\beta$ CAP73 – das Ende der  $\beta$ -Aktin-Filamente, an dem die Polymerisation in Migrationsrichtung stattfindet, und hemmt dadurch die  $\beta$ -Aktin-Polymerisation. Daher ist dieses Protein in ruhenden Zellen überexprimiert (Welch und Herman 2002). Ein weiterer Bindungspartner der  $\beta$ -Aktin Filamente ist Ezrin, das eine Brücke zwischen der Membran und einzelnen  $\beta$ -Aktin Filamenten herstellt (Algrain, et al. 1993).

Die Untersuchungen dieser Arbeit deuten nun darauf hin, dass die Familie der  $\beta$ -Aktin-bindenden Proteine um CARP erweitert werden kann. Besonders auffällig ist die Umverteilung des  $\beta$ -Aktins und des CARP in migrierenden Zellen. Das folgende Modell (Abbildung 4-1) umfasst bisherige Kenntnisse über das  $\beta$ -Aktin-Zytoskelett in ruhenden und migrierenden Zellen und schlägt eine Ergänzung dieser Kenntnisse durch die hier in dieser Arbeit identifizierten Interaktionen von CARP vor.

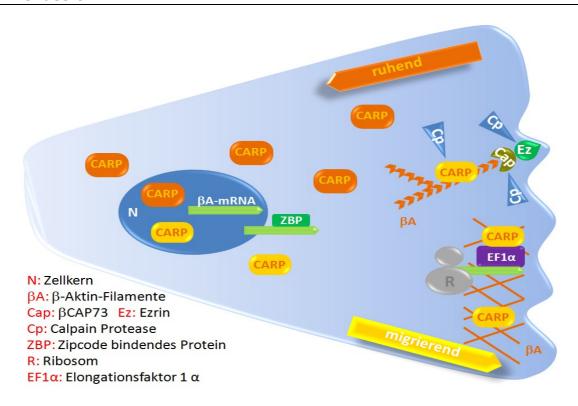


Abbildung 4-61 Modellvorschlag für die  $\beta$ -Aktin assoziierte CARP-Translokation zu den Lamellipodien von migrierenden Zellen.

Abbildung 4-1 zeigt schematisch den Übergang von einer ruhenden (linke Hälfte) zu einer migrierenden Endothelzelle (rechte Zellhälfte). An den Lamellipodien bildet sich der Aktinbogen aus, der im Wesentlichen von β-Aktin aufgebaut wird. Die Polymerisation der β-Aktinfilamente wird durch den "β-Aktin-capping"-Komplex kontrolliert. Dieser besteht aus βCAP73 und Ezrin. Durch TAP-MS und immunzytochemische Untersuchungen wurde in dieser Arbeit eine Kolokalisation von CARP mit β-Aktin im Lamellipodium nachgewiesen. Dies ist insofern interessant, da βCAP73 mit CARP wesentliche Eigenschaften teilt. Einerseits besitzt βCAP73 sechs Ankyrin-Repeats. Andererseits wird βCAP73 von Calpain-Proteasen reguliert. So führte eine Calpain-Inhibierung zu einem erhöhten βCAP73-Niveau und damit zur Hemmung der Zellmotilität (Potter, et al. 1998). Auch Ezrin wird von Calpain-Proteasen reguliert. Somit fördern Calpain-Proteasen die Aktin-Polymerisation, indem sie die Filament-stabilisierenden Proteine, βCAP73 und Ezrin, schneiden. Interessanterweise wird CARP über die PEST-Sequenz ebenfalls durch Calpain proteolytisch gespalten. So konnten Cinquetti et al. (2008) nachweisen, dass eine spezifische Punktmutation in CARP zu einer Akkumulation von CARP infolge reduzierter Calpain-abhängiger Degradation führte. Welche Rolle CARP in diesem Zusammenhang spielt, ist bisher unklar.

Trotz der Gemeinsamkeiten mit dem  $\beta$ CAP73 Protein scheint CARP gegenläufig reguliert zu sein, da es im Zuge der Migration verstärkt an den Lamellipodien akkumuliert.

In migrierenden Zellen steigt die Expression von  $\beta$ -Aktin um den Faktor 2-3 an (Hoock, et al. 1991). Interessanterweise wird die  $\beta$ -Aktin mRNA zu den Lamellipodien transportiert und hier lokal an Ribosomen translatiert (Yao, et al. 2006). Abbildung 4-1 zeigt, wie die intrazelluläre Lokalisation von  $\beta$ -Aktin erfolgt. Über eine Zipcode Region in der 3'UTR (54bp) der  $\beta$ -Aktin mRNA (Kislauskis, Zhu und Singer 1994) wird die  $\beta$ -Aktin mRNA zum Lamellipodium transloziert. An der lokalen  $\beta$ -Aktin Synthese in den Lamellipodien scheint der Elongationsfaktor 1a (EF1a) beteiligt zu sein (Liu, et al. 2002). Durch seine Affinität zur  $\beta$ -Aktin mRNA und zum Ende des  $\beta$ -Aktin Filamentes sorgt EF1a für die lokale und spezifische Synthese von  $\beta$ -Aktin, die für die Aktin-Polymerisation erforderlich ist. In diesem Zusammenhang ist es erwähnenswert, dass auch EF1a mit Hilfe der TAP-Aufreinigung in dieser Arbeit zusammen mit CARP aufgereinigt wurde. Diese Interaktion, die allerdings noch validiert werden muss, würde bedeuten, dass CARP nicht nur mit den  $\beta$ -Aktin Filamenten assoziiert, sondern eventuell eine Rolle bei der spezifischen  $\beta$ -Aktin Synthese an den Lamellipodien spielen könnte.

Außer dem  $\beta$ -Aktin und EF1a wurde das Hitzeschockprotein 70 (Hsp70) in der TAP mit CARP miteluiert. Während manche Hitzeschockproteine ausschließlich in Stresssituationen induziert werden, wie zum Beispiel bei der Überexpression eines rekombinanten Proteins (Puig, et al. 2001), existieren auch andere konstitutive Hitzeschockproteine, die unter normlen Wachstumsbedingungen in der Zelle vorhanden sind. Manche Hitzeschockproteine zeigen eine posttranslationale Targeting-Funktion von anderen Proteinen zu den verschiedenen Zellorganellen. Eine bekannte Kern-Zytoplasma-Transport-Funktion wurde für Hsp70 beschrieben (Pratt und Toft 1997) In diesem Sinne könnte CARP am Hsp70 während seiner Translokation zwischen dem Kern und dem Zytoplasma assoziiert sein. Auch in diesem Fall steht die Validierung der Interaktion bzw. die Erforschung der funktionellen Bedeutung dieser Interaktion noch aus.

Die ATP-Synthase wurde zusäztlich zu  $\beta$ -Aktin und EF1a in der TAP mit CARP aufgereinigt. ATP-Synthasen sind membranassoziierte Enzymkomplexe, die sowohl für die ATP-Synthese als auch –Hydrolyse zuständig sind. Da im Verlauf dieser Arbeit ATP-Synthasen auch in weiteren TAP Ansätzen (AKT/ GSK3 $\beta$ ) mit

aufgereinigt wurden, scheint es sich hier ähnlich wie bei den Tubulinen um eine unspezifische Aufreinigung dieser Proteine zu handeln, so dass die Bedeutung der ATP Synthasen im Zusammenhang mit CARP nicht weiter erforscht wurde.

Alle oben genannten Befunde weisen auf eine  $\beta$ -Aktin-stabilisierende und migrationsregulierende Funktion von CARP hin. Um dieser Frage nachzugehen wurden die funktionellen Konsequenzen der CARP Expression in HUVEC-Zellen mittels eines Migrationsassays sowie die Bedeutung für die Angiogenese durch einen *Tube-Formation-Assay* analysiert. Allerdings zeigte sich kein Effekt der CARP Überexpression in stabil transfizierten HUVEC-Zellen auf beide untersuchten Parameter. Obwohl die Migrationsgeschwindigkeit der CARP überexprimierenden Zellen leicht unter der Geschwindigkeit der Kontrollzellen lag, konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen erfasst werden.

Bisher zeigte eine Arbeit in einem in vivo Test für Wundheilung, dass die Transfektion des sich bildenden Granulationsgewebes mit Adenoviren, die die CARP-Expression vermittelten, einen pro-angiogenetischen Effekt aufwies (Shi, et al. 2005). Diese Autoren konnten einen dreifachen Anstieg der Vasku-larisierung Bereich der Hautverletzung bei CARP Expression nachweisen. Mechanismus, über den CARP die Steigerung der Vaskularisierung auslöste, ist bisher unverstanden. Dabei wurden von den Autoren sowohl direkte Effekte auf die Transkription in Endothelzellen als auch die Freisetzung parakriner Faktoren durch andere Zellen des Granulationsgewebes, die ebenfalls durch die Adenoviren transfiziert wurden, diskutiert. Die Befunde in dieser Arbeit würden eher die zweite Option favorisieren, da in den in vitro Modellen zur Endothelzellmigration bzw. der Angiogenese keine Veränderung durch eine CARP Expression feststellbar war. Es ist jedoch auch denkbar, dass CARP in Verbindung mit anderen Wachstumsfaktoren wirken könnte, die in den hier durchgeführten Tests fehlten, die aber *in vivo* die Vaskularisierung des Granulationsgewebes beeinflussen.

Unabhängig von dem Ausgang der bisher durchgeführten *in vitro* Untersuchungen, eröffnet die spezifische Kolokalisation von CARP mit dem  $\beta$ -Aktin in migrierenden Endothelzellen weitreichende Optionen, die Funktion von CARP gezielt zu untersuchen.

#### 4 Diskussion

Interessanterweise wurde kürzlich bei Patienten mit Nephritis eine verstärkte CARP Expression in Podozyten nachgewiesen, die teilweise mit einer verstärkten Proteinurie einherging (Matsuura, et al. 2007). Da Proteinurie mit einer Veränderung der glomerulären Schlitzmembran einhergeht, wurde vermutet, dass CARP eine Rolle bei der Proteinurie spielen könnte. Aufgrund der hier gewonnenen Erkenntnisse wäre es interessant, die Organisation des Aktin-Gerüsts der Podozyten und die genaue Lokalisation von CARP in diesen Zellen zu untersuchen.

Eine veränderte  $\beta$ -Aktin Verteilung wurde in humanen Nierenzellkarzinomen festgestellt (Sarkar, et al. 2002). Diese Aktin-Disorganisation konnte mit der Heraufregulation eines Nieren-Ankyrin-Repeat-Proteins – Kank – in Verbindung gesetzt werden, das tumorsuppressiv wirkte. CARP wird auch bei der axonalen Neuroregeneration heraufreguliert, die eine große Zytoskelett-Reorganisation erfordert (Stam, et al. 2007). Eine Modulation des Aktin-Gerüsts durch CARP wäre auch in diesem Fall zu prüfen.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass CARP mit dem  $\beta$ -Aktin des Zytoskeletts, vor allem in migrierenden Zellen, assoziiert zu sein scheint. Zusammen mit Befunden aus anderen Zellsystemen deutet dieses Ergebnis darauf hin, dass CARP insbesondere bei Zellprozessen eine Rolle spielt, die eine Aktin-Reorganisation beinhalten.

## 5 Zusammenfassung

Die Assemblierung von Proteinen zu Komplexen stellt ein wesentliches Prinzip Signaltransduktion dar. Daher stellt die Identifizierung Proteininteraktionen einen wesentlichen Schlüssel zum Verständnis Signaltransduktionsprozessen dar. Beflügelt wurde die systematische Analyse des Interaktoms durch die Tandemaffinitätsreinigung (TAP), die eine Isolierung von Bedingungen Proteinkomplexen unter nativen und die Identifizierung der einzelnen Komponenten mittels Massenspektrometrie (MS) erlaubt.

Im Mittelpunkt dieser Arbeit steht das kardiale Ankyrin-Repeat-Protein, CARP, das eine Rolle bei der Mechanotransduktion im Herzen und bei der Wundheilung spielen soll. Seine genaue Funktion ist bisher allerdings unverstanden.

Zur Untersuchung der unbekannten Funktion von CARP wurde die TAP/MS-Methode herangezogen, die die Aufreinigung und Identifizierung der CARP Interaktionspartner ermöglichte, um so einen Zugang zur Identifizierung der CARP-Funktion zu bekommen.

Insgesamt lassen sich die Ergebnisse dieser Arbeit wie folgt zusammenfassen:

- 1. Ein optimiertes TAP-Tag und Reinigungsprotokoll wurde für die Aufreinigung von CARP-Proteinkomplexen aus Säugerzellen etabliert.
- 2. Die Aufreinigung von CARP-Proteinkomplexen aus sowohl transient als auch stabil transfizierten HEK293T-Zellen und die anschließende massenspektrometrische Analyse führte zur Identifizierung möglicher Interaktionspartner von CARP, von denen drei zur Verifikation weiter analysiert wurden.
- 3. Die Interaktion mit  $\alpha$  und  $\beta$ -Tubulin erwies sich durch Kopräzipitationen und immunzytochemische Untersuchungen als falsch positiv.
- 4. Analyse der Interaktion mit dem zytoplasmatischen Aktin führte zur Identifizierung von β-Aktin als spezifischem Bindungspartner. Dies wurde durch immunzytochemische Analysen bestätigt.
- 5. CARP zeigte während der Zellteilung und in adhärierenden HEK293T-Zellen eine bevorzugte Translokation vom Kern ins Zytoplasma.
- 6. Auch in Endothelzellen (HUVEC) wurde CARP mit  $\beta$ -Aktin am Aktinbogen des Lamellipodiums migrierender Zellen kolokalisiert.
- 7. Die CARP-Überexpression in HUVEC zeigte keinen Unterschied zu den Kontrollzellen weder im Migrationsverhalten noch in der Angiogenese in vitro.

In dieser Arbeit wird erstmalig eine Interaktion von CARP mit dem Aktin-Zytoskelett nachgewiesen. Dieser Befund eröffnet einen neuen Blick auf die Funktion von CARP, das in Endothelzellen, Podozyten, glatten Gefäßmuskelzellen etc. bisher als Bestandteil einer zellulären Stressantwort gesehen wurde. Da CARP in diesen Zellen bei Prozessen wie Hypertrophie, Wundheilung, Proteinurie, Neointima- Bildung und sogar Tumorentwicklung induziert wird, liegt es nun nahe, den Einfluss von CARP auf die Aktin-Reorganisation zu untersuchen, die bei allen diesen Prozessen eine wesentliche Rolle spielt.

## **6 Summary**

A main principle of cellular signaling pathways is the assembly of proteins in complexes. Thus, the identification of protein interactions is essential for understanding signal transduction processes. The systematic analysis of the interactome was quickened by the tandem affinity purification (TAP), which enables the isolation of protein complexes under native conditions and the subsequent identification of protein complexes via mass spectrometry (MS).

This study deals with the cardiac ankyrin repeat protein, CARP, which is supposed to play a role in the mechanotransduction of the heart and in wound healing processes. Yet, its exact function is still unknown.

For a better understanding of CARP's function, this study aimed to identify its interacting partners using the TAP-MS technology.

In summary, the results of this work were:

- 1. An optimized TAP-Tag and a TAP purification protocol were established to purify CARP protein complexes from mammalian cell lysates.
- 2. HEK293T cells that transiently as well as stably express CARP were analyzed via TAP-MS and three of the copurified proteins ( $\alpha$  and  $\beta$  tubulin,  $\beta/\gamma$  actin) were tested upon the validity of their interaction with CARP.
- 3. The interaction with  $\alpha$  and  $\beta$  tubulin turned out to be false positive as shown by coprecipitation and immunocytochemical analysis.
- 4. The analysis of the interaction with cytoplasmic actin lead to the identification of the  $\beta$  actin isoform as a specific binding partner of CARP. This result was confirmed by immunocytochemistry.
- 5. CARP showed a translocation from the nucleus to the cytoplasm during HEK293T cell division and adhesion.
- 6. Also in HUVEC cells CARP was colocalized with  $\beta$  actin at the actin arch of the lamellipodiae during cell migration.
- 7. Overexpression of CARP showed no difference in the migratory or angiogenetic behaviour of HUVEC cells in vitro when compared to control cells.

In this study a novel interaction between CARP and the actin cytoskeleton is demonstrated. This finding offers a new perspective for understanding the role of CARP which was so far referred to as a part of the cellular stress response in cardiomyocytes, endothelial cells, podocytes and smooth muscle cells. As CARP was associated with intracellular processes such as hypertrophy, wound healing, proteinuria, neointima formation or even tumor development, it is likely to further study the effect of CARP on actin reorganization, which underlies the processes mentioned above.

#### Literaturverzeichnis

Aihara, Y, et al. "Cardiac ankyrin repeat protein is a novel marker of cardiac hypertrophy - role of M-CAT element within the promoter." *Hypertension* 36 (2000): 48-53.

Aihara, Y, et al. "Doxorubicin represses CARP gene transcription through the generation of oxidative stress in neonatal rat cardiac myocytes: Possible role of serine/threonine kinase-dependent pathways." *J Mol Cell Cardiol.* 32 (2000): 1401-1414.

Alberts, B. "The cell as a collection of protein machines: preparing the next generation of molecular biologists." *Cell* 92 (1998): 291-294.

Algrain, M, O Turunen, A Vaheri, D Louvard, und M Arpin. "Ezrin contains cytoskeleton and membrane binding domains accounting for its proposed role as a membrane-cytoskeleton linker." *J. Cell Biol.* 120 (1993): 129-139.

Anderson, BL, I Boldogh, M Evangelista, C Boone, LA Greene, und LA Pon. "The src homology domain 3 (SH3) of yeast type I myosin, Myo5p, binds to verprolin and is required for targeting to sites of actin polarization." *J Cell Biol.* 141 (1998): 1357-1370.

Araki, K, T Imaizumi, K Okuyama, Y Oike, und K Yamamura. "Efficiency of recombination by Cre transient expression in embryonic stem cells: Comparison of various promoters." *J Biochem* 122 (1997): 977-982.

Avivi, A, L Brodsky, E Nevo, und MR Band. "Differential expression profiling of the blind subterranean mole rat Spalax ehrenbergi superspecies: biosrospecting for hypoxia tolerance." *Physiol Genomics* 27 (2006): 54-64.

Bang, ML, et al. "Myopalladin, a novel 145-kilodalton sarcomeric protein with multiple roles in Z-disc and I-band protein assemblies." *J Cell Biol.* 153 (2001): 413-427.

Barash, I, ML Bang, L Mathew, ML Greaser, J Chen, und RL Lieber. "Structural and regulatory roles of the muscle ankyrin repeat protein family in skeletal muscle." *Am J Physiol Cell Physiol.* 293 (2007): C218-227.

Bartles, JR, A Wierda, und L Zheng. "Identification and characterization of espin, an actin-binding protein localized to the F-actin-richt junctional plaques of Sertoli cell ectoplasmic specializations." *J. Cell Sci.* 109 (1996): 1229-1239.

Bauer, A, und B Kuster. "Affinity purification-mass spectrometry." *Eur J Biochem* 270 (2003): 570-578.

Blumenthal, D K, et al. "Identification of the calmodulin-binding domain of skeletal muscle myosin lightchain kinase." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82 (1985): 3187-3191.

Boengler, K, F Pipp, B Fernandez, T Ziegelhoeffer, W Schaper, und E Deindl. "Arteriogenesis is associated with an induction of the cardiac ankyrin repeat protein (carp)." *Cardiovasc Res.* 59 (2003): 573-581.

Chu, W, DK Burns, RA Swerlick, und DH Presky. "Identification and characterization of a novel cytokine-inducible nuclear protein from human endothelial cells." *J Biol Chem.* 270 (1995): 10236-10245.

Cinquetti, R, et al. "Transcriptional deregulation and a missense mutation define ANKRD1 as a candidate gene for total anomalous pulmonary venous return." *Hum Mutat.*, 2008: 1-7.

Clowes, AW, MM Clowes, O Kocher, P Ropraz, C Chapponier, und G Gabbiani. "Arterial smooth muscle cells in vivo: relationship between actin isoform expression and mitogenesis and their modulation by heparin." *J Cell Biol.* 107 (1988): 1939-1945.

Corjay, MH, MM Thompson, KR Lynch, und GK Owens. "Differential effect of platelet-derived growth factor versus seruminduced growth on smooth muscle a-actin and nonmuscle b-actin mRNA expression in cultured rat aortic smooth muscle cell." *J. of Biol. Chem.* 264, Nr. 18 (1989): 10501-10506.

de Waard, V, TAE van Achterberg, NJ Beauchamp, H Pannekoek, und CJM de Vries. "Cardiac ankyrin repeat protein (CARP) expression in human and murine atherosclerotic lesions." *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 23 (2003): 64-68.

Ding, M, A Goncharov, Y Jin, und AD Chisholm. "C. elegans ankyrin repeat protein VAB-19 is a component of epidermal attachment structures and is essential for epidermal morphogenesis." *Development* 130 (2003): 5791-5801.

Dougherty, W G, T D Parks, S M Cary, J F Bazan, und R J Fletterick. "Characterization of the catalytic residues of the tobacco etch virus 49-kDa proteinase." *Virology* 172 (1989): 302-310.

Drakas, R, M Prisco, und R Baserga. "A modified tandem affinity purification tag technique for the purification of protein complexes in mammalian cells." *Proteomics* 5 (2005): 132-137.

Dugina, V, A Alexandrova, C Chapponier, J Vasiliev, und G Gabbiani. "Rat fibroblasts cultured from various organs exhibit differences in alpha-smooth muscle actin expression, cytoskeletal pattern and adhesive structure organization." *Exp. Cell Res* 238 (1998): 481-490.

Dziembowski, A, und B Séraphin. "Recent developments in the analysis of protein complexes." *FEBS Letters* 556 (2004): 1-6.

Fischer, M, et al. "A bioactive designer cytokine for human hematopoietic progenitor cell expansion." *Nature Biotechnology* 15 (1997): 142-145.

Flaherty, KM, DB McKay, W Kabsch, und KC Holmes. "Similarity of the three-dimensional structures of actin and the ATPase fragment of a 70-kDa heat shock cognate protei." *Proc Natl Acad Sci USA* 88 (1991): 5041-5045.

Frank, D, C Kuhn, HA Katus, und N Frey. "The sarcomeric Z-disc: a nodal point in signalling and disease." *J Mol Med.* 84 (2006): 446-468.

Fyrberg, EA, KL Kindle, und N Davidson. "The actin genes of Drosophila: a dispersed multigene family." *Cell* 19 (1980): 365-378.

Gavin, AC, et al. "Proteome survey reveals modularity of the yeast cell machinery." *Nature* 440 (2006): 631-636.

Gharahdaghi, F, CR Weinberg, DA Meagher, BS Imai, und SM Mische. "Mass spectrometric identification of proteins from silver-stained polyacrylamide gel: a method for the removal of silver ions to enhance sensitivity." *Electrophoresis* 20, Nr. 3 (1999): 601-605.

Gingras, AC, R Aebersold, und B Raught. "Advances in protein complex analysis using mass spectrometrz." *J Physiol*, (2005): 11-21.

Gingras, A, M Gstaiger, B Raught, und R Aebersold. "Analysis of protein complexes using mass spectrometry." *Nature Reviews (Molecular Cell Biology)* 8 (2007): 645-654.

Gödecke, A, et al. "Myoglobin protects the heart from inducible nitric oxide synthase (iNOS)-mediated nitrosative stress." *J Biol Chem.* 278 (2003): 21761-21766.

Goldfinger, LE, J Han, WB Kiosses, AK Howe, und MH Ginsberg. "Spatial restriction of alpha4 integrin phosphorylation regulates lamellipodial stability and alpha4beta1-dependent cell migration." *J Cell Biol* 162 (2003): 731-741.

Gunning, P, R Weinberger, und P Jeffrey. "Actin and tropomyosin isoforms in morphogenesis." *Anat. Embryol.* 195 (1997): 311-315.

Hall, A, und CD Nobes. "Rho GTPases: molecular switches that control the organization and dynamics of the actin cytoskeleton." *Phil Trans R Soc London* 355 (2000): 965-970.

Han, XJ, JK Chae, KR You, BH Lee, und DG Kim. "Involvement of GADD153 and cardiac ankyrin repeat protein in hypoxiainduced apoptosis of H9c2 cells." *J Biol Chem* 280 (2005): 23122-23129.

Hayashi, C, et al. "Multiple molecular interactions implicate connectin/titin N2A region as a modulating scaffold for p94/calpain 3 activity in skeletal muscle." *J Biol Chem* 283, Nr. 21 (2008): 14801-14814.

Head, JF. "A better grip on calmodulin." Curr Biol 2 (1992): 609-611.

Hentzen, ER, et al. "Stress-dependent and –independent expression of the myogenic regulatory factors and the MARP genes after eccentric contractions in rats." *J Physiol* 570 (2006): 157-167.

Hermann, IM. "Actin isoforms." Curr. Opin. Cell Biol. 5 (1993): 48-55.

Hogan, B, R Beddington, F Constantini, und E Lacy. *Manipulating the mouse embryo: A laborytory manual.* 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1994.

Hoock, TC, PM Newcomb, und IM Herman. "Beta actin and its mRNA are localized at the plasma membrane and the regions of moving cytoplasm during the cellular response to injury." *J Cell Biol* 112, Nr. 4 (1991): 653-664.

Horwitz, R, und D Webb. "Cell migration." *Current Biology* 13, Nr. 19 (2003): 756-759.

Hu, P, S Wu, und N Hernandez. "A role for beta-actin in RNA polymerase III transcription." *Genes Dev* 18 (2004): 3010-3015.

Huxley, F, und RM Nieredgerke. "Structural changes in muscle during contraction, interference microscopy of living muscle fibres." *Nature* 173 (1954): 971-973.

Ikeda, K, et al. "Molecular identification and characterization of a novel nuclear protein whose expression is up-regulated in insulin-resistant animals." *J Biol Chem* 278 (2003): 3512-3520.

Ishiguro, N, et al. "Carp, a cardiac ankyrin-repeated protein, and its new homologue, Arpp, are differentially expressed in heart, skeletal muscle, and rhabdomyosarcomas." *Am J Pathol.* 160 (2002): 1767-1778.

Ishiguro, N, T Motoi, N Araki, H Ito, M Moriyama, und H Yoshida. "Expression of cardiac ankyrin repeat protein, CARP, in malignant tumors: diagnostic use of CARP protein immunostaining in rhabdomyosarcoma." *Human Pathology*, 2008.

Jaffe, EA, RL Nachmann, CG Becker, und Mitsuhiko Osaki. "Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria." *J Clin Invest.* 52 (1973): 2745-2756.

Jeyaseelan, R, et al. "A Novel Cardiac-Restricted Target for Doxorubicin - CARP, a nuclear modulator of gene expression in cardiac progenitor cells and cardiomyocytes." *J Biol Chem.* 272 (1997): 22800-22808.

Kanai, H, et al. "Transforming growth factor-b/Smads signaling induces transcription of the cell type-restricted ankyrin repeat protein CARP gene through AGA motif in vascular smooth muscle cells." *Circ Res.* 80 (2001): 30-36.

Kang, D, SY Gho, M Suh, und C Kang. "Highly sensitive and fast protein detection with Coomassie brilliant blue in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis." *Bull Korean Chem Soc.* 23 (2002): 1511-1512.

Karakozova, M, et al. "Arginylation of beta-actin regulates actin cytoskeleton and cell motility." *Science* 313 (2006): 192-196.

Kashina, AS. "Differential arginylation of actin isoforms: the mystery of the actin N-terminus." *Trends in Cell Biol* 16, Nr. 12 (2006): 610-615.

Kislauskis, EH, X Zhu, und RH Singer. "Sequences responsible for intracellular localization of beta actin messenger RNA also affect cell phenotype." *J. Cell Biol.* 127 (1994): 441-451.

Kneusel, M, et al. "Identification of novel protein-protein-interactions using a versatile mammalian tandem affinity purification expression system." *Mol and Cell Proteomics* 2 (2003): 1225-1233.

Knöll, R, et al. "The cardiac mechanical stretch sensor machinery involves a Z-disc complex that is defective in a subset of human dilated cardiomyophathy." *Cell* 111 (2002): 943-955.

Knöll, R, M Hoshijima, und K Chien. "Cardiac mechanotransduction and implications for heart disease." *J Mol Med* 81 (2003): 750-756.

Kojic, S, et al. "The Ankrd2 protein, a link between the sarcomere and the nucleus in skeletal muscle." *J Mol Biol* 339 (2004): 313-325.

Kolodziej, P A, und R A Young. "Epitope tagging and protein surveillance." *Methods Enzymol.* 195 (1991): 508-519.

Kuo, HC, J Chen, P Ruiz-Lozano, Y Zou, M Nemer, und KR Chien. "Control of segmental expression of the cardiac-restricted ankyrin repeat protein gene by distinct regulatory pathways in murine cardiogenesis." *Development* 126 (1999): 4223-4234.

Lamalice, L, F Le Boeuf, und J Huot. "Endothelial cell migration during angiogenesis." *Circulation Research* 100 (2007): 782-794.

Lee, G, K Abdi, Y Jiang, P Michaely, V Bennett, und PE Marszalek. "Nanospring behaviour of ankyrin repeats." *Nature* 440, Nr. 7081 (2006): 246-249.

- Leurs, C, M Jansen, KE Pollok, M Heinkelein, M Schmidt, und M Wissler. "Comparison of three retroviral vector systems for transduction of nonobese diabetic/severe combined immunodeficiency mice repopulating human CD34+cord blood cells." *Human Gene Ther.* 14 (2003): 509-519.
- Li, J, A Mahajan, und MD Tsai. "Ankyrin repeats: A unique motif mediating protein-protein interactions." *Biochemistry* 45 (2006): 15168-15178.
- Lichty, JJ, JL Malecki, HD Agnew, DJ Michelson-Horowitz, und S Tan. "Comparison of affinity tags for protein purification." *Protein Expression and Purification* 41 (2005): 98-105.
- Liu, G, WM Grant, D Persky, VM Latham Jr., RH Singer, und J Condeelis. "Interactions of elongation factor 1alpha with F-actin and beta-actin mRNA: implications for anchoring mRNA in cell protrusions." *Mol Biol Cell* 13, Nr. 2 (2002): 579-592.
- Maeda, T, J Sepulveda, HH Chen, und HF Stewart. "Alpha(1)-adrenergic activation of the cardiac ankyrin repeat protein in cardiac myocytes." *Gene* 297 (2002): 1-9.
- Matsuura, K, N Uesugi, N Hijiya, T Uchida, und M Moriyama. "Upregulated expression of cardiac ankyrin-repeated protein in renal podocytes is associated with proteinuria severity in lupus nephritis." *Hum Pathol.* 38 (2007): 410-419.
- Meagher, RB, EC McKinney, und MK Kandasamy. "Isovariant dynamics expand and buffer the responces of complex systems: the diverse plant actin gene family." *The Plant Cell* 11 (1999): 995-1005.
- Melloni, E, et al. "Binding of protein kinase C to neutrophil membranes in the presence of Ca2+ and its activation by a Ca2+-requiring proteinase." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82 (1985): 6435-6439.
- Mikahilov, AT, und M Torrado. "The enigmatic role of the ankyrin repeat domain 1 gene in heart development and disease." *Int J Dev Biol* 52, Nr. 7 (2008): 811-821.
- Miller, MK, et al. "The muscle ankyrin repeat proteins: CARP, ankrd2/Arpp and DARP as a family of titin filament-based stress response molecules." *J Mol Biol.* 333 (2003): 951-964.
- Miralles, F, und N Visa. "Actin in transcription and transcription regulation." *Curr Opin in Cell Biol* 18 (2006): 261-266.
- Mochizuki, H, JP Schwartz, K Tanaka, RO Brady, und J Reiser. "High-titer human immunodeficiency virus type 1-based vector systems for gene delivery into nondividing cells." *J Vir.* 72 (1998): 8873-8883.
- Molkentin, JD, et al. "A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy." *Cell* 93 (1998): 215-228.
- Morgenstern, JP, und H Land. "Advanced mammalian gene transfer: high titre retroviral vectors with multiple drug selection markers and a complementary helper-free packaging cell line." *Nuclein Acids Research* 18 (1990): 3587-3596.
- Mosavi, LK, TJ Cammett, DC Desrosiers, und Z Peng. "The ankyrin repeat as molecular architecture for protein recognition." *Protein Science* 13 (2004): 1435-1448.

Moser, TL, et al. "Endothelial cell surface F1-FO ATP synthase is active in ATP synthesis and is inhibited by angiostatin." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, Nr. 12 (2001): 6656-6661.

Nagueh, SF, et al. "Altered titin expression, myocardial stiffness, and left ventricular function in patients with dilated cardiomyopathy." *Circulation* 110 (2004): 155-162.

Nakada, C, et al. "Cardiac ankyrin repeat protein is preferentially induced in atrophic myofibers of congenital myopathy and spinal muscular atrophy." *Pathol Int.* 53 (2003): 653-658.

Nakada, C, et al. "Cardiac-restricted ankyrin-repeated protein is differentially induced in Duchenne and congenital muscular dystrophy." *Lab Invest.* 83 (2003): 711-719.

Nakata, T, Y Nishina, und H Yorifuji. "Cytoplasmic gamma actin as a Z-disc protein." *Biochemical and Biophysical Communicaions* 286 (2001): 156-163.

Nehls, V, und D Drenckhahn. "A novel microcarrier-based in vitro assay for rapid and reliable quantification of three-dimensional cell migration and angiogenesis." *Microvasc. Res.* 50, Nr. 3 (1995): 311-322.

Nilsson, B, L Abrahmsen, und M Uhlen. "Immobilization and purification of enzymes with staphylococcal protein A gene fusion vectors." *EMBO J* 4 (1985): 1075-1080.

Ojima, K, Y Ono, S Hata, S Koyama, N Doi, und H Sorimachi. "Possible functions of p94 in connectin-mediated signaling pathways in skeletal muscle cells." *J Muscle Res and Cell Motility* 26 (2005): 409-417.

Otey, CA, MH Kalnoski, JL Lessard, und JC Bulinski. "Immunolocalization of the gamma isoform of non-muscle actin in cultured cells." *J. Cell Biol.* 102 (1986): 1726-1737.

Pardo, JV, JD Siliciano, und SW Craig. "A vinculin-containing cortical lattice in skeletal muscle: transverse lattice elements (costameres) mark sites of attachment between myofibrils and sarcolemma." *Proc Natl Acad Sci USA* 80 (1983): 1008-1012.

Park, JH, L Liu, IH Kim, JH Kim, KR You, und DG Kim. "Identification of the genes involved in enhanced fenretinide-induced apoptosis by parthenolide in human hepatoma cells." *Cancer Res.* 65 (2005): 2804-2814.

Patel, TJ, und RL Lieber. "Force transmission in skeletal muscle: from actomyosin to external tendons." *Exerc Sport Sci Rev* 25 (1997): 321-363.

Pietschmann, T, M Heinkelein, M Heldmann, H Zentgraf, A Rethwilm, und D Lindemann. "Foamy virus capsids require the cognate envelope protein for particle export." *J Vir.* 73 (1999): 2613-2621.

Pollard, TD, und GG Borisy. "Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments." *Cell* 112 (2003): 453-465.

Potter, DA, et al. "Calpain regulates actin remodeling during cell spreading." J Cell Biol. 141 (1998): 647-662.

Pratt, W B, und D O Toft. "Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones." *Endocr. Rev.* 18 (1997): 306-360.

Puig, O, et al. "The tandem affinity purification method (TAP): a general procedure of protein complex purification." *Methods* 24 (2001): 218-229.

Ridley, AJ, et al. "Cell Migration: Integrating signals from front to back." *Science* 302 (2003): 1704-1709.

Rigaut, G, A Shevchenko, B Rutz, M Wilm, M Mann, und B Seraphin. "A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration." *Nature Biotechnol.* 17 (1999): 1030-1032.

Sahyoun, N, et al. "Formation and identification of cytoskeletal components from liver cytosolic precursors." *Proc Natl Acad Sci USA* 79, Nr. 23 (1982): 7341-7345.

Sambrook, J, und D Russell. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* 3. Auflage. Bde. 1-3. New York, USA: Coldspring Harbor Laboratory Press, 2001.

Sarkar, S, BC Roy, N Hatano, T Aoyagi, K Gohji, und R Kiyama. "A novel ankyrin repeat-contaitning gene (Kank) located at 9p24 is a growth suppressor of renal cell carcinoma." *J Biol Chem* 277 (2002): 36585-36591.

Shestakova, EA, J Wyckoff, J Jones, RH Singer, und J Condeelin. "Correlation of b-Actin messenger RNA localization with metastatic potential in rat adenocarcinoma cell lines." *Cancer Research* 59 (1999): 1202-1205.

Shevchenko, A, M Wilm, O Vorm, und M Mann. "Mass spectrometric sequencing of proteins in silver-stained polyacrylamide gels." *Anal Chem* 68, Nr. 5 (1996): 850-858.

Shi, Y, et al. "CARP, a cardiac ankyrin repeat protein, is upregulated during wound healing and induces angiogenesis in experimental granulation tissue." *Am J Pathol.* 166 (2005): 303-312.

Skerra, Y, und Schmidt, TGM. "Use of the strep-tag and streptavidin for detection and purification of recombinant proteins." *Methods Enzymol.* 326 (2000): 271-304.

Small, JV, K Rottner, P Hahne, und KI Anderson. "Visualizing the actin cytoskeleton." *Microscopy research and technique* 47 (1999): 3-17.

Small, KV, I Kaverina, O Krylyshkina, und K Rottner. "Cytoskeleton cross-talk during cell motility." *FEBS Letters* 452 (1999): 96-99.

Smith, PK, RI Krohn, GT Hermanson, AK Mallia, FH Gartner, und MD Provenzano. "Measurement of protein using bicinchoninic acid." *Analyt Biochem.* 150 (1975): 76-85.

Sonnemann, KJ, et al. "Cytoplasmic gamma-actin is not required for skeletal muscle development but its absence leads to a progressive myopathy." *Developmental Cell* 11 (2006): 387-397.

Stam, FJ, et al. "Identification of candidate transcriptional modulators involved in successful regeneration after nerve injury." *Eur J Neuroscience* 25 (2007): 3629-3637.

Stelzl, U, et al. "A human protein-protein interaction network: a resource for annotating the proteome." *Cell* 122, Nr. 6 (2005): 857-968.

Terpe, K. "Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundaments to commercial systems." *Appl Microbiol Biotechnol.* 60 (2003): 523-533.

Torrado, M, B Nespereira, E Lopez, A Centeno, A Castro-Beiras, und AT Mikhailov. "ANKRD1 specifically binds CASQ2 in heart extracts and both proteins are co-enriched in piglet cardiac Purkinje cells." *J Mol Cell Cardiol.* 38 (2005): 353-365.

Uhlen, M, B Nilsson, B Guss, M Lindberg, S Gatenbeck, und L Philipson. "Gene fusion vectors based on the gene for staphylococcal protein A." *Gene* 23 (1983): 369-378.

Van Leene, J, E Witters, D Inzé, und G De Jaeger. "Boosting tandem affinity purification of plant protein complexes." *Trends in Plant Science* 13, Nr. 10 (2008): 517-520.

Waugh, DS. "Making the most of affinity tags." *Trends in Biotechnology* 23, Nr. 6 (2005): 316-320.

Welch, AY, und IM Herman. "Cloning and characterization of betaCAP73, a novel regulator of beta-actin assembly." *Int. J. of Biochem. and Cell Biol.* 34 (2002): 864-881.

Wenzel, K, et al. "Dysfunction of dysferlin-deficient hearts." *J Mol Med* 85, Nr. 11 (2007): 1203-1214.

Weser, S, M Gerlach, DM Kwak, M Czerwinska, und A Gödecke. "Detection of TAP-tagged proteins in Western blot, confocal laser scanning microscopy and FACS using the ZZ-domain." *J Biochem Biophys Methods* 68, Nr. 3 (2006): 189-194.

Whitfield, ML, et al. "Identification of genes periodically expressed in the human cell cycle and their expression in tumors." *Mol Biol Cell* 13, Nr. 6 (2002): 1977-2000.

Witt, CC, et al. "Induction and myofibrillar targeting of CARP and suppression of the Nkx2.5 pathway in the MDM mouse with impaired titin-based signaling." *J Mol Biol.* 336 (2004): 145-154.

Witt, SH, D Labeit, HL Granzier, S Labeit, und CC Witt. "Dimerization of the cardiac ankyrin protein CARP: Implications for MARP titin-based signaling." *J Muscle Res and Cell Motility* 26 (2005): 401-408.

Witte, C, LD Noel, J Gielbert, JE Parker, und T Romeis. "Rapid one-step protein purification from plant material using the eight-amino acid StrepII epitope." *Plant Molecular Biology* 55 (2004): 135-147.

Yao, J, Y Sasaki, Z Wen, GJ Bassell, und JQ Zheng. "An essential role for betaactin mRNA localization and translation in Ca(2+)-dependent growth cone guidance." *Nature Neuroscinece* 9 (2006): 1265-1273.

Zolk, O, et al. "Cardiac ankyrin repeat protein, a negative regulator of cardiac gene expression, is augmented in human heart failure." *Biochem and Biophys Res Comm.* 293 (2002): 1377-1382.

Zolk, O, M Marx, E Jäckel, A El-Armouche, und T Eschenhagen. "Beta-adrenergic stimulation induces cardiac ankyrin repeat protein expression: involvement of protein kinase A and calmodulin-dependent kinase." *Cardiovasc Res.* 59 (2003): 563-572.

Zou, Y, S Evans, J Chen, HC Kuo, RP Harvey, und KR Chien. "CARP, a cardiac ankyrin repeat protein, is downstream in the Nkx2-5 homeobox gene pathway." *Development*, Nr. 124 (1997): 793-804.

#### Liste der häufig benutzten Abkürzungen

aa amino acid (Aminosäure)

Bds beads – Säulenmaterial für Affinitätsaufreinigungen

bp Basenpaare

BT breakthrough – Durchlauf einer chromatographischen Reinigung
CAGGS Promotor aus dem Cytomegalovirus-Enhancer, dem β-Aktin

Promotor und dem β-Globin Poly(A)-Signal
CARP cardiac ankyrin repeat protein
CBP Calmodulin-bindendes Protein

cDNA copy DNA (Desoxyribonukleinsäure)
DARP diabetes-related ankyrin repeat protein

fwd forward (Primer)

h Stunde(n)

H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> destilliertes Wasser

HEK293T human embryonic kidney 293T Zellen

HUVEC human umbilical vein endothelial cells (humane Endothelzellen aus

der Nabelschnurvene)

kbp Kilobasenpaare kDa Kilodalton M molar min Minute(n)

mRNA messenger RNA (Ribonukleinsäure)

MS Massenspektrometrie

PCR polymerase chain reaction

rev *rev* (Primer)

rpm rounds per minute
RT Raumtemperatur

sec Sekunde(n)

TAP tandem affinity purification

TAP-MS Methodenkombination: Tandemaffinitätsreinigung-Massenspektro-

metrie

TEV Tobacco Etch Virus Protease

WT Wildtyp

ZZ zwei IgG-Bindedomänen des Staphylococcus aureus Protein A