

Aus dem Institut für Molekulare Kardiologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Universitätsprofessor Dr. rer. nat. Axel Gödecke

Etablierung der Tandem-Affinity-Purification (TAP)- Methode am Beispiel des Cardialen-Ankyrin-Repeat- Proteins (CARP) in Säugetierzellen

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der
Medizin
Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf

vorgelegt von
Min-Seok Kwak

2010

gewidmet meinen Eltern und meiner Heimat Südkorea

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf
Dekan

Referent: Prof. Dr. Gödecke
Korreferentin: Prof. Dr. Soboll

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	05
1.1 Die Bedeutung der Ankyrin-Repeat-Proteine	05
1.2 Das Cardiale-Ankyrin-Repeat-Protein – CARP	06
1.3 Die Tandem-Affinitäts-Reinigung (TAP)	10
2. Material und Methoden	14
2.1 Materialien	14
2.1.1 Chemikalien	14
2.1.2 Antikörper	15
2.1.3 Enzyme	16
2.1.4 Primer	16
2.1.5 Kulturmedien und Zusätze	17
2.1.6 Puffer	17
2.1.7 Geräte und Gebrauchsgegenstände	20
2.1.8 Organismen und Zellen	22
2.1.9 Plasmide	22
2.1.10 Tags	22
2.1.11 Affinitätsmatrices	23
2.2 Methoden	23
2.2.1 RT-PCR-Analyse von CARP in verschiedenen Mäuseherzen	23
2.2.2 Amplifikation von CARP mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	23
2.2.3 Auswertung der amplifizierten DNA-Fragmente im Agarosegel	24
2.2.4 Reinigung der DNA aus dem Agarosegel	24
2.2.5 Zellkultur der HEK293T-Zellen	24
2.2.6 Transiente Transfektion von CARP in HEK293T-Zellen	24
2.2.7 Lentivirale Transfektion von CARP in HEK293T-Zellen	25
2.2.8 Immunhistochemie	26
2.2.9 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und Western Blot-Analyse	27

2.2.10 Silbergefärbung	27
2.2.11 Proteinmengenbestimmung – Lowry	28
2.2.12 Zellfraktionierung	29
2.2.13 Tandem-Affinitäts-Reinigung (TAP)	30
3. Ergebnisse	32
3.1 Expression von CARP bei kardialer Hypertrophie verschiedener Genese	32
3.2 Klonierung der CARP cDNA und Herstellung der Plasmid-DNA	35
3.3 Expressionsanalyse des Fusionsproteins CARP-CBP-TEV-ZZ	39
3.4 Lokalisation des Fusionsproteins CARP-3xFLAG-TEV-ZZ auf subzellulärer Ebene	40
3.5 Zellfraktionierung	41
3.6 Etablierung der Aufreinigung von CARP mittels TAP-Methode	42
3.6.1 Fusionsprotein CARP-3xFLAG-TEV-ZZ	42
3.6.2 Fusionsprotein CARP-FL-3xFLAG-TEV-ZZ	45
3.6.3 Fusionsprotein CARP-3xFLAG-TEV-STREP	49
3.6.4 Fusionsprotein CARP-HA-THROMBIN-STREP-TEV-1xFLAG	55
4. Diskussion	60
4.1 Die Bedeutung von Proteininteraktionen im Rahmen biologischer Prozesse	60
4.2. Isolierung von Interaktionspartnern mit Hilfe der Tandem-Affinitäts-Reinigung (TAP)	62
5. Zusammenfassung	67
6. Abkürzungsverzeichnis	68
7. Literaturverzeichnis	72
8. Publikationen	91
9. Danksagung	92
10. Curriculum Vitae	93
11. Anhang	94

1. Einleitung

1.1 Die Bedeutung der Ankyrin-Repeat-Proteine

Bei der Strukturanalyse des erythrozytären Membranproteins Ankyrin wurden 24 repetitive Proteinsequenzmotive mit einer Länge von je 33 Aminosäuren identifiziert. Diese repetitiven Elemente wurden folglich als Ankyrin-Repeats (AR) bezeichnet [9, 73].

Jeder AR besitzt eine charakteristische L-förmige Struktur. Dabei wird die Basis des L von N- und C-terminalen β -Faltblättern gebildet von denen, in einem ca. 90° Winkel, ein Helix-Loop-Helix-Motiv den senkrechten Teil des L bildet. Durch die parallele Anordnung mehrerer AR erhält man somit eine Serie paralleler L-förmiger Peptidelemente, die auf der einen Seite eine Grube besitzt.

Entscheidend ist, dass die Repeats vor allem durch ihre Struktur definiert sind, die durch wenige hochkonservierte Aminosäuren an wenigen Positionen der Repeats sichergestellt werden. Die meisten Aminosäuren an den 33 Positionen eines Repeats sind variabel.

Damit gehören Ankyrin-Repeats zu einem der vielseitigsten Sequenzmotive, die bisher identifiziert werden konnten. Eine Datenbankanalyse im Jahr 2004 führte zur Identifizierung von 19276 AR in 3608 verschiedenen Proteinen [80], so dass die AR-Proteine eine der größten Proteinfamilien sind.

Weitere Mitglieder der Ankyrin-Repeat Proteinfamilie sind unter anderem der Hefe-Zell-Zyklus-Regulator Swi6/Cdc10 sowie das Signal-Protein Notch in Drosophila [68, 18]. Die wesentliche Funktion der Ankyrin-Repeats liegt in der Ausbildung von Protein-Protein-Wechselwirkungen.

Inzwischen sind zahlreiche Funktionen und Proteine bekannt, an denen die Ankyrin-Repeats beteiligt sind bzw. vorkommen. Sie spielen eine Rolle bei der Integrität des Zytoskeletts, der Zellzyklus-Kontrolle, der Regulation der Transkription, der Signaltransduktion, der Zellentwicklung und -differenzierung, der Apoptose sowie bei Entzündungsreaktionen [77, 16, 102, 40, 74].

Außerdem assoziieren sie mit vielen weiteren Proteinen wie mit Natrium-Kanälen, Natrium-Calcium-Austauschern, Natrium-Kalium-ATPasen, Inositol-1,4,5-Trisphosphat-Rezeptoren und mit Proteinen, die für die Zelladhäsion zuständig sind

wie CD44 oder dem L1-Zelladhäsionsmolekül (L1CAM) [6]. Zahlreiche Proteine mit Ankyrin-Repeats gehören zu den Transkriptionsfaktoren oder Transkriptionsfaktor-Inhibitoren, wie GABP β , NF- κ B, p105, p100 und I κ B [14, 112, 17, 51, 26, 27, 111, 83], was ihre genregulatorische Funktion unterstreicht.

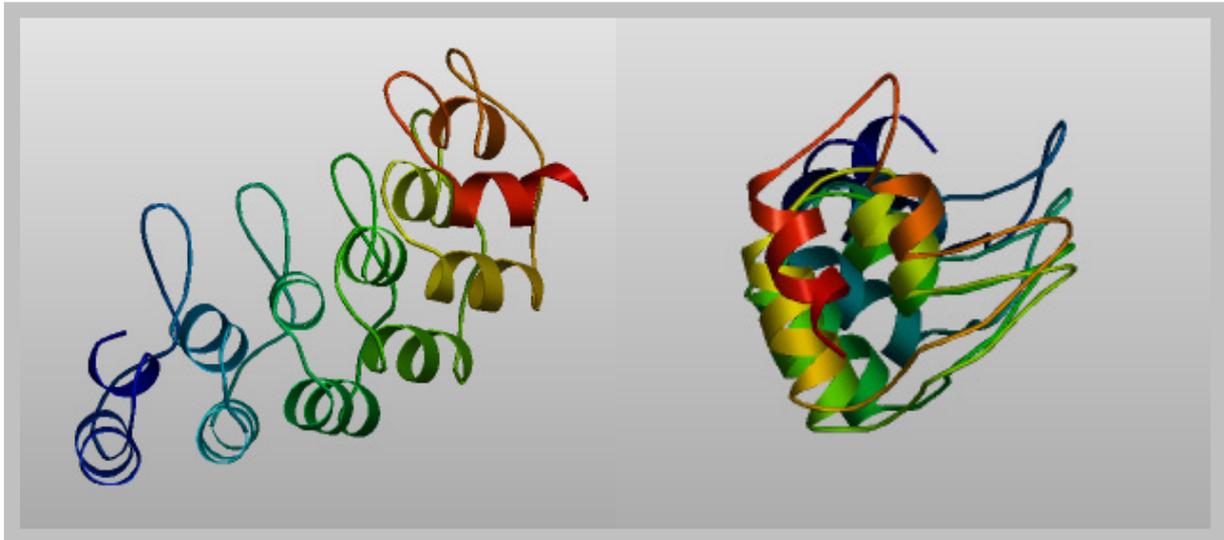


Abb. 1: Darstellung der Ankyrin-Repeatstruktur von CARP. Parallel angeordnete Helix-turn-Helix-Motive stehen im rechten Winkel zu basal angeordneten Falblattstrukturen, über die die einzelnen Repeats miteinander verbunden sind. Rechts ist die L-förmige Struktur der hintereinandergeschalteten Ankyrin Repeats erkennbar. (Modell erstellt mit SWISS-MODEL Workspace (Arnold K., Bordoli L., Kopp J. and Schwede T. (2006). *The SWISS-MODEL Workspace: A web-based environment for protein structure homology modelling.* *Bioinformatics*, 22,195-201).

1.2 Das Cardiale-Ankyrin-Repeat-Protein – CARP

Das Cardiale-Ankyrin-Repeat-Protein wurde 1995 in kultivierten humanen Endothelzellen als ein Gen identifiziert, das durch Zytokine (IL1 α und TNF- α) induziert werden konnte [23]. Es besteht aus 319 Aminosäuren, einer NLS-Sequenz (Nuclear Localization Signal), zwei PEST-ähnlichen Sequenzen, 4 Ankyrin-Repeats und mehreren Konsensus-Phosphorylierungsstellen [23].

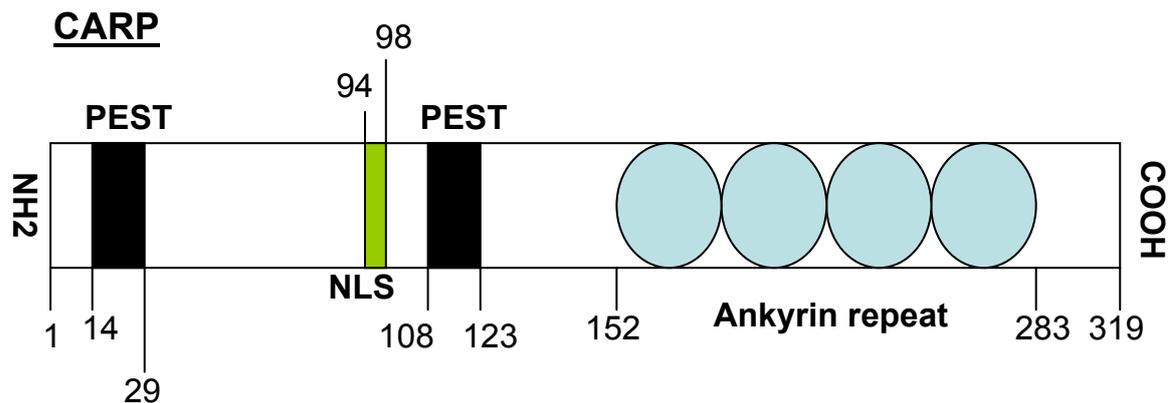


Abb. 2: Schematische Darstellung des Cardialen-Ankyrin-Repeat-Proteins - CARP. Die wesentlichen Elemente des Proteins sind benannt. Die Zahlen repräsentieren die Position innerhalb der Aminosäuresequenz.

Diese Übersicht über das CAR-Protein zeigt, dass wahrscheinlich keine enzymatische Funktion mit diesem Protein zu assoziieren ist. Vielmehr weisen die Ankyrin-Repeats darauf hin, dass CARP ein Adapter-Protein zu sein scheint, dessen Funktion in der Interaktion mit anderen Proteinen liegen könnte (Protein-Protein-Interaktionen).

Untersuchungen in Hefezellen mit der sogenannten „two-hybrid“-Technik ergaben, dass CARP mit dem Transkriptionsfaktor YB-1 interagiert und somit wahrscheinlich als Co-Aktivator oder Co-Repressor von Transkriptionsvorgängen dient [119]. Diese Möglichkeit wird durch die Anwesenheit eines Kernlokalisationssignals (NLS) unterstrichen.

YB-1 ist während der Kardiogenese an der Aktivierung des Myosin-Leichtketten-2v-Gens (MLC2v) beteiligt [119]. CARP und YB-1 bilden einen Komplex und sind vorwiegend im Zellkern lokalisiert [119, 60].

Auch das endogene CARP ist vorwiegend im Zellkern zu finden [119], konnte aber auch im Zytosol nachgewiesen werden [119, 59].

CARP selbst ist dem Nkx2.5 Homeobox Gen nachgeschaltet und wird von diesem über einen weiteren Transkriptionsfaktor GATA-4 in seiner Expression reguliert [119, 66].

Speziell in embryonalen Kardiomyozyten im Rahmen der Kardiogenese ist CARP vermehrt exprimiert. In geringeren Mengen finden sich CARP Transkripte aber auch

in Skelettmuskel, Lunge und Plazenta [119, 114]. Darüber hinaus konnte in einigen Studien gezeigt werden, dass CARP bei experimentell denervierten Skelettmuskeln [51, 66, 5], verschiedenen Muskelerkrankungen, wie Morbus Duchenne [11] und angeborenen Myopathien [18], bei der Wundheilung [103], in artherosklerotisch veränderten Gefäßen [28] und bei der Arteriogenese [15] herauf reguliert wird.

Interessant ist der Zusammenhang von pathologischen Herzveränderungen und der Expression von CARP. Mehrere Arbeiten berichten über eine erhöhte CARP-Expression im Rahmen von experimentell induzierter linksventrikulärer Druckbelastung [66] und anderen Herzfehlern, wie Kardiomyopathien oder Herzhypertrophie [1]. Außerdem führt die Aktivierung von Elementen einer zellulären Stressantwort wie p38 Map Kinase und von Rac1 in kultivierten Kardiomyozyten zu einer Aktivierung des CARP Promotors [1].

Auch TGF- β , das proatherosklerotisch wirkt [67, 58] und an verschiedenen Regulationsmechanismen wie Zellwachstum, Zelldifferenzierung, Zellproliferation, Zellmigration und Apoptose beteiligt ist [76], induziert die Expression von CARP in kultivierten glatten Gefäßmuskelzellen (C2/2-Zellen) und in verletzten Arterien [62]. Darüber hinaus induziert TGF- β durch die Bindung von Smad3 an das CAGA-Motiv innerhalb des CARP-Promotors die CARP-Expression. Das CAGA-Sequenzmotiv kommt auch in anderen TGF- β induzierbaren Genen vor, wie JunB [61], c-Jun [117] und IgC α [50].

CARP Überexpression inhibiert die Zellproliferation und es kommt zu einer Reduktion der DNA-Synthese innerhalb der betroffenen Zelle [62, 60].

Eine Mechanotransduktion, d. h. die Umwandlung eines mechanischen Einflusses auf eine Zelle in ein intrazelluläres Signal, ist an vielen Regulationsmechanismen beteiligt, wie Propriozeption, Zellkontraktion oder der Regulation des Zellvolumens [96, 42, 24, 97, 98, 57].

Im Herzen wird eine veränderte mechanische Belastung in ein verändertes Genexpressionsprogramm übersetzt, das beispielsweise die Entwicklung einer Hypertrophie stimuliert. Man geht heute davon aus, dass Schaltstellen der Mechanotransduktion in den Sarkomeren liegen, so dass eine gesteigerte Dehnung hier detektiert wird und in ein intrazelluläres Signal umgesetzt wird. Die genauen Mechanismen dieses Prozesses sind bisher nicht verstanden, doch es zeichnet sich

ab, dass vor allem Proteine im Bereich der Z-Scheibe eine wesentliche Rolle bei der Mechanotransduktion übernehmen.

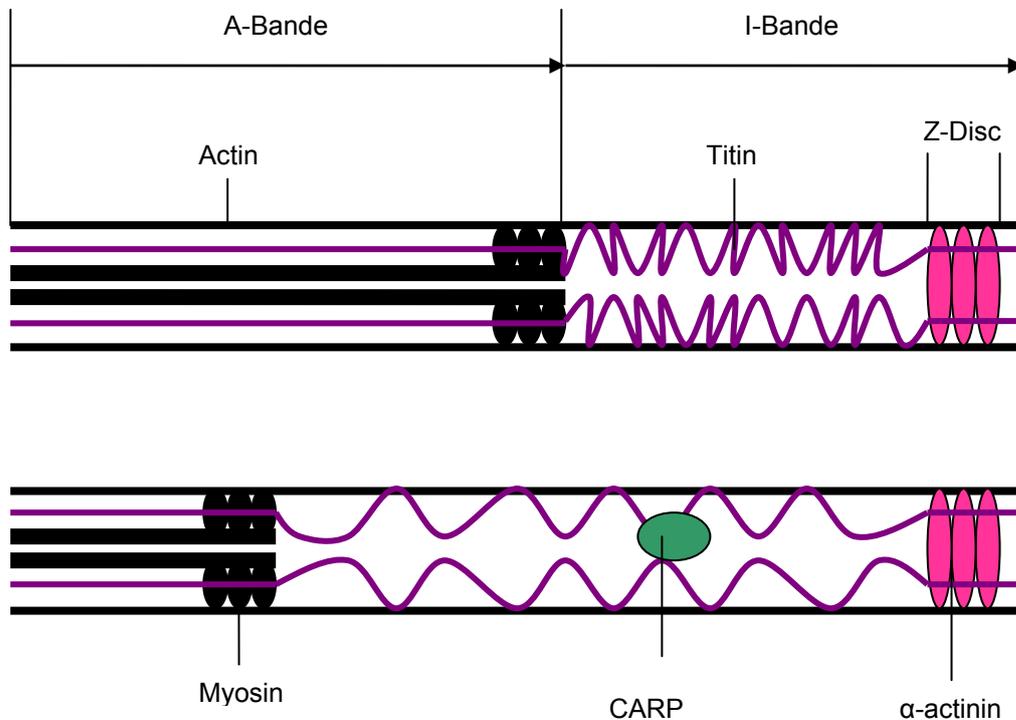


Abb. 3: Funktion von CARP in einem Sarkomer. Passive Dehnung des Sarkomers führt zu einer erhöhten CARP-Akkumulation im Bereich der I-Bande.

In diesem Zusammenhang ist CARP ein interessantes Protein, denn es konnte in Kardiomyozyten unter anderem im Bereich der I-Bande des Sarkomers nachgewiesen werden, wo es mit Myopalladin interagiert. Das Myopalladin ist eine Komponente des Z-Disc-Komplexes und CARP scheint somit eine funktionelle Brücke zwischen Sarkomer und Regulation der Transkription zu bilden, da es ja auch im Kern nachgewiesen wurde [3].

Neben Myopalladin interagiert CARP auch mit dem N2A-Segment des Titin-Filaments, das eine große Rolle bei der Mechanotransduktion spielt [64, 89, 71, 48, 57] und sich im Sarkomer von der Z-Disc-Region bis zur M-Linie ausdehnt.

In der Studie von Miller et al. 2003 konnte gezeigt werden, dass passive Muskeldehnung eine erhöhte CARP-Akkumulation im Nukleus von kultivierten fetalen Ratten-Kardiomyozyten und im Bereich der I-Bande bewirkt [78]. CARP könnte also den erhöhten mechanischen Stress in Myofibrillen in den Zellkern übertragen. Inwieweit diese Hypothese zutrifft muss aber noch geklärt werden.

1.3 Die Tandem-Affinitäts-Reinigung (TAP)

Wie die Ausführungen zum CARP zeigen, werden viele biologische Funktionen in Zellen durch Proteine und deren Interaktion mit anderen Proteinen vermittelt [37]. Die Identifizierung von Protein-Protein-Interaktionen bzw. ihre Organisation zu Multiproteinkomplexen trägt somit zum besseren Verständnis biologischer Vorgänge bei.

Die Tandem-Affinitäts-Reinigung (tandem affinity purification – TAP) von Proteinkomplexen in Verbindung mit der Massenspektrometrie ist hierbei ein sehr geeignetes Verfahren, um Proteinkomplexe schnell und unter nativen Bedingungen zu isolieren und zu analysieren [4, 92, 90, 43].

Dazu wird das Zielprotein mit zwei Tags N-terminal oder C-terminal fusioniert [90, 92]. Die beiden Tags erlauben die Aufreinigung der Proteine samt ihren Bindungspartnern durch zwei konsekutive Affinitätsreinigungen. Das Konstrukt wird zur Expression in Zellen eingeschleust, von denen dann Zellextrakte vorbereitet werden, um die Fusionsproteine mit seinen Bindungspartnern zu isolieren.

Ursprünglich wurde die Methode der TAP an Hefe-Zellen etabliert. Es wurde ein TAP-Tag entwickelt, das aus zwei IgG-bindenden Domänen des Protein A (Z-Domäne) aus *Staphylococcus aureus*, einem Calmodulin-bindenden Peptid (CBP) und einer TEV-Protease-Spaltungsstelle besteht. Die TEV-Stelle liegt dabei zwischen der ZZ-Domäne und dem CBP [92, 90].

Das Protein A ist eine Komponente der Zellwand des Bakteriums *Staphylococcus aureus* mit einem Molekulargewicht von ca. 42 kDa. Die Sequenzanalyse zeigt, daß 2 funktionelle Regionen innerhalb des Protein A vorkommen [104, 105]. Der NH₂-terminale Teil, mit einem Molekulargewicht von 27 kDa, besteht aus 4 hoch homologen IgG-bindenden Einheiten (Z-Domäne), welche jede für sich ein Molekulargewicht von 7.000 Dalton hat. Der COOH-terminale Teil besitzt ein

Gewicht von 15 kDa und bindet an Peptidoglykan. Protein A bindet an den Fc-Teil des Immunglobulins mehrerer Spezies, unter anderem auch des Menschen [41]. Eine ZZ-Domäne im TAP-Tag ermöglicht es, rekombinante Proteine über eine IgG Affinitäts-Chromatography-Säule aufzureinigen [72, 115, 82].

Die TEV-Protease ist eine 27 kDa schwere Protease, die spezifisch eine 7 Aminosäuren-lange Sequenz erkennt. Die Sequenz umfasst E-X-X-Y-X-Q-S und schneidet zwischen den konservierten Glutamin- und Serinresten [32, 31, 33]. Die optimale Sequenz für das Schneiden in dieser Region ist E-N-L-Y-F-Q-S [29, 20], wobei die TEV-Spaltungsstelle möglichst zwischen 2 Domänen platziert werden sollte. Die hohe Spezifität und Effizienz macht die TEV-Protease zu einem idealen Werkzeug, um Tags von Fusionsproteinen zu entfernen [87].

Die Aufreinigung über das Calmodulin bindende Peptid wurde zuerst 1992 beschrieben [109]. Das Peptid, das vom C-terminalen Ende der Myosin-Leichtketten-Kinase des Skelettmuskels abgeleitet wurde, besteht aus 26 Aminosäuren, hat eine Größe von 3 kDa und bindet in Anwesenheit von 0,2 mM CaCl_2 an Calmodulin [63]. Die starke Affinität erlaubt dabei mehrere Waschschriffe, um das Zielprotein von Kontaminationen weitgehend zu befreien. Mit EGTA können Proteine von der Calmodulin-Säule eluiert werden.

Bei der ersten Aufreinigung bindet das Fusionsprotein mit seinen Bindungspartnern über seine ZZ-Domäne an eine IgG-Affinitätsmatrix und wird von der großen Menge nicht assoziierter Proteine abgetrennt. Durch Behandlung mit der TEV-Protease wird dann das Zielprotein mit seinen Bindungspartnern proteolytisch von der Affinitätssäule eluiert. Die ZZ-Domäne wird dabei vom Fusionsprotein abgetrennt und bleibt an der IgG-Säule zurück. Da bei dieser Elution immer noch kontaminierende Proteine mit von der Säule eluiert werden, ist ein zweiter Reinigungsschritt erforderlich. Daher gibt man das TEV-Eluat zu einer Calmodulin-Affinitätsmatrix. Hier bindet das Fusionsprotein in Anwesenheit von Ca^{2+} über sein CBP an Calmodulin und weitere Verunreinigungen werden beseitigt. Im letzten Schritt wird durch die Gabe von EGTA die Bindung zwischen CBP und Calmodulin gelöst und das gewonnene Eluat steht zur weiteren Analyse zur Verfügung [90, 92].

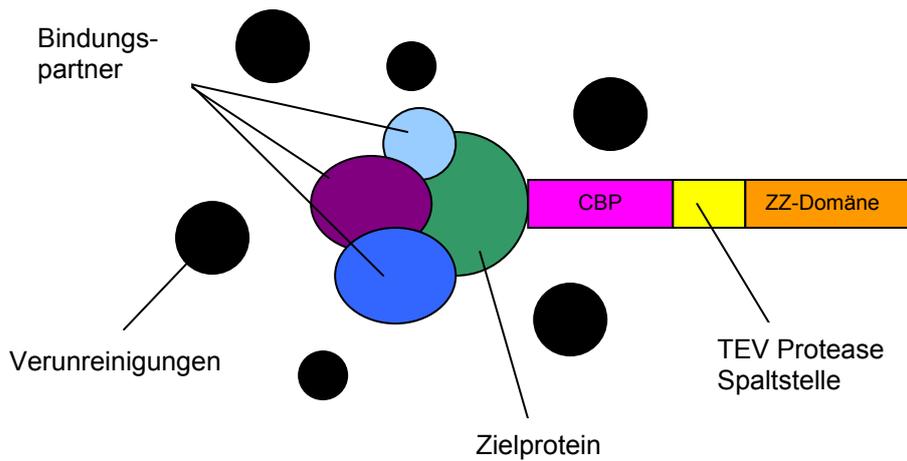


Abb. 4: TAP-Aufreinigung. Die Abbildung zeigt schematisch das Fusionsprotein mit seinen möglichen Interaktionspartnern sowie einzelne Proteinverunreinigungen. CBP: Calmodulin bindendes Peptid, ZZ-Domäne: 2 Kopien der IgG-Bindungsdomäne aus Protein A.

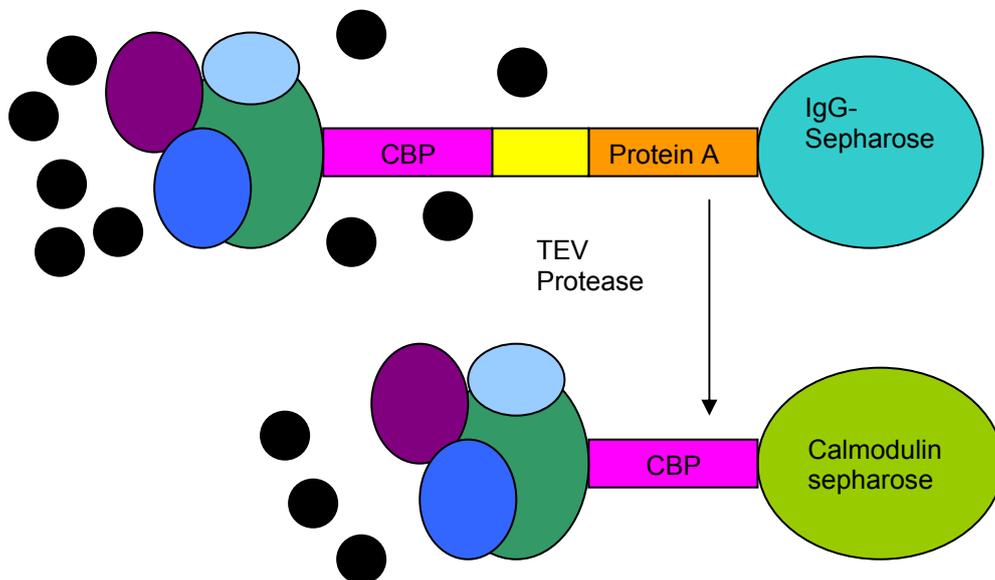


Abb. 5: TAP-Aufreinigung. Im ersten Schritt bindet das Fusionsprotein über die ZZ-Domäne im Protein A an den Fc-Teil des IgG, die an Sepharose gekoppelt wurde. Über die TEV-Spaltungsstelle wird das Protein eluiert und auf die zweite Säule gegeben. Dort bindet es an die Calmodulin-Sepharose und wird von weiteren Verunreinigungen befreit.

Ziel dieser Arbeit war es, die Tandem-Affinitätsreinigung (TAP) in Säugetierzellen am Beispiel des kardialen-Ankyrin-Repeat-Proteins zu etablieren.

Der erste Teil der Arbeit beschäftigt sich mit der Frage, inwieweit CARP bei verschiedenen pathologischen Zuständen im Herzen induziert wird, der zweite Teil mit der Etablierung der TAP-Tag-Methode.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien

Acrylamid/Bis Rotiphorese Gel 40	Carl Roth GmbH & Co. KG
Ammoniumperoxodisulfat	Carl Roth GmbH & Co. KG
APS	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
β -Mercaptoethanol	Merck KGaA
BenchMark™ Pre-Stained Protein Ladder	Invitrogen GmbH
Biotin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Bovines Serumalbumin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
BSA	Fluka
CaCl ₂	Carl Roth GmbH & Co. KG
DAPI	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
DTT	Roche
EDTA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
EGTA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Essigsäure	Merck KGaA
Ethanol	Merck KgaA
Ethanol, vergaellt	Merck KGaA
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
flüssiger Stickstoff	Linde
Folin-Ciocalteus Phenolreagenz	Merck KGaA
Formaldehyd	Merck KGaA
Glycerol ReagentPlus™	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Glycin	MP Biomedicals
HEPES	Carl Roth GmbH & Co. KG
IGEPAL CA-630	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Imidazol	Merck KGaA
Isopropanol	Merck KGaA
KCl	Merck KGaA

Lipofectamine 2000	Invitrogen GmbH
Mark 12™ Unstained Standard	Invitrogen GmbH
Methanol	Merck KGaA
MgAcetat	Merck KGaA
Magermilchpulver	Sucofin
NaAcetat	Merck KGaA
NaCl	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Natriumcarbonat	Carl Roth GmbH & Co. KG
Natriumthiosulfat	Merck KGaA
normales Ziegenserum	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
NucleoSpin® Ready-to-use system for fast purification of nucleic acids	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Fermentas Life Sciences GmbH
PMSF	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Ponceau S	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Rotiphorese® Gel 40 (29:1)	Carl Roth GmbH & Co. KG
Saponin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
SDS ultra pure	Carl Roth GmbH & Co. KG
S-EDTA-Trypsin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Silbernitrat	Carl Roth GmbH & Co. KG
TEMED	Carl Roth GmbH & Co. KG
Tris-Cl	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Tris Ultra Pure	MP Biomedicals, Inc.
Tween 20 (Polyoxyethylene- Sorbitan Monolaurate)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
UltraPure™ Agarose	Invitrogen GmbH
Western Lightning™ Chemiluminescence Reagent Plus	PerkinElmer LAS, Inc.

2.1.2 Antikörper

Primär-Ak

Maus Anti-Flag® M2	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
--------------------	---------------------------

Rabbit Anti-Flag
Maus Anti-HA
Rabbit Anti-HA

Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Cell Signaling
Sigma-Aldrich Chemie GmbH

Sekundär-Ak

HRP Anti-Rabbit
HRP Anti-Maus
HRP Anti-Goat
Peroxidase Conjugate Anti-Maus
FITC-Conjugated Anti-Maus

FITC-Conjugated Anti-Rabbit

Rhodamine Red-X-conjugated
Anti-Goat

Cell Signaling
Cell Signaling
Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Calbiochem
Jackson ImmunoResearch
Laboratories Inc.
Jackson ImmunoResearch
Laboratories Inc.

Jackson ImmunoResearch
Laboratories Inc.

2.1.3 Enzyme

AcTEV™ Protease
Eco RI
Hae II
Hind III
Platinum® Pfx DNA Polymerase
Pme I
Proteinase Inhibitor Cocktail
PVU I
Sac I
Swa I
Taq-Polymerase
T4-DNA-Ligase
Xho I

Invitrogen GmbH
Sigma-Aldrich Chemie GmbH
New England BioLabs Inc.
New England BioLabs Inc.
Invitrogen GmbH
New Englang BioLabs Inc.
Sigma-Aldrich Chemie GmbH
New England BioLabs Inc.
New England BioLabs Inc.
New England BioLabs Inc.
Invitrogen GmbH
New England BioLabs Inc.
New England BioLabs Inc.

2.1.4 Primer

CARP th1 (CGA CGT CTG)

CGA TGA GTA TA)	Invitrogen GmbH
CARP th2 (TCA TCA AGA GTC GAA TCA TC)	Invitrogen GmbH
CARP Stop (TCA GAA TGT AGC TAT GCG AG)	Invitrogen GmbH
CARP C-term-Stop (GAA TGT AGC TAT GCG AGA GTT CTT G)	Invitrogen GmbH

2.1.5 Kulturmedien und Zusätze

Dulbeco's MEM Eagle	Gibco / Invitrogen GmbH
Essential Amino Acids	Gibco / Invitrogen GmbH
fötales Kälberserum	Biochrom AG
Glutamax	Gibco / Invitrogen GmbH
Penicillin / Streptomycin	Gibco / Invitrogen GmbH

2.1.6 Puffer

Biotin Elutionspuffer (pH 8)	2,5 mM Biotin 100 mM Tris 150 mM NaCl 1 mM EDTA
Calmodulin Bindungspuffer (pH 8)	10 mM b-mercaptoethanol 10 mM Tris-Cl 150 mM NaCl 1 mM MgAcetat 1 mM Imidazol 2 mM CaCl ₂ 0,1% NP40
Calmodulin Elutionspuffer (pH 8)	10 mM b-mercaptoethanol 10 mM Tris 150 mM NaCl 1 mM MgAcetat

	1 mM Imidazol 2 mM EGTA 0,1% NP40
DNA-Ladepuffer	30% (v/v) Glycerol 0,25% (w/v) Bromphenolblau
EDTA-Saline (pH 7,2)	0,7 mM EDTA 137 mM NaCl 2,7 mM KCl 8 mM Na ₂ HPO ₄ 1,5 mM KH ₂ PO ₄
Lämmli-Puffer (pH 6,8)	250 mM Tris 8% (w/v) SDS 20% (v/v) Glycerol 0,1 mg/ml Bromphenolblau 100 mM DTT
Lysispuffer (pH 7,5)	10 mM Tris 150 mM NaCl 0,1% IGEPAL CA-630 oder NP40 1,5 mM PMSF 1x Proteinase-Inhibitor-Cocktail (200 mM AEBSF, 100 mM EDTA, 13 mM Bestatin, 1,4 mM E-64, 100 µM Leupeptin, 30 µM Aprotinin)
Mospuffer (10%, pH 7,0)	0,2 M 3(N-Morpholino)propane sulphanic acid 0,5 M NaAcetat 0,01 M Na ₂ EDTA
PBS (Phosphate Buffered Saline, pH 7,4)	2,7 mM KCl

	2 mM KH_2PO_4 137 mM NaCl 10 mM Na_2HPO_4
Sammelgel (2,5%)	2,5 ml 40% Acrylamid 2,5 ml Sammelgelpuffer 200 μl 10% SDS 30 μl TEMED 60 μl 10% APS 14,9 ml H_2O
Sammelgelpuffer (pH 6,8)	1 M Tris
SDS-PAGE-Laufpuffer (pH 8,3)	25 mM Tris 250 mM Glycin 0,1% (w/v) SDS
Semi-Dry-Blotpuffer (pH 8,5)	190 mM Glycin 25 mM Tris 0,1% (w/v) SDS 20% (v/v) Methanol
Strep-Waschpuffer (pH 8)	100 mM Tris-Cl 150 mM NaCl 1 mM EDTA
TAE-Puffer	40 mM Tris-Acetat 1 mM EDTA
TBS-Puffer (pH 7,4)	25 mM Tris 150 mM NaCl
TBST-Puffer (pH 7,4)	150 mM NaCl 25 mM Tris

	0,1% Tween-20
TE-Puffer (pH 7,4)	10 mM Tris 1 mM EDTA
TEV Cleavage Puffer (pH 8)	10 mM Tris 150 mM NaCl 0,1% IGEPAL CA-630 oder NP40 0,5 mM EDTA 1 mM DTT
Trenngel (10%)	10 ml Acrylamid 10 ml Trenngelpuffer 400 µl 10% SDS 80 µl TEMED 100 µl 10% APS 20 ml H ₂ O
Trenngelpuffer (pH 8,8)	1,5 M Tris
Zamboni-Fixativ (pH 7,4)	4% Paraformaldehyd 0,1 M Phosphatpuffer 15% Pikrinsäure

2.1.7 Geräte und Gebrauchsgegenstände

Analysenwaage EMB 200-2	Kern & Sohn GmbH
Autoklav	Webeco
Blotkammer für Western Blot	Hoefer
Brutschrank (Bakterienkulturen)	Heraeus Instruments
Centrifuge 5417 R	Eppendorf AG
Centrifuge 5810 R	Eppendorf AG
Chamber Slides™ (Lab-Tek™)	Nunc GmbH & Co. KG
Curix 60 (Röntgenentwicklungsmaschine)	Agfa-Gevaert AG
Econo-Säulen	Bio-Rad Laboratories GmbH

Electrophoresis Power Supply	Artisan Scientific Corporation
Fisher Scientific POWER 608	Fisher Scientific
Fluoreszenzkamera (F-View UT-TV0,5xC-3)	Olympus
Fluoreszenzmikroskop, Axiovert35	Zeiss
Fluoreszenzmikroskop, Olympus BX50	Olympus
Gefrierschrank (-80°C), Ultimall	REVCO
GeneAmp® 5700 Sequence Detection System	PE Applied Biosystems
Hamilton-Spritze	Carl Roth GmbH & Co. KG
Hellfeldkamera	Sony
Hoefer™ SE 600 Ruby™	Amersham Biosciences AB
konfokales Laserscanning-Mikroskop LSM 510 Meta	Zeiss
Kühl- und Gefrierschrank (4°C bzw. – 20°C)	Liebherr, Privileg
Lichtmikroskop, ID-03 Axiovert 25	Zeiss
Magnetrührer, MR 2002 – MR3001	Heidolph
Mikrowelle, Micromat	AEG
PCR-Platten	PE Applied Biosystems
PCR Thermocycler, Mastercycler gradient	Eppendorf
PE 3600, DeltaRange®	Mettler
pH-Meter MP 220	Mettler
Pipetten (10, 20, 200, 1000 µl), Pipetman	Gilson
PROTRAN® Nitrozellulose	Schleicher und Schuell
Rotator, Roto-Shake-Genie	Scientific Industries
Röntgenfilme	Amersham Biosciences
Safe-Lock Tubes 0,5, 1,5 und 2 ml	Eppendorf AG
Schüttler	Edmund Bühler
Schüttler für Bakterien­schüttelkulturen	Infors AG
SDS-PAGE vertikale Laufkammer SE600-SE400	Hoefer Instruments
Sterilwerkbank, antair BSK	STERIL S.p.A
Strep-tag® Starter Kit 3C	IBA GmbH

Temperierbad (16°C), Julabo U3 (37°C), GFL 1083	Julabo, GFL
ThermoCycler	Perkin Elmer®
Thermomixer comfort	Eppendorf AG
Transferkammer, Fastblot B33-B43	Biometra
Transfer Membran	Whatman GmbH
UV/VIS Spectrometer Lambda 20	Perkin Elmer®
Vakuumentrifuge, Speed Vac Concentrator	Bachhofer
Vortexer, Vortex-Genie2	Scientific Industries
Wasserreinigungsanlage MilliQ	Millipore
Zellkulturinkubator, Hera cell 240 bzw. Function line	Heraeus Instruments
Zellkultur-Petrischalen	Techno Plastic Products AG
6-Loch-Zellkultur-Platten	Techno Plastic Products AG

2.1.8 Organismen und Zellen

HEK293T-Zellen (Human Embryonic Kidney)	European Collection of Cell Culture, ECACC
XL-1 Blue kompetente Zellen	Stratagene

2.1.9 Plasmide

pGJ3-CS-CGW (pGJ3)	Geschenk von Prof. Dr. Helmut Hananberg (Leurs et al. 2003)
--------------------	--

2.1.10 Tags

Calmodulin Binding Peptide (KRRWKKNFIAVSAANRFKKIS SSGAL)	Invitrogen GmbH
Flag-Tag (DYKDDDDK)	Invitrogen GmbH
HA-Tag (6E2) Mouse mAb	Cell Signaling Technology®, Inc.
Protein A	Invitrogen GmbH
Strep-Tag	

(WSHPQFEK)

Invitrogen GmbH

2.1.11 Affinitätsmatrices

ANTI-FLAG® M2-Agarose from

mouse

Sigma Aldrich Chemie GmbH

Calmodulin Sepharose™ 4B

Amersham Biosciences AB

Cytodex™ Mikrosphären

Amersham Biosciences AB

IgG Sepharose™ 6 Fast Flow

Amersham Biosciences AB

StrataClean™ Resin

Stratagene®

Strep-Tactin® Sepharose

50% Suspension

IBA GmbH

2.2 Methoden

2.2.1 RT-PCR-Analyse von CARP in verschiedenen Mäuseherzen

cDNA Proben aus Mäuseherzen mit unterschiedlichen Ursachen einer Herzinsuffizienz bzw. aus Kontrollproben wurden mir freundlicherweise von Dr. A. Molojavyi, Institut für Herz- und Kreislaufphysiologie, zur Verfügung gestellt. Die Amplifikation und relative Quantifizierung der CARP Transkripte erfolgte durch Real-Time PCR unter Verwendung kommerziell erhältlicher Taqman-Sonden (CARP: Mm00496512_m1; HPRT: Mm01324427_m1). Die PCR wurde in einem ABI 5700 SD Real Time PCR-Gerät ausgeführt. Die relative Quantifizierung erfolgte nach der $\Delta\Delta C_t$ Methode mit HPRT als internem Standard.

2.2.2 Amplifikation von CARP mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zunächst wurden die RNA-Proben von CARP mit der reversen Transkriptase behandelt, um eine cDNA herzustellen. Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion wurde die cDNA von CARP amplifiziert. Dabei wurden die Reaktionsbedingungen laut Hersteller unter Verwendung der *Pfx*-DNA-Polymerase berücksichtigt.

Folgende Primerpaare wurden hierfür verwendet:

CARP ATG: AAC ATG ATG GTA CTG AGA GT

CARP Stop: TCA GAA TGT AGC TAT GCG AG.

2.2.3 Auswertung der amplifizierten DNA-Fragmente im Agarosegel

Nach Amplifikation wurden die DNA-Fragmente auf ein 1%-iges Agarosegel (0,006% (v/v) Ethidiumbromid) in 0,5x TAE-Puffer aufgetragen.

Für die Größenbestimmung wurden die Marker Lambda-EcoRI/HindIII und pBluescript-HpaII verwendet. Unter UV-Licht wurden die DNA-Fragmente schließlich photographiert und ausgewertet.

Die Ergebnisse der Amplifikation können im Kapitel 3.1 eingesehen werden.

2.2.4 Reinigung der DNA aus dem Agarosegel

Für die Aufreinigung der einzelnen DNA-Fragmente aus dem Agarosegel wurde das QIAquick Gel Extraction Kit verwendet (Herstellerprotokoll).

Die so aufgereinigten und isolierten DNA-Fragmente wurden an die Kollegin Marian Naguib übergeben, die für die anschließende Klonierung zuständig war.

2.2.5 Zellkultur der HEK293T-Zellen

Als Zellkulturmedium für die HEK293T-Zellen diente DMEM-Medium mit den Mediumzusätzen (10% Fetal Calf Serum – FCS (Biochrom), 2 mM L-Glutamin, 1x non-essential amino acids (Invitrogen), 100 U/ml Penicillin/Streptomycin). Bei einer Konfluenz von 100% wurden die Zellen mit Saline/EDTA gewaschen und mit Trypsin-EDTA (0,5 g/l Trypsin, 0,2 g/l EDTA*4Na) in PBS von der Zellkulturschale abgelöst. Um den Trypsin-Überstand zu beseitigen wurden die Zellen anschließend für 5 Minuten bei 1000 rpm zentrifugiert und auf eine neue Zellkulturschale mit frischem Medium gegeben. Die Zugabe von frischem Medium erfolgte alle 2 Tage.

2.2.6 Transiente Transfektion von CARP in HEK293T-Zellen

Für die Expression der CARP-Fusionsproteine wurden HEK293T-Zellen verwendet. Vorteil dieser Zellen ist die leichte Kultivierung und gute Transfizierbarkeit.

Für eine transiente Transfektion hielt man sich an das Protokoll von Lipofectamine 2000 nach Angaben der Firma Invitrogen.

Die HEK293T-Zellen wurden hierfür in 10 cm-Zellkulturschalen kultiviert. Bei einer Zelldichte von ca. 60-70% erfolgte die Transfektion. Dabei wurden in 1,5 ml Opti-Mem (Invitrogen) 45 µl Lipofectamin für 5 Minuten gelöst, sowie in weiteren 1,5 ml Opti-Mem 18 µg Plasmid-DNA zugegeben. Die Lösungen wurden anschließend

vereint und nach 30 Minuten das Gemisch auf die Zellen gegeben. Nach 2 - 3 Tagen konnten die Zellen für weitere Analysen lysiert werden.

2.2.7 Lentivirale Transfektion von CARP in HEK293T-Zellen

Zur Erzeugung stabil exprimierender Zellen wurden lentivirale Partikel erzeugt, die in der Lage sind Zellen zu infizieren. Die gespeicherte RNA wird analog zu einer viralen Infektion in der Zelle in DNA umgeschrieben und anschließend in das Genom integriert.

Lentivirale Partikel wurden durch Kotransfektion des Expressionsvektors mit zwei Helferplasmiden in HEK293T-Zellen generiert. Ausgehend von dem CMV Promotor wird nun ein langes Transkript gebildet, das die wesentlichen Elemente des HI-Virus enthält, die zur Integration in das Genom einer infizierten Zelle benötigt werden (LTR, Verpackungssignal). Die Helferplasmide vermitteln die Expression anderer wichtiger Faktoren für die Virusproduktion (Hüllprotein VSV-G, Reverse Transkriptase, gag-Protein) [79].

Das Verpackungsplasmid pCZ-VSV-G steht für ein Glykoprotein, das vom vesikulären Stomatitis Virus gebildet wird und an dem 2 Oligosaccharide an den Positionen 178 und 335 hängen [95, 113, 94]. Nach Expression gelangt es über den Golgi-Apparat [10] zur Plasmamembran, wo es für die Ausknospung von Viruspartikeln zuständig ist [93]. Als Oberflächenprotein erkennt es Phospholipide von Wirtszellen und deckt eine große Breite an Wirten ab, wie es die Arbeitsgruppe von Pietschmann T. et al. im Jahre 1999 beschrieben hat. Der HIV-1-Vektor wurde 1996 von Reiser J. et al. entwickelt bzw. modifiziert.

Mit diesem 3-Plasmid-Expressionssystem ist es möglich Pseudotyp HIV-1-Partikel zu generieren, die jedoch nicht vermehrungsfähig sind [91, 79].

Es wurden erneut HEK293T-Zellen für die stabile Transfektion verwendet mit jeweils 5 µg DNA von allen 3 Plasmiden (pCD/NL-BH, pcz-VSV-G), sowie 5 µg CARP und 5 µg pCL1 als Kontrollvektor. Bei der Transfektion wurde das Protokoll der Firma Invitrogen verwendet.

Beide Ansätze wurden nach 10 Minuten vereint und anschließend für 30 Minuten bei RT inkubiert, welches dann schließlich auf die HEK293T-Zellen gegeben wurde. Ca. 6 - 8 h später wurde dem Medium 100 µl 1 M Natriumbutyrat (Endkonzentration 10 mM) hinzugegeben, um die Expression der viralen Bestandteile zu verstärken. Nach

einem Tag wurde das Medium gewechselt, die Viren in 10 ml Medium gesammelt und nach 24 h geerntet. Der Virusüberstand wurde schließlich für die Infektion von HEK293T-Zellen verwendet. Einen Tag später wurde der Virusüberstand entfernt, die Zellen gewaschen und mit frischem Medium versetzt.

Nach ca. 2 - 3 Tagen erfolgte die Expressionsanalyse des Zielproteins im Western-Blot.

2.2.8 Immunhistochemie

Um der Frage nachzugehen, wie sich das Fusionsprotein auf subzellulärer Ebene verhält, wurde ein immunhistochemischer Nachweis durchgeführt.

Dafür wurden Zellkulturschalen der Größe 100 x 20 mm (TPP) mit HEK293T-Zellen verwendet, die bei einer Zelldichte von ca. 65% mit Hilfe von Lipofectamine 2000 (Invitrogen) transfiziert wurden. Als Medium diente DMEM (GIBCO Invitrogen) mit 1% Non-Essential Amino Acids (GIBCO Invitrogen), 1% Glutamax (GIBCO Invitrogen), 1% Penicillin-Streptomycin (GIBCO Invitrogen) und 10% inaktiviertes FCS. Nach 2 - 3 Tagen wurden die Zellen gewaschen, trypsinisiert, ausgezählt und auf Objektträger übertragen, die mit abnehmbaren Kammern versehen waren, sogenannte Chamber Slides. In jede Kammer wurden ca. 150.000 Zellen pipettiert. Am nächsten Tag wurde das Medium abgenommen und die Zellen 1x mit 1 ml PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen mit Zamboni-Fixativ [108] für 10 Minuten fixiert und anschließend 3x für jeweils 5 Minuten auf dem Schüttler mit 1 ml PBS gewaschen. Die Zellen wurden dann für 5 Minuten mit 1 ml 0,3%iger Saponin-Lösung in PBS auf einem Schüttler inkubiert.

Um unspezifische Interaktionen zu vermeiden, wurde 10%iges normales Ziegenerum verwendet, daß 15 Minuten lang einwirken musste.

Zur Detektion des Fusionsproteins über die Interaktion der ZZ-Domäne mit dem Fc-Teil eines Immunglobulins wurde ein Sekundär-Ak aus dem Kaninchen der Firma Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc. verwendet. Dieser Antikörper wurde 1:100 (Rhodamine Red-X-conjugated AffiniPure Rabbit Anti-Goat IgG) in 2% Normal Goat Serum-Lösung und 0,1% Saponin in PBS verdünnt. Von dieser Lösung wurden 500 µl auf die Chamber Slides gegeben und in einer Dunkelkammer für 1 h inkubiert. Zum Schluß wurden die Zellen 2x für jeweils 5 Minuten mit 0,1%iger Saponin-Lösung gewaschen. Die Kammerwände wurden abgenommen und die Zellen noch einmal für 2 Minuten in PBS eingelegt. Schließlich wurden die Zellen mit

Fluoromount von Bio Trend fixiert und luftdicht mit einem Objektgläschen verschlossen.

2.2.9 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und Western Blot-Analyse

Der Nachweis der Fusionsproteine erfolgte mittels Western Blot-Analyse.

Aus den einzelnen Reinigungsfraktionen wurden entsprechende Mengen für die Western Blot-Analyse entnommen (z. B. 100 µg Gesamtprotein aus Zellextrakt).

Nach Zugabe von Lämmli-Puffer und DTT wurden die Proben für 5 Minuten bei 95°C im Thermomixer comfort der Firma Eppendorf AG inkubiert und anschließend auf ein 10%iges SDS-Acrylamid-Gel (10 ml Acrylamid/Bis-Lösung, 1,5 M Tris pH 8,8, 400 µl 10% SDS, 20 ml H₂O, 80 µl TEMED, 100 µl 10% APS - Ammoniumpersulfat) aufgetragen. Das Gel lief über Nacht bei maximal 50 V. Am nächsten Tag wurden die aufgetrennten Proteine in einer Blotkammer mit Blotpuffer (800 ml vergälltes Äthanol, 400 ml 10x Tris-Glycin, 20 ml 10% SDS, ad 4 l demineralisiertes Wasser) bei 400 mA und 8 – 10 V für ca. 2 h auf Nitrocellulosemembran übertragen.

Um den Transfer der Proteine zu beurteilen, wurde die Nitrocellulosemembran für 1 - 2 Minuten mit Ponceau S gefärbt. Die Rotfärbung des Proteinmusters wurde anschließend durch TBS-Tween wieder entfärbt und anschließend die Nitrocellulosemembran für 1 h in Milch (1x TBS, 5% Milchpulver, 0,1% Tween) inkubiert. Der Primär-Ak Anti-Flag kam für 1 h in einer Konzentration von 1:7500 (in 5% Magermilch) auf die Membran. Nach der Inkubation wurde die Membran für 20 – 30 Minuten mit TBS-Tween gewaschen und anschließend der Sekundär-Ak (HRPO gekoppelter rabbit Anti-Maus) in einer Konzentration von 1:10.000 für 1 h hinzugegeben. Die behandelte Membran wurde erneut in TBS-T gewaschen. Schließlich wurden die Proteinbanden mittels Enhanced Chemilumineszenz (ECL, GE Healthcare) auf einem Röntgenfilm visualisiert.

2.2.10 Silbergefärbung

Die SDS-Acrylamidgele wurden nach erfolgter Proteintrennung mittels Silberfärbung weiter behandelt. Folgende Lösungen kamen hierbei zum Einsatz:

Fixierer I	Essigsäure Methanol Millipore-Wasser	50 ml 500 ml auf 1000 ml
------------	--	--------------------------------

Fixierer II	Methanol Millipore-Wasser	500 ml auf 1000 ml
Thiosulfat-Reagenz	Natriumthiosulfat (0,02%) Millipore-Wasser	200 mg auf 1000 ml
Silbernitrat-Reagenz	Silbernitrat Formaldehyd (37%) Millipore-Wasser	2 g 200 µl auf 1000 ml
Entwickler	Natriumcarbonat Formaldehyd (37%) Natriumthiosulfat (0,0005%) Millipore-Wasser	30 g 500 µl 5 mg auf 1000 ml
Stop-Reagenz	5% Essigsäure	
Lagerung	1% Essigsäure bei 4°C	

Tab. 1: Silbergefärbung. Die Tabelle zeigt das Protokoll für die Silberfärbung von SDS-PAGE-Gelen

Nach beendetem Lauf wurde das SDS-Acrylamidgel zuerst für 20 Minuten mit Fixierer I behandelt. Nach Verwerfen von Fixierer I wurde das Gel 2x in Fixierer II für jeweils 10 Minuten inkubiert und anschließend für 10 Minuten in Wasser gewaschen. Nach Inkubation in Thiosulfat-Reagenz für 1 Minute wurde das Gel 3x für jeweils 20 Sekunden mit Wasser gespült. Es folgte nun die Reaktion mit dem Silbernitrat-Reagenz für ca. 20 Minuten. Anschließend wurde das Gel erneut mit Wasser 3x für 20 Sekunden gewaschen.

Durch den Entwickler wurden die Proteinbanden visualisiert. Die Inkubationszeit betrug ca. 5 – 10 Minuten. Dabei wurde die Färbung der Proteinbanden beobachtet und bei entsprechender Intensität die Reaktion gestoppt, um eine Überfärbung zu verhindern.

Das Gel wurde zum Schluß 3x mit Wasser für jeweils 20 Sekunden gewaschen und anschließend in Stop-Lösung für 5 Minuten gegeben. Das gefärbte Gel stand für die Analyse bereit oder wurde bei 4 °C gelagert.

2.2.11 Proteinmengenbestimmung – Lowry

Zur Bestimmung der Proteinmenge einzelner Aufreinigungsfractionen diente als Referenz eine Verdünnungsreihe mit BSA. Die absteigenden Konzentrationen betragen 1, 0,5, 0,35, 0,25, 0,175, 0,1, 0,07, 0,03 und 0 µg BSA/ml.

Die Proteinproben wurden 1:10 mit Wasser verdünnt. Je 50 µl dieser Verdünnung wurde in 1,5 ml Eppendorf-Gefäße mit 200 µl Wasser pipettiert.

Als Referenz diente eine gleiche Menge des Lysispuffers (verdünnt mit Wasser auf 1:10).

Im folgenden Schritt wurde eine alkalische CuSO_4 -Lösung zu den Proben gegeben. Diese wurde aus 2 Einzellösungen hergestellt. Lösung 1 beinhaltete 40 g Na_2CO_3 in insgesamt 500 ml 0,1 M NaOH, Lösung 2 aus 0,5 g $\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ und 1 g K-Na-Tartrat in 100 ml 0,1 M NaOH. Beide Lösungen wurden im Verhältnis 1:50 frisch zusammengegeben. Von dieser Reagenzlösung wurde 1 ml in alle einzelne Proben gegeben und 10 Minuten stehen gelassen. Anschließend wurden 100 µl eines 1:1 verdünnten Folin-Ciocalteus Phenolreagenz hinzugegeben und die Proben wieder für 30 Minuten bei RT stehen gelassen.

Danach wurden alle Proben kurz abzentrifugiert und in Photometer-Küvetten umgefüllt.

Die Messung erfolgte bei einer Wellenlänge von 578 nm und die Auswertung mittels Excel-Tabelle.

2.2.12 Zellfraktionierung

Eine andere Methode die Lokalisation unseres Fusionsproteins zu bestimmen war die Zellfraktionierung.

Von transfizierten Zellen wurden nach Lyse die Kerne vom Zytoplasma abgetrennt und die einzelnen Fraktionen auf die relative Verteilung von CARP untersucht.

Dafür verwendete ich transient transfizierte HEK293T-Zellen in einer 10 cm Zellkulturschale, die zuvor 2x mit PBS gewaschen wurden. Die Zellen wurden dann in 1 ml Lysispuffer mit 15 µl PMSF und 20 µl Proteinase-Mix aufgeschlossen bei einer Einwirkzeit von ca. 3 Minuten und dann in einem Eppendorf-Gefäß aufgenommen. Unter dem Mikroskop kontrollierte ich die komplette Lyse der Zellwände bis die Zellkerne deutlich zu sehen waren.

Das Lysat wurde dann für 3 Minuten bei 4°C mit 500xG zentrifugiert, anschließend der Überstand in ein neues Eppendorf-Gefäß gegeben und das Pellet in 1 ml Lysispuffer aufgenommen.

Nach der Proteinmengenbestimmung (Lowry) wurden beide Proben in SDS gekocht und jeweils das gleiche Volumen auf das Acrylamidgel aufgetragen. Die Western-Blot-Analyse erfolgte durch Umsetzung der Nitrozellulose-Membran mit dem

monoklonalen Primärantikörper Anti-Flag (M2) und dem HRPO-gekoppelten Sekundär-Ak Anti-Maus aus dem Kännchen.

2.2.13 Tandem-Affinitäts-Reinigung (TAP)

Im Rahmen der Etablierung wurden zahlreiche Tags mit unterschiedlichen synthetischen Oligonukleotiden erzeugt. Die Arbeit der Klonierung übernahm Dipl. Biotech. Dr. rer. nat. Marian Naguib und die fertigen Plasmide wurden mir zur Verfügung gestellt.

Ziel meiner Arbeit war es die Tandem-Affinity-Purification-Methode am Beispiel des CAR-Proteins zu etablieren. Das Protokoll für die TAP-Aufreinigung (ursprünglich von Rigaut et al. 1999, Puig et al. 2001) wurde mehrmals modifiziert und speziell für CARP etabliert.

Nach transienter bzw. lentiviraler Transfektion von HEK293T-Zellen und einigen Tagen Inkubationszeit wurde das Kulturmedium entnommen und die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend in 1 ml Lysispuffer bei einem pH von 7,5 nach Seraphin (10 mM, Tris-Cl pH 8, 150 mM NaCl und 0,1% IGEPAL CA-630) aufgeschlossen (1 ml pro 10 cm Zellkultur-Petrischale). Kurz vor Verwendung des Lysispuffers gaben wir 15 µl PMSF und 20 µl Proteinase-Inhibitor-Mix pro ml Lysispuffer hinzu.

Im Folgenden wird das optimierte Protokoll beschrieben. Einzelheiten der Optimierungsarbeit entnehmen Sie bitte dem Ergebnisteil.

Zur Aufreinigung unseres Fusionsproteins wurden die Econo-Säulen der Firma Biorad verwendet.

Die transient transfizierten HEK293T-Zellen wurden mit PBS gewaschen, mit Lysispuffer lysiert (1 ml Lysispuffer/10 ml Zellkulturschale) und für 5 Minuten auf Eis gestellt. Mit einem Zellschaber wurden die Zellen von der Zellkulturschale gelöst und in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß gegeben. Der Zell-Detritus wurde für 15 Minuten bei 4°C und 500xG abzentrifugiert und der Überstand für die TAP-Aufreinigung verwendet.

Die Chromatographie-Säulen (Biorad Econo-Säulen) wurden mit destilliertem Wasser ausgespült und anschließend mit 200 µl M2-Anti-Flag-Agarose-Beads befüllt,

die vorher mit Lysispuffer gewaschen und äquilibriert worden. Das Zelllysat wurde auf die Säule aufgetragen und bei einer Geschwindigkeit von ca. 10 Tropfen/Minute bei RT für ca. 1 h laufen gelassen. Der Durchlauf wurde auf Eis gestellt und für weitere Analysen aufgehoben.

Anschließend wurde die Säule 2x mit jeweils 1 ml TBS gewaschen. Die Elution erfolgte mit Flag-Peptid (300 µg/ml TBS). Insgesamt wurde 4x 250 µl Flagpeptid-Lösung für die Elution der gebundenen Proteinkomplexe benötigt. Alle Eluate wurden aufgehoben und auf Eis gestellt und die Affinitätsmatrices in 1 ml TBS resuspendiert.

Für die zweite Aufreinigung wurden die Econo-Säulen mit 10 ml destilliertem Wasser gewaschen, mit Strep-Waschpuffer aufgefüllt sowie mit 200 µl Streptactin-Sepharose gefüllt. Das Flag-Eluat wurde auf das Säulenmaterial gegeben mit einer Geschwindigkeit von ca. 10 Tropfen/Minute bei RT. Auch hier wurde der Durchlauf aufgehoben und auf Eis gestellt. Das Säulenmaterial wurde schließlich 2x mit Strep-Waschpuffer gewaschen. Die Elution erfolgte mit 2,5 mM Biotin in Strep-Puffer. Es wurden 4 Elutionsschritte mit einem jeweiligen Volumen von 250 µl durchgeführt. Streptactin-Sepharose wurde schließlich mit 1 ml Strep-Puffer gewaschen. Alle Proben (Zelllysat, Durchlauf, Waschproben, Elutionsproben und Beadfraktionen) wurden gesammelt und auf das SDS-Gel äquivalometrisch aufgetragen.

3. Ergebnisse

3.1 Expression von CARP bei kardialer Hypertrophie verschiedener Genese

In einem ersten Ansatz wurde mittels Real Time rtPCR untersucht, inwieweit die Expression von CARP bei verschiedenen Modellen der Herzinsuffizienz in der Maus heraufreguliert wird.

Die RNA wurde aus Myokardproben gewonnen, die mir Dr. Andrei Molojavyi im Rahmen der funktionellen Charakterisierung der verschiedenen Modelle zur Verfügung stellte.

Die Untersuchung erfolgte einerseits an einem Mausmodell, bei dem durch partielle Ligatur des Aortenlumens (transversale Aortenkonstriktion, TAC) eine Druckbelastung des Herzens ausgelöst wurde, in

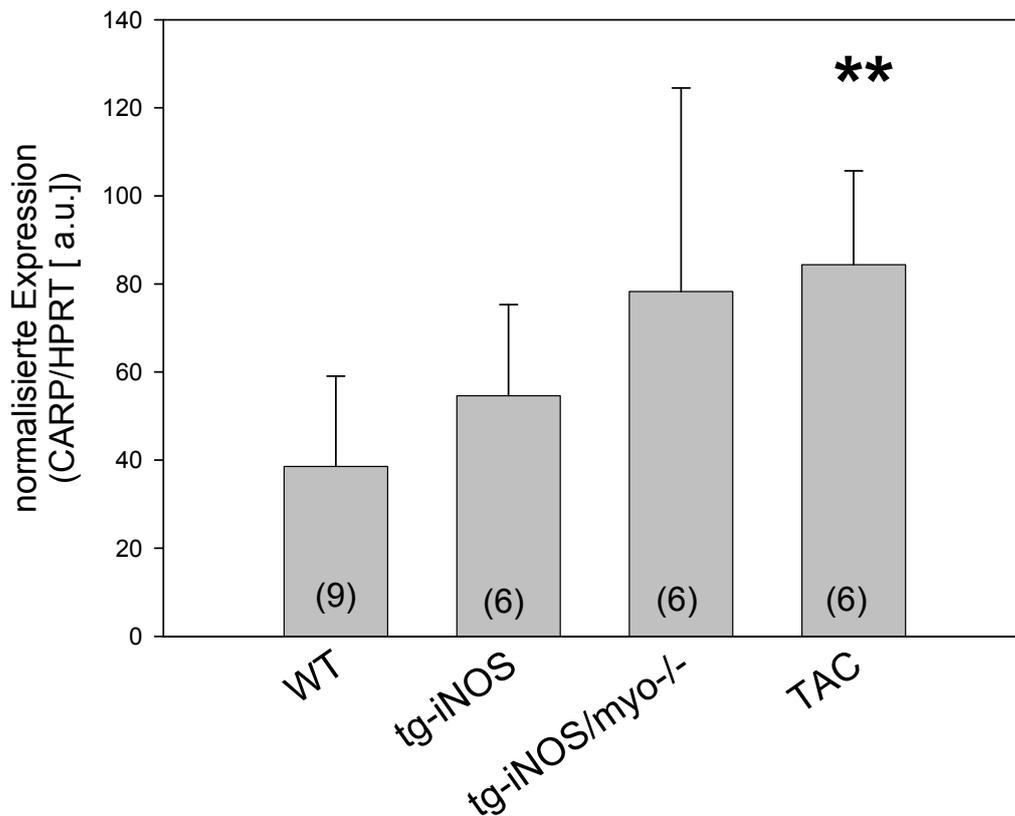


Abb. 6: Analyse der CARP Expression. Die Expression von CARP wurde mittels RT-PCR an RNA-Proben des Herzens analysiert. Das Transkript für die Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (HPRT) diente als internaer Standard für die Normalisierung. WT: Wildtyp Maus; myo^{-/-}: Myoglobin-defiziente Maus, tg-iNOS: Mäuse mit Kardiomyozyten-spezifischer Überexpression der induzierbaren NO Synthase; tg-iNOS/myo^{-/-}: Kardiomyozyten-spezifische iNOS Überexpression bei Myoglobindefizienz; TAC: transversale Aortenkonstriktion. ** P<0.01 vs. Wildtyp. Die Zahlen in Klammern geben die Zahlen der analysierten Herzen an.

deren Folge das Herz eine Hypertrophie entwickelt (funktionelle Daten s. Anhang). Ferner stand für diese Arbeiten das Modell einer NO-induzierten dilatativen Kardiomyopathie (DCM) zur Verfügung, bei dem in Myoglobin-defizienten Mäusen die induzierbare NO Synthase spezifisch in Kardiomyozyten überexprimiert wird. Es zeigte sich, dass nur Mäuse mit einem kompletten Fehlen des Myoglobins Herzerkrankungen aufwiesen wie Hypertrophie, Ventrikeldilatation und reduzierte Pumpfunktion. Myoglobin schien somit eine protektive Wirkung auf das Herz zu haben und die fatalen Folgen von iNOS zu verhindern [45].

Die DCM ist bei Tieren bereits im Alter von drei Monaten nachweisbar (funktionelle Daten s. Anhang). Zum Vergleich wurden die Ausgangsstämme tg-iNOS36 (300-fach gesteigerte iNOS-Aktivität im Herzen) [54] und myo^{-/-} (Myoglobin-knockout Mäuse) [44] analysiert. Die Herzen der Myoglobin-knockout Mäuse zeigen keine Kontraktilitätssteigerung trotz hoher Katecholamindosen. Kompensatorisch haben die Myoglobin-defizienten Herzen einen erhöhten Koronarfluss sowie –reserve, auch die Dichte der KapillargefäÙe in diesen Herzen war höher.

Abb. 6 zeigt das Ergebnis der real-time RT-PCR-Analyse. TAC führte zu einer signifikanten Steigerung der CARP Expression im Vergleich zu WT Herzen. Eine vergleichbare Zunahme des Mittelwerts wurde auch in Herzen von tg-iNOS/myo^{-/-} Tieren gefunden. Allerdings führten hohe Standardabweichungen nicht zu einem signifikanten Unterschied im Vergleich zum WT ($p=0.09$). In den tg-iNOS Tieren kam es zu keiner signifikant veränderten Expression des CARP Gens.

In einer weiteren Serie wurde die CARP-Expression in Herzen nach Isoproterenol induziertem Stress untersucht.

Bei diesem Modell wird durch kontinuierliche Gabe des β -adrenergen Agonisten Isoproterenol eine Dauerstimulation des Herzens induziert, die zur schnellen Entwicklung einer Herzinsuffizienz mit Funktionsabnahme, Fibrose und ventrikulärer Dilatation führt (funktionelle Daten s. Anhang).

Abb. 7 zeigt, dass im Vergleich zum WT Isoproterenol nicht zur Induktion der CARP-Expression führte, obwohl die Herzen eine dilatative Kardiomyopathie entwickelt hatten.

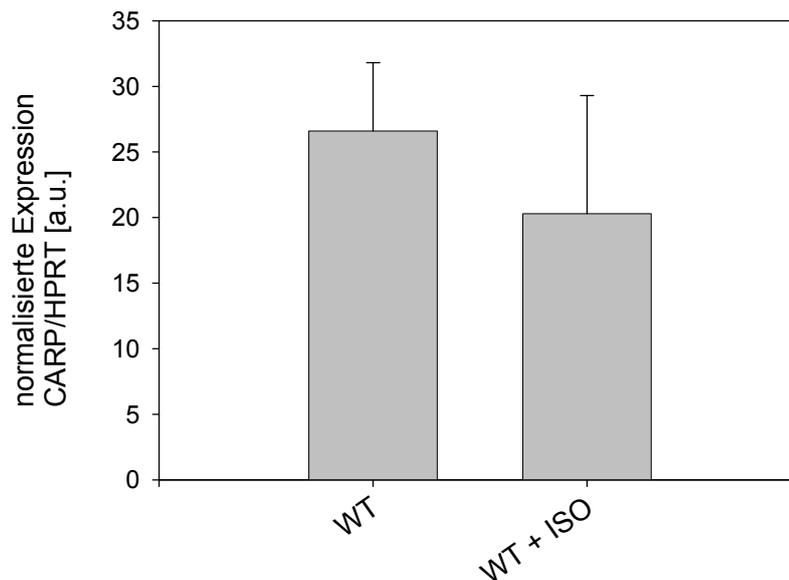


Abb. 7: Analyse der CARP Expression bei Isoproterenol induzierter Herzinsuffizienz. Expression von CARP wurde mittels RT-PCR an RNA-Proben des Herzens analysiert. Das Transkript für die Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (HPRT) diente als internaer Standard für die Normalisierung. WT: Wildtyp Maus; WT + ISO: Wildtyp Maus nach 14 d Applikation von Isoproterenol (4 mg/kg/d) Es wurden je n=6 Herzen analysiert.

3.2 Klonierung der CARP cDNA und Herstellung der Plasmid-DNA

Neben der Expressionsanalyse war es Ziel dieser Arbeit, die Tandemaffinitätsreinigung (TAP) am Beispiel des CAR-Proteins zu etablieren.

Aufbauend auf einem in Säugerzellen funktionierenden Protokoll könnten in der Folge Bindungspartner des CARP isoliert werden, die einen Hinweis auf die Funktion von CARP z. B. bei der Entwicklung einer kardialen Hypertrophie geben könnten.

In einem ersten Schritt musste die cDNA des CARP kloniert und daraus das CARP-TAP-Tag-Fusionsprotein hergestellt werden. Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion wurde die cDNA amplifiziert. Für die einzelnen PCR-Ansätze wurden fertige cDNA-Proben aus Mäuseherzen verwendet, die zuvor mit der reversen Transkriptase behandelt wurden. Die RNA wurde somit in DNA umgeschrieben und davon über die Polymerasekettenreaktion die cDNA amplifiziert. Die Größe der cDNA beträgt ca. 960 bp. Folgende Primerpaare wurden hierfür verwendet:

Fwd: AACATGATGGTACTGAGAGT

Rev: TCAGAATGTAGCTATGCGAG

Für eine optimale Amplifikation der cDNA-Sequenz mit geringer Fehlerrate wurde die Pfx-DNA-Polymerase unter Berücksichtigung der Herstellerbedingungen eingesetzt. Anschließend wurden die Fragmente in einem 1%igen Agarosegel (Ethidiumbromidhaltig, 0,5x TAE-Puffer) aufgetrennt und ausgewertet. Die Proben wurden im DNA-Ladepuffer vorbereitet und für 1 h bei 100 V aufgetrennt. Als Größenstandard diente der Lambda-EcoRI/HindIII-Marker.

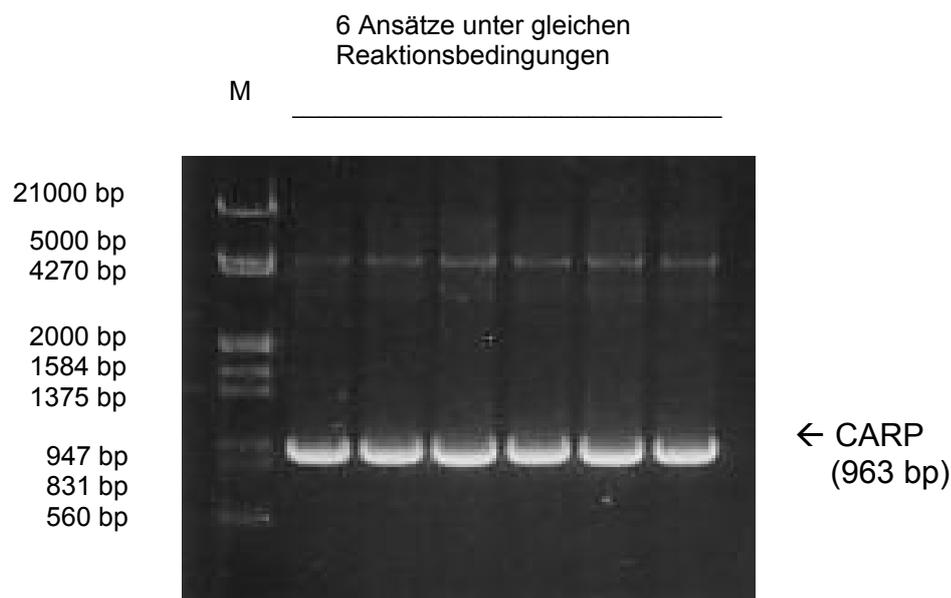


Abb. 8: Ergebnis der Amplifikation der CARP cDNA. Als Größenstandard dient Lambda-EcoRI/HindIII (M). Die CARP Fragmentgröße beträgt 963 bp. Bei der Amplifikation wurde das Stop-Codon C-terminal der cDNA des CARP ausgelassen, um eine Fusion mit dem Doppeltag im Leseraster zu gewährleisten. Die Verknüpfung der Tags an das CARP erfolgte C-terminal. Alle 6 Reaktionsansätze erfolgten unter den gleichen Bedingungen. M: Größenstandard λ Eco/Hind.

Anschließend wurden die einzelnen Banden unter UV-Licht mit einem sauberen Skalpell ausgeschnitten und die cDNA aus dem Agarosegel isoliert.

Für die Isolierung wurde das NucleoSpin® Ready-to-use System der Firma Macherey-Nagel verwendet unter Berücksichtigung des Firmenprotokolls.

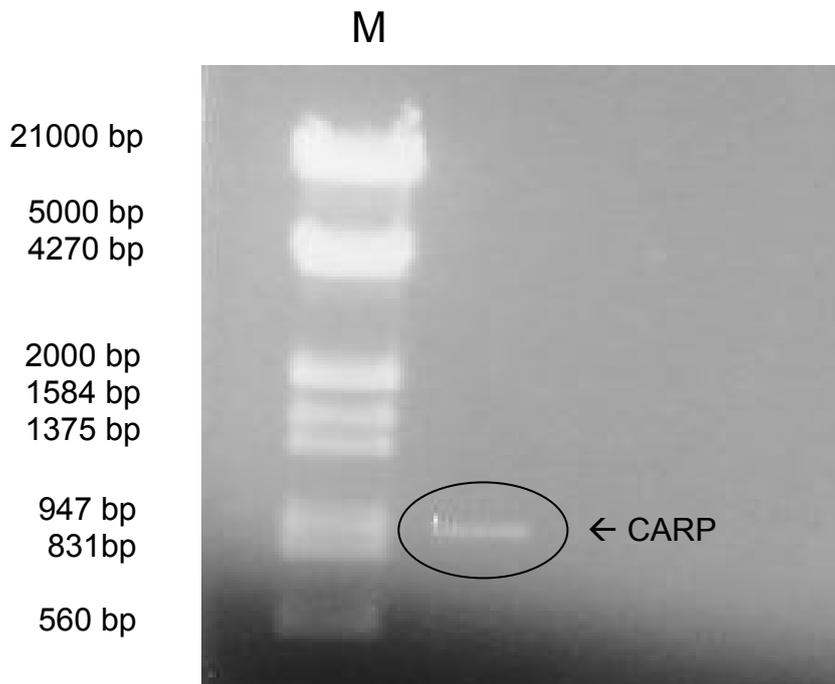


Abb. 9: Isoliertes CARP cDNA-Fragment. 1%iges Agarosegel mit isoliertem CARP-Fragment. Nach Isolierung aus dem Agarosegel erfolgte die Mengenbestimmung mit Hilfe des Photometers (Nanodrop) durch Bestimmung von OD_{260} . Für die Reinheit der Proben wurde der Quotient OD_{260}/OD_{280} mit Hilfe der Software ND 1000 3.2.1 ermittelt. Als Größenstandard diente erneut Lambda-EcoRI/HindIII (M). Die Auswertung ergab eine Konzentration von ca. 4 ng/ μ l.

Das isolierte und gereinigte CARP-Fragment (Abb. 9) wurde mit der Vektor-DNA pGJ3-CSCGW ligiert (Abb.10). Die Ligation erfolgte unter Verwendung der T4 DNA-Ligase (4 h bei RT), wobei das Verhältnis zwischen Insert-DNA und Vektor-DNA 3:1 betrug.

Anschließend erfolgte die Transformation kompetenter E. Coli-Zellen XL-1-Blue. Zunächst wurden die Zellen mit dem Ligationsansatz für ca. 30 – 60 Minuten auf Eis inkubiert und dann für ca. 60 – 90 Sekunden bei 42°C einem Hitzeschock ausgesetzt. Schließlich wurden die Zellen wieder auf Eis inkubiert und 200 μ l LB-Medium ohne Ampicillin hinzugegeben. Bevor die Zellen auf eine Ampicillin-haltige LB-Agarplatte ausgestrichen werden konnten, wurden diese für 1 h bei 37°C in einem Wärmeblock bei 800 rpm geschüttelt.

Die transformierten Zellen wurden über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Kolonien in 2 ml-Minikulturen angeimpft und ebenfalls über Nacht bei 37°C und 300 rpm geschüttelt.

Das klonierte Plasmid wurde über Restriktionsanalysen auf Insertion und die richtige Orientierung hin überprüft (mündliche Mitteilung von Dipl. Biotech. Dr. Marian Naguib). Schließlich wurde die somit hergestellte Plasmid-DNA in HEK293T-Zellen transfiziert.

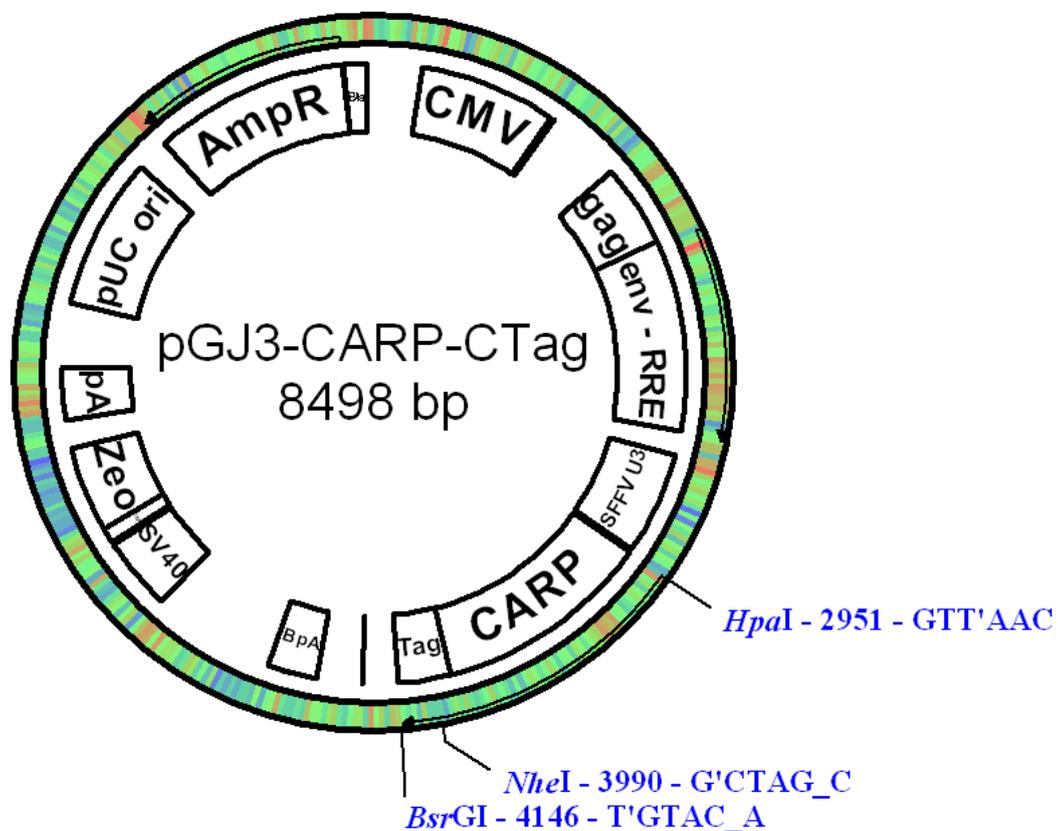


Abb. 10: Das Plasmid pGJ3-CARP-C-Tag. Ausgehend von diesem Plasmid wurde die Aufreinigung von CARP über die Tags CBP – Calmodulin binding peptide, der TEV-Spaltungsstelle sowie der ZZ-Domäne des Protein A begonnen. Der Name C-Tag steht allgemein für die verschiedenen Tags, die im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden. Die Restriktionsschnittstellen HpaI und NheI sind für alle nachfolgend beschriebenen Klonierungen von Bedeutung. Die Antibiotikaresistenzen beruhen auf Ampicillin und Zeo (Zeozin Resistenzgen). Darüber ist es möglich eine erfolgte Transformation von E. coli-Zellen auf ampicillinhaltigen-Agarplatten zu selektionieren. Der SFFV (spleen focus forming virus) Promotor, wird für die Expression des Fusionsprotein genutzt. Gag und env – RRE sind virale Elemente, die für die Verpackung viraler RNA in Viruspartikel zuständig sind. Die bakteriellen Replikationsursprünge befinden sich in der Region pUC ori (pUC Replikationsursprung) sowie F1 ori (Replikationsursprung Bakteriophage 1). SV40pA dient als Polyadenylierungssignal.

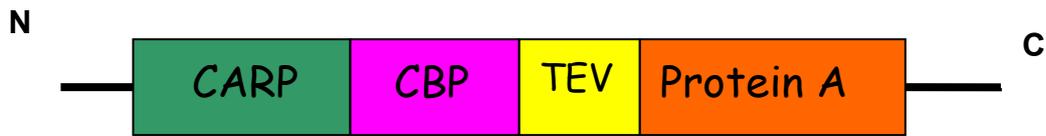


Abb. 11: Das Fusionsprotein CARP-CBP-TEV-ZZ. Die cDNA von CARP wurde zunächst über die Polymerase-Kettenreaktion amplifiziert und mit dem CBP-TEV-Protein A –Tag fusioniert. Das fertige Konstrukt wurde in den Vektor pGJ3 inseriert und als Plasmid pGJ3-CARP-CTag in HEK293T-Zellen transfiziert.

3.3 Expressionsanalyse des Fusionsproteins CARP-CBP-TEV-ZZ

Bei dem ersten CARP Fusionsprotein handelte es sich um eine Fusion der CARP cDNA mit dem in Hefe erfolgreich eingesetzten CBP-TEV-ZZ-Tag. Zunächst musste nun untersucht werden, ob die transfizierten Zellen das Fusionsprotein exprimieren. Nach transients Transfektion in HEK293T-Zellen erfolgte die Expressionsanalyse des Fusionsproteins CARP-CBP-TEV-ZZ mit Hilfe der SDS-PAGE und der Western Blot-Analyse.

Die Zellen wurden in Lysispuffer aufgeschlossen, das Zelllysat aufgetrennt und anschließend auf Nitrozellulose transferiert. Für die Detektion des Fusionsproteins wurde ein Peroxidase-gekoppelter Sekundärantikörper aus dem Kaninchen verwendet, der die IgG-bindende ZZ-Domäne des Tags erkennt.

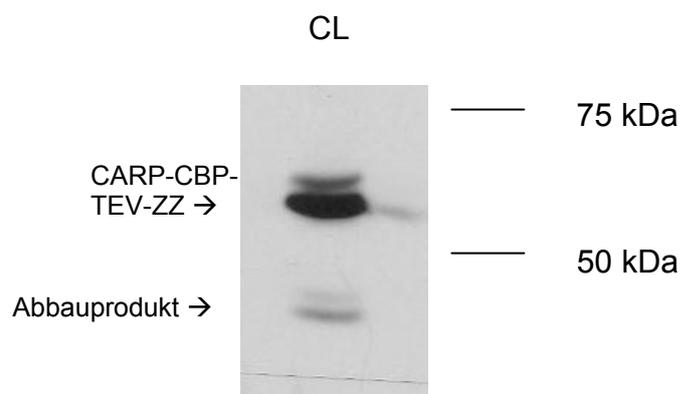


Abb. 12: Expressionsanalyse des Fusionsproteins CARP-CBP-TEV-ZZ in HEK293T-Zellen. Das Lysat transfizierter HEK293T-Zellen wurde über ein SDS-PAGE-Gel aufgetrennt und auf Nitrozellulose transferiert. Die Detektion erfolgte mit einem Peroxidase gekoppelten Kaninchen anti Maus IgG Antikörper, der über seinen Fc-Teil an die ZZ-Domäne des CARP-Fusionsproteins bindet. Der Nachweis erfolgte auf Röntgenfilmen unter Verwendung des Enhanced

Chemiluminescence Systems (ECL-Amersham). Die Größe des Fusionsproteins CARP-CBP-TEV-ZZ beträgt 56 kDa. Die Kontrolllysate zeigten kein CARP entsprechendes Signal. CL: Zellysat.

Abb. 12 zeigt das Ergebnis der Autoradiographie.

Nach transienter Transfektion von HEK293T-Zellen konnte das Zielprotein mittels eines Sekundär-AK aus dem Kaninchen visualisiert und auf Höhe von 56 kDa dargestellt werden. Ein ca. 15 kDa leichteres Abbauprodukt trat neben dem CARP Fusionsprotein auf.

3.4 Lokalisation des Fusionsproteins CARP-3xFLAG-TEV-ZZ auf subzellulärer Ebene

In weiteren Untersuchungen sollte geklärt werden, ob CARP-Fusionsproteine sich auf subzellulärer Ebene ähnlich verhalten wie für das endogene CARP berichtet wurde.

Die Frage war, ob das rekombinant hergestellte CARP-Fusionsprotein mit seinen beiden Tags, in diesem Falle CARP-3xFlag-TEV-ZZ (s. S. 42), eine ähnliche Lokalisation im Kern und im Zytoplasma aufwies.

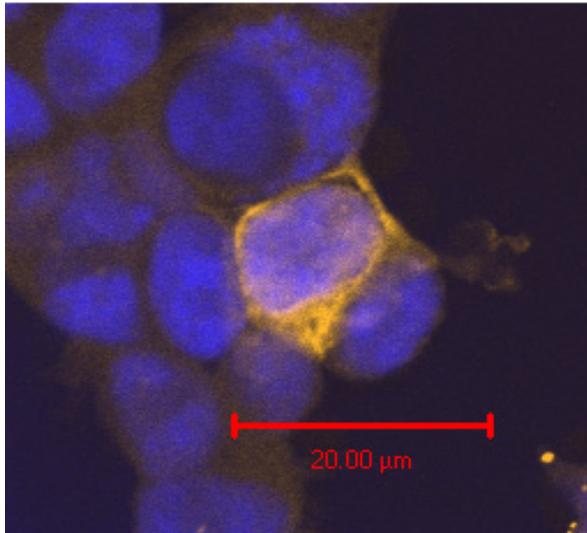
Um dies zu überprüfen wurden Chamber-Slides (Nunc) verwendet, die vier einzelne Kulturkammern auf einem Objektträger tragen. CARP-3xFlag-TEV-ZZ transfizierte HEK293T-Zellen sowie untransfizierte Kontrollzellen wurden in den jeweiligen Kammern ausgesät und 24 h später nach dem Protokoll für die Zamboni-Fixation [108] behandelt (siehe Kapitel 2.2.8).

Die Immunfluoreszenz-Detektion erfolgte mittels eines Rhodamin-gekoppelten Kaninchen-anti-Maus Antikörpers, wobei die spezifische Interaktion über die Bindung des Fc-Teils des IgGs an die ZZ-Domäne erfolgte. Anschließend wurden die Zellkerne mit DAPI gefärbt und die subzelluläre Lokalisation mittels Laser-Scanning-Mikroskop betrachtet.

Abb. 13 zeigt exemplarisch eine CARP exprimierende Zellen neben nicht-exprimierenden Zellen. Insbesondere Abb. 13 B zeigt, dass das CARP-Fusionsprotein sowohl im Plasma als auch im Kern lokalisiert war.

Somit verhielt sich das CARP-Fusionsprotein wie für das endogene CARP in der Literatur beschriebenen worden war [119, 60, 59].

A)



B)

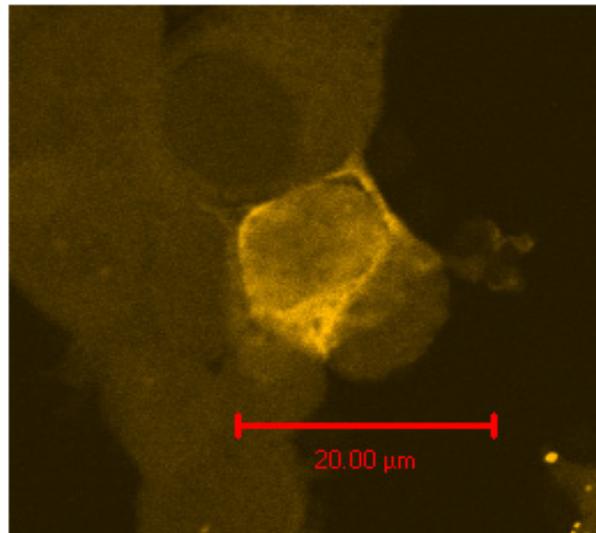


Abb. 13: Lokalisation des Fusionsproteins CARP-3xFlag-TEV-ZZ in HEK293T-Zellen unter der Laser-Scanning-Mikroskopie. Analyse transient transfizierter HEK293T-Zellen mit dem Fusionsprotein CARP-3xFlag-TEV-ZZ im konfokalen Laserscanningmikroskop. Die Markierung erfolgte mittels Rhodamine-gekoppelter Sekundär-AK auf Chamber Slides. Gleichzeitig wurde eine DAPI-Kernfärbung durchgeführt. A: gleichzeitige Darstellung des CARP-Fusionsproteins (orange) und der Zellkerne (blau). B: Nachweis nur von CARP.

3.5 Zellfraktionierung

Zusätzlich zur Immunfluoreszenz wurde eine Fraktionierung transfizierter HEK293T-Zellen durchgeführt. Hierfür wurden transient transfizierte HEK293T-Zellen verwendet, die in diesem Fall das Fusionsprotein CARP-3xFlag-TEV-Strep (vgl. S. 47) exprimierten. 48 h nach Transfektion wurden die Zellen zunächst mit PBS gewaschen, in Lysispuffer aufgenommen und anschließend das Zelllysate 10 Minuten bei 4°C und 500xG abzentrifugiert.

Die zytoplasmatische Fraktion befand sich im Überstand und die Kerne im Sediment. Der Überstand wurde abgenommen und in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt.

Auf das Sediment wurde das gleiche Volumen an Lysispuffer hinzugegeben und für das SDS-Polyacrylamidgel von beiden Fraktionen das gleiche Volumen aufgetragen. Im Anschluss an den Western Blot wurde die Membran zunächst mit dem M2-anti-Flag-Antikörper (1:1000) und anschließend mit einem Peroxidase-gekoppelten anti-Maus-Antikörper behandelt und das Fusionsprotein mittels ECL auf einem

Röntgenfilm nachgewiesen. Abb. 14 zeigt, dass der überwiegende Anteil des Fusionsproteins im Zellkern zu finden war.

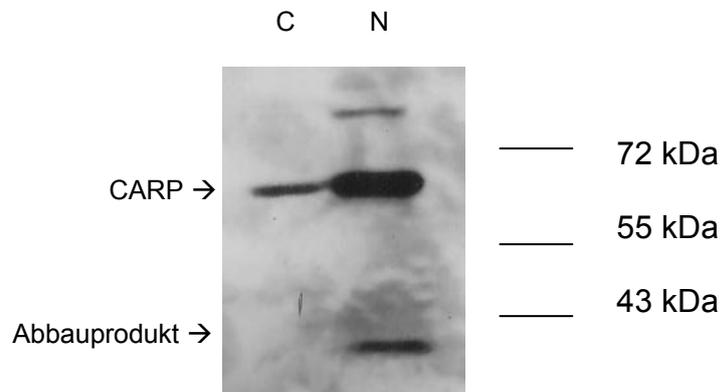


Abb. 14: Zellfraktionierung von HEK293T-Zellen nach transienter Transfektion mit dem Fusionsprotein CARP-1xFLAG-TEV-STREP. Die transfizierten Zellen wurden in Lysispuffer aufgenommen und für 10 Minuten bei 4°C und 500xG abzentrifugiert. Überstand und Pellet wurden separiert und auf das Pellet das gleiche Volumen an Lysispuffer hinzugegeben. Für das SDS-Polyacrylamidgel wurden von beiden Fraktionen jeweils gleiche Volumenanteile aufgetragen. C: Zytosol, N: Zellkern.

3.6 Etablierung der Aufreinigung von CARP mittels TAP-Methode

Nachdem das CARP-C-Tag Fusionsprotein wie in der Literatur beschrieben, sowohl im Kern als auch im Cytoplasma nachgewiesen wurde, erfolgte in weiteren Experimenten die Tandemaffinitätsreinigung.

3.6.1 Fusionsprotein CARP-3xFLAG-TEV-ZZ

Das Fernziel bei der Optimierung der TAP-Methode in unserer Arbeitsgruppe sollte eine Anwendbarkeit dieser Technologie in kultivierten Zellen bis hin zu transgenen Mäusen sein, in denen das getaggte Zielprotein Zelltyp-spezifisch exprimiert werden soll. Da CARP in Kardiomyozyten exprimiert wird, ist es das langfristige Ziel, mittels TAP spezifische CARP-Interaktionspartner aus den Herzen transgener Mäuse zu isolieren und in vivo-Bindungspartner von CARP zu identifizieren. Unter diesem Gesichtspunkt erschien die Verwendung der Ca^{2+} -abhängigen Interaktion des Calmodulin-bindenden Peptids mit dem Calmodulin als ungeeignet, da in Kardiomyozyten Calmodulin Ca^{2+} -abhängig während der Kontraktion mit dem Tag

interagieren könnte. Daher sollte das CBP-Tag durch ein anderes Tag ersetzt werden.

Als Ersatz für das CBP-Tag wurde das 3xFlag (triple Flag Peptid) an Stelle des CBP-Tags in das Expressionsplasmid eingebaut.



Abb. 15: Das Fusionsprotein CARP-3xFLAG-TEV-ZZ. CBP wurden gegen 3xFlag ausgetauscht, da durch die CBP-Aufreinigung eine calciumabhängige Bindung von möglichen Bindungspartnern an CARP gestört werden könnte.

Das Flag-Tag besteht aus einem kurzen, hydrophilen, 8 Aminosäure-langen Peptid mit einer Größe von 1,01 kDa [56] und wird häufig für die Detektion bzw.

Immunpräzipitation von rekombinant exprimierten Proteinen verwendet. Im 3xFlag Peptid wird diese dreimal hintereinandergeschaltet, was zu einer höheren Affinität des Tags zu den α -Flag-Antikörpern führt. Der Tag kann sowohl C-terminal oder N-terminal gekoppelt werden und wurde bereits in vielen Zellarten, wie Bakterien und Hefezellen ausgetestet und erfolgreich angewendet [13, 36, 101]. Zur Aufreinigung der Fusionsproteine wurde der M2- α -Flag-Antikörper benutzt.

Mit dem Konstrukt CARP-3xFLAG-TEV-ZZ wurden HEK293T-Zellen transfiziert und anschließend die Aufreinigung des Fusionsproteins versucht.

Im ersten Schritt erfolgte die Aufreinigung über die ZZ-Domäne des Protein A mit Hilfe von IgG Molekülen, die an Sepharose immobilisiert waren (IgG-Sepharose).

Zu diesem Zweck wurden 200 μ l IgG-Sepharose nach Waschen in 2 ml Lysispuffer ohne PMSF und Proteinase-Inhibitor-Mix verwendet. Die Zellen wurden in PBS gewaschen und nach Gabe des Lysispuffers mit einem Zellschaber komplett von der Schale gelöst und in ein Eppendorf-Gefäß gegeben. Der Zelldetritus für 10 Minuten bei 500xG abzentrifugiert und der Überstand auf die IgG-Sepharose gegeben. Das Eppendorf-Gefäß wurde verschlossen und für 1 h bei 4°C auf einem Schüttler

inkubiert. Danach wurde die IgG-Sepharose mit dem gebundenen CARP-C-Tag abzentrifugiert und der Überstand für weitere Analysen aufgehoben. Die IgG-Sepharose wurde 3x mit jeweils 2 ml Lysispuffer ohne PMSF und Proteinase-Inhibitor-Mix gewaschen. Alle Waschüberstände wurden für spätere Analysen aufbewahrt.

Zur Elution des gebundenen CARP wurde die IgG-Sepharose mit der AcTEV-Protease (300 U) im TEV-Puffer für 1,5 h bei RT inkubiert. Die AcTEV-Protease schneidet spezifisch an der TEV-Spaltungsstelle und sorgt dafür, dass das Fusionsprotein von der ZZ-Domäne abgetrennt wird.

Abb. 16 zeigt den Verlauf dieses Schrittes. Der Vergleich von Zelllysat (ZL) und Durchlauf (DL) zeigt eine starke Abnahme des CARP-3xFLAG-TEV-ZZ Proteins nach der Säulenpassage, was für eine gute Bindung des Fusionsproteins an die IgG Sepharose spricht.

Während der Waschschritte (W1 - W4) kommt es zu keinem weiteren Verlust des Proteins von der Säule. Nach Inkubation mit der TEV Protease (TEV) kommt es dann zur Elution eines verkürzten Proteins, was auf die Abspaltung der ZZ-Domäne zurückzuführen ist. Soweit war die Reinigung im ersten Schritt erfolgreich.

Allerdings ergaben sich hohe Verluste an CARP-Fusionsprotein bei der IgG Affinitätsreinigung. So ging ein erheblicher Anteil des Proteins im Durchlauf (DL) verloren.

Betrachtet man außerdem das Material, das nach der TEV-Behandlung nicht von der Säule eluiert wurde (IgG) so stellt man fest, dass ein größerer Anteil des CARP-Fusionsproteins nicht durch die TEV Protease geschnitten wurde.

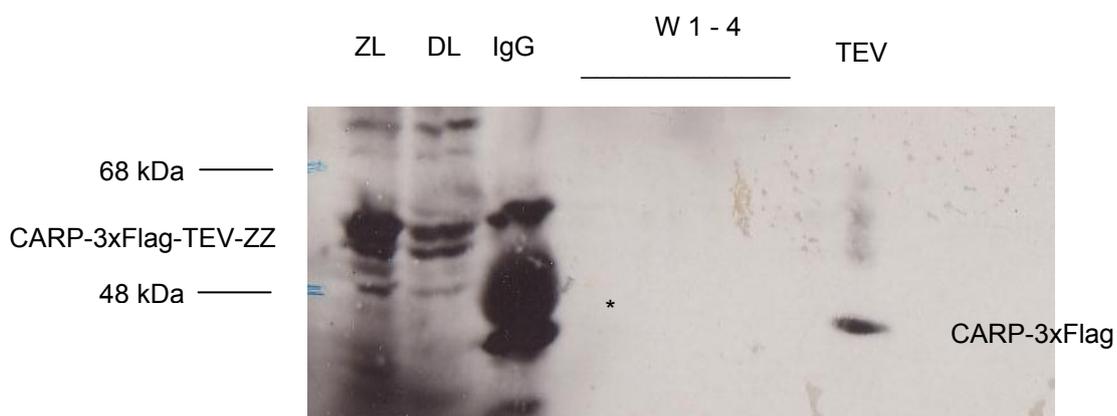


Abb. 16: Western Blot-Analyse nach Aufreinigung über die IgG-Säule. Die Größe des Fusionsproteins beträgt ca. 54,4 kDa. Im ersten Durchlauf erkennt man, dass ca. 50% des Fusionsproteins verloren gehen und nicht an die IgG-Sepharose binden. Nach Behandlung mit der TEV-Protease erscheint das Fusionsprotein in der Fraktion TEV-Eluat mit einem geringeren Molekulargewicht (42 kDa). Der Hintergrund zeigt kaum Verunreinigungen. (CL: Zellysate, BT: Durchlauf, W1-4: Waschfraktionen, TEV: TEV-Eluat, * Kaninchen IgG- Schwere Kette aus dem Säulenmaterial).

Das eluierte CARP-3xFlag Protein wurde dann einer weiteren Aufreinigung über eine anti Flag-Sepharose unterworfen (M2-Antikörper). Nach Bindung und Waschen des Säulenmaterials erfolgte die Elution mit steigenden Konzentrationen eines kompetierenden Peptids (3xFlag-Peptid).

Abb. 17 zeigt, dass dieser Schritt zum vollständigen Verlust des eluierten CARP-3xFlag Proteins führte, da selbst hohe 3xFlag-Peptid-Konzentrationen (250 µg/ml, 500 µg/ml, 1000 µg/ml) das Zielprotein nicht von der Säule lösen konnten.

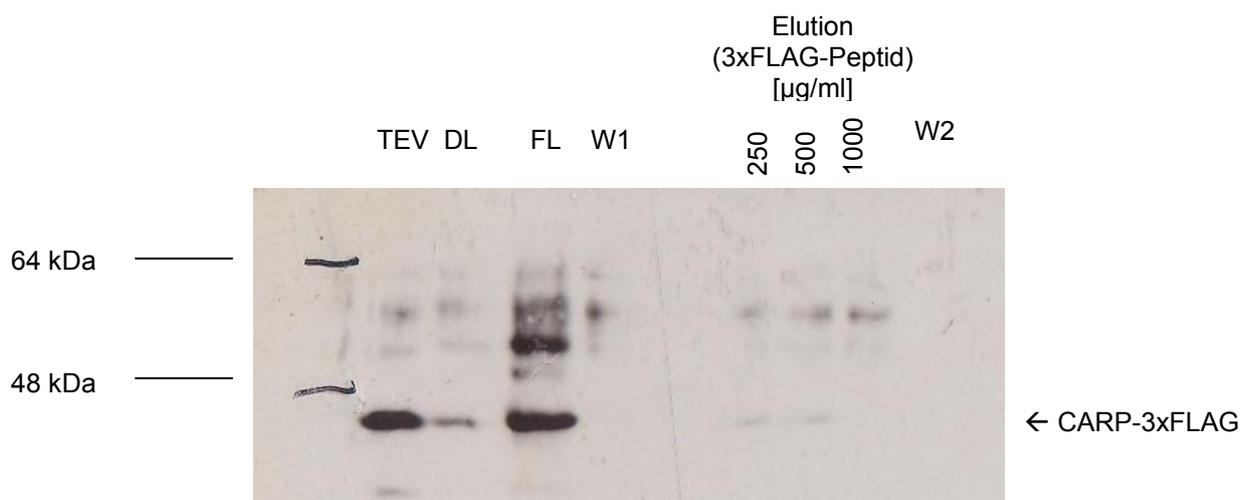


Abb. 17: Ergebnis der Aufreinigung über die M2-Säule. Das Fusionsprotein CARP-3xFlag bindet nach TEV-Elution von der IgG-Sepharose fast vollständig an die Anti-Flag-Säule mit nur geringem Verlust im Durchlauf (DL). Die verschiedenen Konzentrationen mit dem Flag-Peptid jedoch sorgen nicht dafür, dass das CARP von der M2-Säule eluiert wird. Denaturierung der Anti-Flag-Sepharose zeigte die nahezu vollständige Bindung des CARP-3xFLAG an die Säule. TEV: TEV-Eluat, DL: Durchlauf, FL: anti-FLAG Sepharose, W: Waschfraktionen.

3.6.2 Fusionsprotein CARP-FL-3xFLAG-TEV-ZZ

Die Reinigung des CARP-3xFLAG-TEV-ZZ zeigte zwei wesentliche Probleme:

1. Es fand nur eine unvollständige Bindung des CARP-Fusionsproteins an die IgG-Säule statt.

2. Die TEV-Spaltung zur Elution erfolgte nur unvollständig.

Es stellte sich somit die Frage, ob die Zugänglichkeit des TAGs durch das CAR-Protein aufgrund sterischer Einflüsse erschwert war.

Um dies zu überprüfen, wurde daher ein sogenannter Flex-Linker (FL), der bereits 1997 durch Fischer M. et al. beschrieben wurde, zwischen CARP und 3xFlag-Tag eingebaut, um beide Tags vom Zielprotein weiter zu distanzieren.

Der Linker besteht hauptsächlich aus Glycinen (RGGGGSGGGGSVE) und besitzt somit eine hohe Flexibilität durch seine freie Drehbarkeit ohne sperrige Seitenketten. Gleichzeitig erreicht man dadurch, dass die Tags besser exponiert sind [38].



Abb. 18: Schematische Darstellung des Fusionsproteins CARP-FL-3xFLAG-TEV-ZZ mit dem neuen Flex-Linker. Durch die Integration des Spacers kommt es zu einer besseren Exposition der beiden Tags und somit zu einer geringeren Überlagerung durch das Zielprotein CARP.

Um das neue Fusionsprotein zu testen, wurden 10 cm-Zellkulturschalen mit HEK293T-Zellen verwendet, die bei einer Zelldichte von ca. 40 – 50% transient transfiziert wurden.

Die Aufreinigungsergebnisse über die IgG-Affinitätssäule zeigt Abb. 19.

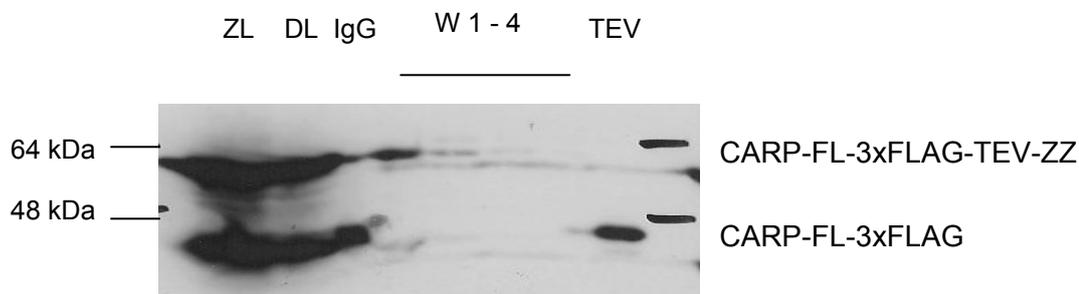


Abb. 19: Reinigung des CARP-FL-3xFLAG-TEV-ZZ Proteins über IgG-Sepharose. ZL: Zelllysat, DL: Durchlauf, IgG: IgG-Sepharose (nach Denaturierung), W1-4: Waschfraktionen, TEV: TEV-Eluat,

Es zeigte sich, dass der zusätzliche flexible Linker die Bindung des Fusionsproteins an die IgG-Sepharose nicht entscheidend verbesserte, denn es ging noch immer ein großer Teil des CARP-Fusionsproteins im Durchlauf der IgG-Sepharosesäule verloren.

Mit dem TEV Eluat wurde dann anschließend die Reinigung über die anti-Flag Säule durchgeführt. Dabei sollte überprüft werden, ob die Elution durch das um die Antikörperbindung kompetierende Peptid durch den Linker verbessert wird. Abb. 20 zeigt, dass dies jedoch nicht der Fall war.

Wie bereits im Experiment ohne den flexiblen Linker, blieb das gebundene CARP-FL-3xFlag Protein vollständig an die Antikörper gebunden. Erst nach Denaturierung mittels Kochen des Säulenmaterials ließ sich das Fusionsprotein nachweisen.

Da sich durch den Einbau des flexiblen Linkers (FL) keine Verbesserung der Bindung an die IgG-Säule und keine gesteigerte Elution von der anti-Flag-Säule feststellen ließ, wurde im Weiteren auf diesen Abschnitt verzichtet.

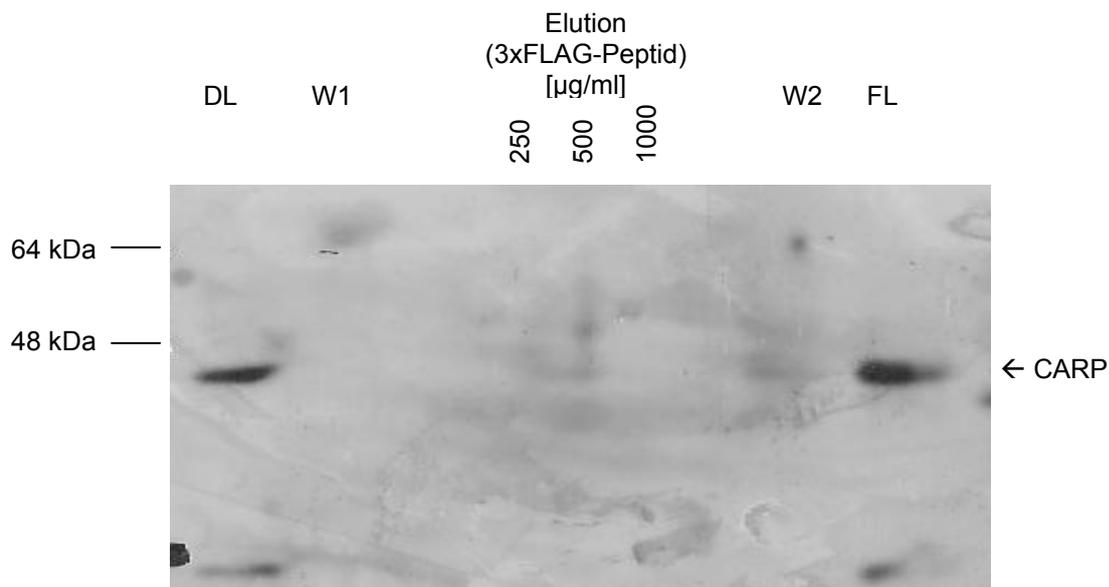


Abb. 20: Ergebnis der Aufreinigung über die M2-Säule. Das TEV-Eluat des CARP-FL-3xFlag Fusionsproteins wurde auf eine M2-anti-Flag-Säule gegeben. Im Durchlauf ging ein Teil des Fusionsproteins verloren. Flag-Peptid-Konzentrationen von bis zu 1000 µg/ml führten nicht zur Elution von der Säule. Denaturierung des Säulenmaterials in SDS-PAGE Probenpuffer führte zur Freisetzung des Fusionsproteins. DL: Durchlauf, W: Waschfraktion FL: M2-anti-Flag-Sepharose.

Zusätzlich zur Western-Analyse wurden die restlichen Fraktionen (je 1 ml Volumen) dieses Experiments mittels Ionenaustauscher (Strataclean™) angereichert, durch

SDS-PAGE getrennt und das erhaltene Gel einer Silberfärbung unterworfen. Abb. 21 zeigt, dass die gesamt gewonnene Menge an CARP-FL-3xFlag nicht ausreicht, um das Protein als diskrete Bande auf dem Gel sichtbar zu machen.

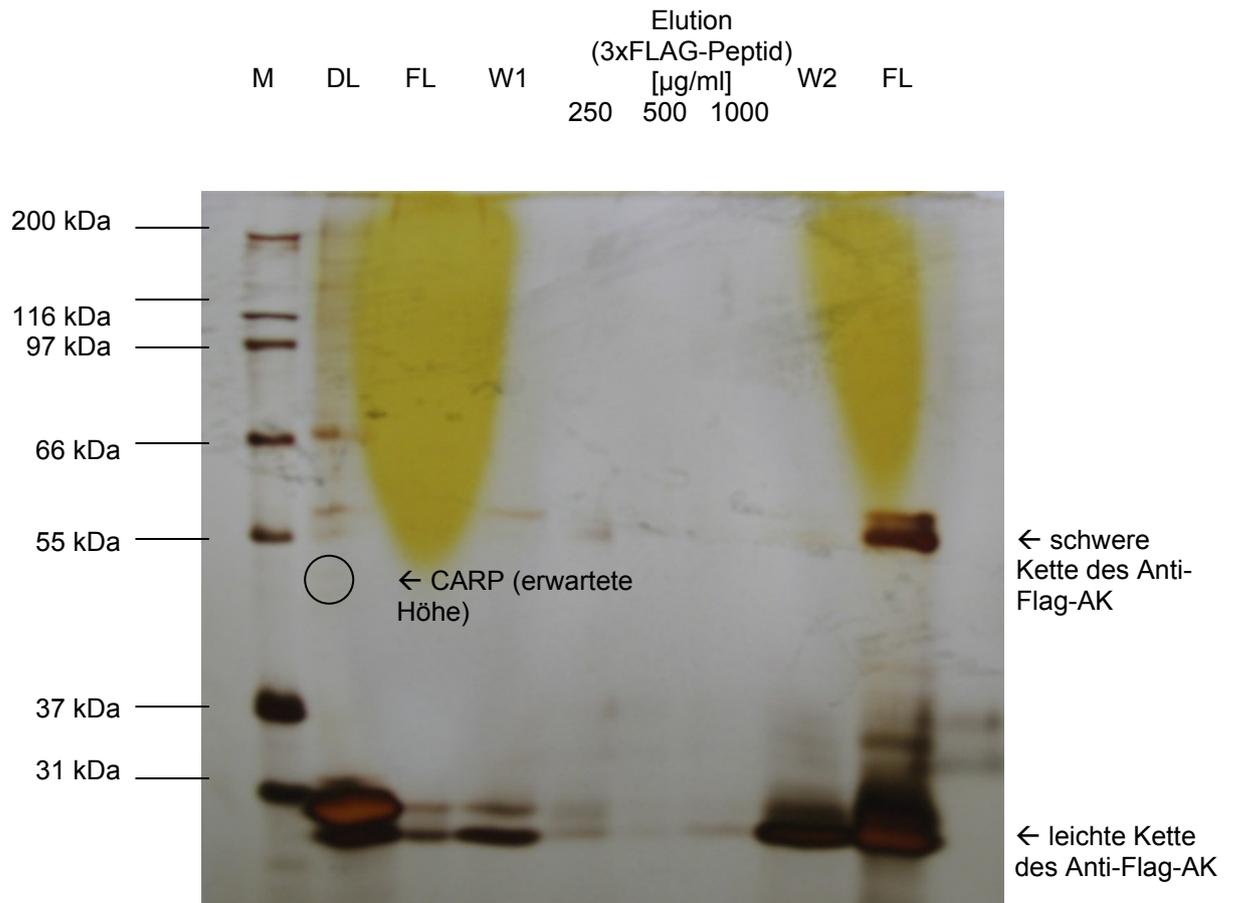


Abb. 21: Silbergelfärbung der Reinigungsfractionen über eine M2-Säule. Alle Fractionen wurden vor dem Auftrag mit 5 µl Strata-Clean™ aufkonzentriert und auf das Gel aufgetragen. Eine mögliche schwache CARP Bande ist in der Durchlaufraction markiert. M: Größenstandard, DL: Durchlauf, FL: anti-FLAG-Sepharose, W: Waschfractionen.

3.6.3 Fusionsprotein CARP-3xFLAG-TEV-STREP

Da die ZZ-Domäne des Protein A zu einer unbefriedigenden Bindung des Fusionsproteins an die IgG-Sepharose erlaubte, wurde die ZZ-Domäne gegen das Strep II-Tag ausgetauscht (IBA Technologies, Göttingen).



Abb. 22: Das Fusionsprotein CARP-3xFLAG-TEV-STREP. Das Strep II-Tag ist im Vergleich zur ZZ-Domäne Protein A erheblich kleiner (8 kDa).

Das Strep-Tag (8 Aminosäuren: WSHPQFEK, 8 kDa) beruht auf dem bekannten Biotin-Streptavidin-System [100]. Streptavidin-Varianten mit Mutationen in den Positionen 44, 45 und 47 haben eine höhere Affinität an das Oktapeptid Strep-Tag II als die native Form und wird daher als Streptactin genannt [99, 116].

Proteine mit einem Strep II-Tag binden unter physiologischen Puffer-Konditionen an die Biotin-bindenden Taschen des Streptactin und können mit Biotin bzw. Biotin-Derivaten eluiert werden (z. B. 2,5 mM Desthiobiotin). Die Matrix kann anschließend mit 4-hydroxy azobenzene-2-carboxylic acid regeneriert werden.

Von der Firma IBA wurden 3 verschiedene Streptactin-Säulenmaterialien (Sephacrose, SuperFlow, MacroPrep) angeboten, die alle einzeln zunächst auf ihre Bindungs- und Elutionseigenschaften für das CARP-3xFLAG-TEV-STREP Protein ausgetestet wurden.

Dazu wurde das Strep-tag® Starter Kit 3C der Firma IBA GmbH mit 1 ml gepackten Aufreinigungssäulen und fertigen Lösungen sowie Puffern benutzt. Das CARP-3xFLAG-TEV-STREP Fusionsprotein wurde aus transient transfizierten HEK293T-Zellen gewonnen.

Die Aufreinigung erfolgte mittels „Gravity Flow“, so dass das Lysat genug Zeit hatte mit dem Säulenmaterial in Kontakt zu kommen. Für die jeweiligen Volumina an Wasch-, Elutions- und Regenerationspuffern wurde das Firmenprotokoll befolgt. Abb. 23 zeigt das Ergebnis der Western-Analyse nach Affinitätsreinigung über Streptactin-Sephacrose. Im Durchlauf (DL) ist kein Fusionsprotein mehr nachweisbar, was für eine effiziente Bindung an die Streptactin-Sephacrose spricht.

Es zeigt sich weiterhin, dass das CARP-3xFLAG-TEV-STREP effizient von der Säule mit einem Maximum in Fraktion E4 eluiert wird. In der Regenerationsfraktion R1 ist noch ein geringer Anteil des Fusionsproteins nachweisbar, in den weiteren Fraktionen tritt dann aber kein Fusionsprotein mehr auf.



Abb. 23: Aufreinigung des Fusionsproteins CARP-3xFLAG-TEV-STREP über Streptactin Sepharose. Die Aufreinigung erfolgte über eine Streptactin Sepharose-Säule. DL: Durchlauf, W: Wash, E: Elution (Desthiobiotin), R: Regeneration (4-hydroxy azobenzene-2-carboxylic acid).

Ähnlich gute Bindungs- und Elutionsergebnisse zeigten die beiden weiteren Säulenmaterialien Streptactin MacroPrep (Abb. 24) und Streptactin SuperFlow (nicht gezeigt).

Auch in diesen Fällen verliefen die Bindung und Elution sehr effizient. Das Streptactin-Strep-Tag System war dem Protein A-ZZ-Domäne/IgG System in den Ergebnissen weit überlegen.



Abb. 24: Aufreinigung des Fusionsproteins CARP-3xFLAG-TEV-STREP über Streptactin MacroPrep. DL: Durchlauf, W: Waschfraktionen, E: Elution (Desthiobiotin), R: Regeneration (4-hydroxy azobenzene-2-carboxylic acid).

Nach Austestung aller 3 Trägermaterialien zeigte sich, dass Sepharose am effektivsten war, was die Bindung und vor allem die Elution des Fusionsproteins anbetraf.

Die Proteine aller Wasch- und Elutionsfraktionen der drei Reinigungsexperimente wurden im Folgenden über Ionenaustauschermaterial (Strataclean™) konzentriert und anschließend mittels SDS-PAGE und Silberfärbung analysiert.

Generell lässt sich festhalten, dass alle drei Säulenmaterialien zu einer bedeutenden Anreicherung der Fusionsproteine führen. Dies wird deutlich, wenn man die massiv überladenen Spuren der Fraktion W1 betrachtet. Man erkennt aber auch, dass bis zur Fraktion W5 der größte Teil des kontaminierenden Proteins gewaschen wurde.

Dabei ergibt sich hinsichtlich der Effizienz der Waschungen ein großer Unterschied: Während mit Beginn der Elution E1 bei MakroPrep (Abb. 25 A) noch ein relativ großer Hintergrund an Proteinen feststellbar war, fällt dieser bei Streptactin-Sepharose und Streptactin SuperFlow deutlich niedriger aus.

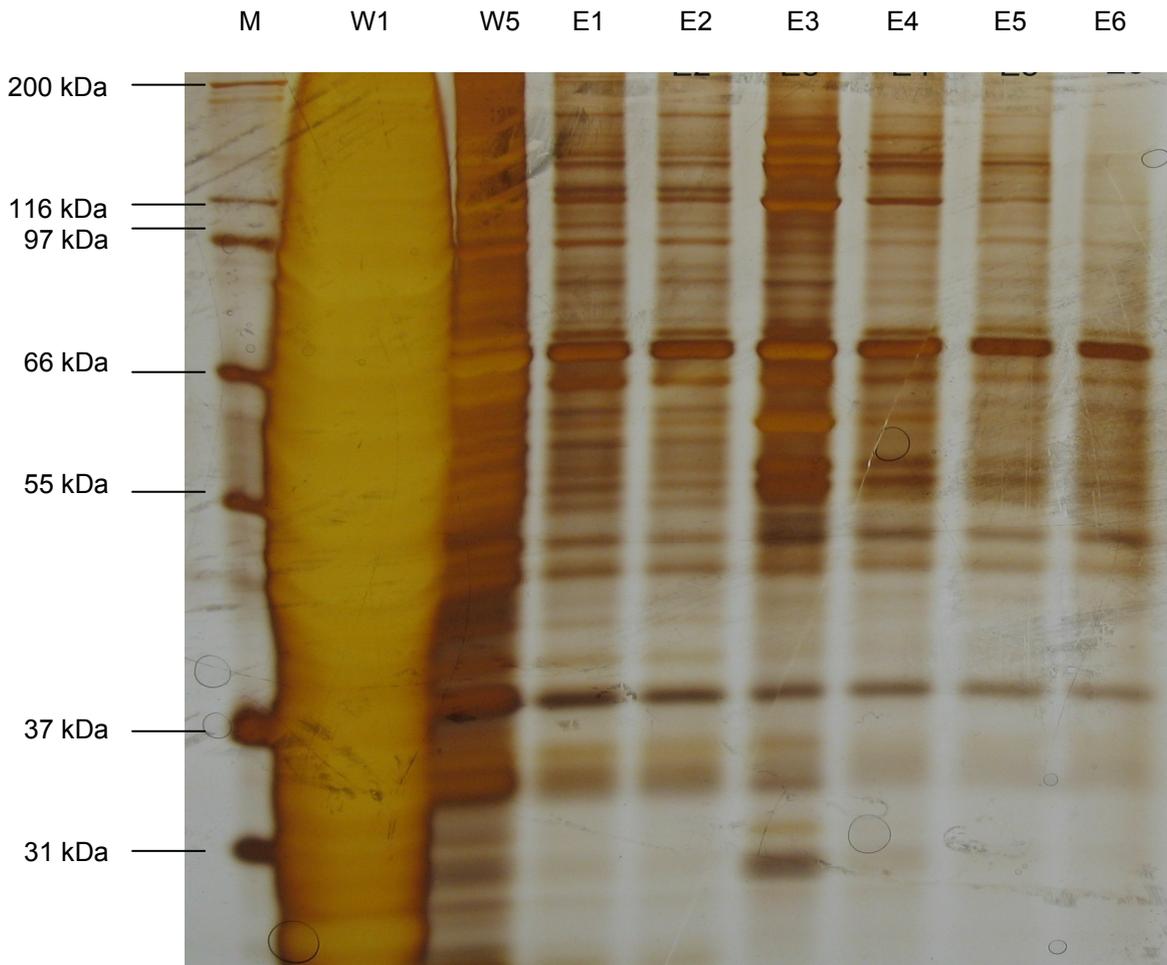
Allen drei Materialien ist es gemeinsam, dass in den Fraktionen E3 und E4 ein deutlicher Unterschied in der Proteinzusammensetzung im Vergleich mit den Fraktionen E1/2 bzw. E5/6 feststellbar war. In diesen Fraktionen findet nach den Ergebnissen der Westernanalyse vor allem die Elution des CARP-Fusionsproteins statt. Insbesondere zeigte der Western nach Streptactin-Sepharose eine starke Bande für das CARP-3xFlag-TEV-Strep Protein in Fraktion E3.

Interessanterweise zeigte die Silberfärbung ein starkes Signal auf der Höhe des CARP Fusionsproteins, das auch noch in Fraktion E4 sichtbar war.

Ob es sich bei diesem Protein allerdings tatsächlich um das CARP-Fusionsprotein oder um ein anderes Protein handelte, ist allerdings nicht klar.

Insgesamt ergab sich für die Streptactin-Sepharose der geringste Hintergrund, so dass im Folgenden die weiteren Experimente mit Streptactin Sepharose durchgeführt wurden.

A)



MacroPrep

B)

W1 W5 E1 E2 E3 E4 E5 E6



Sepharose

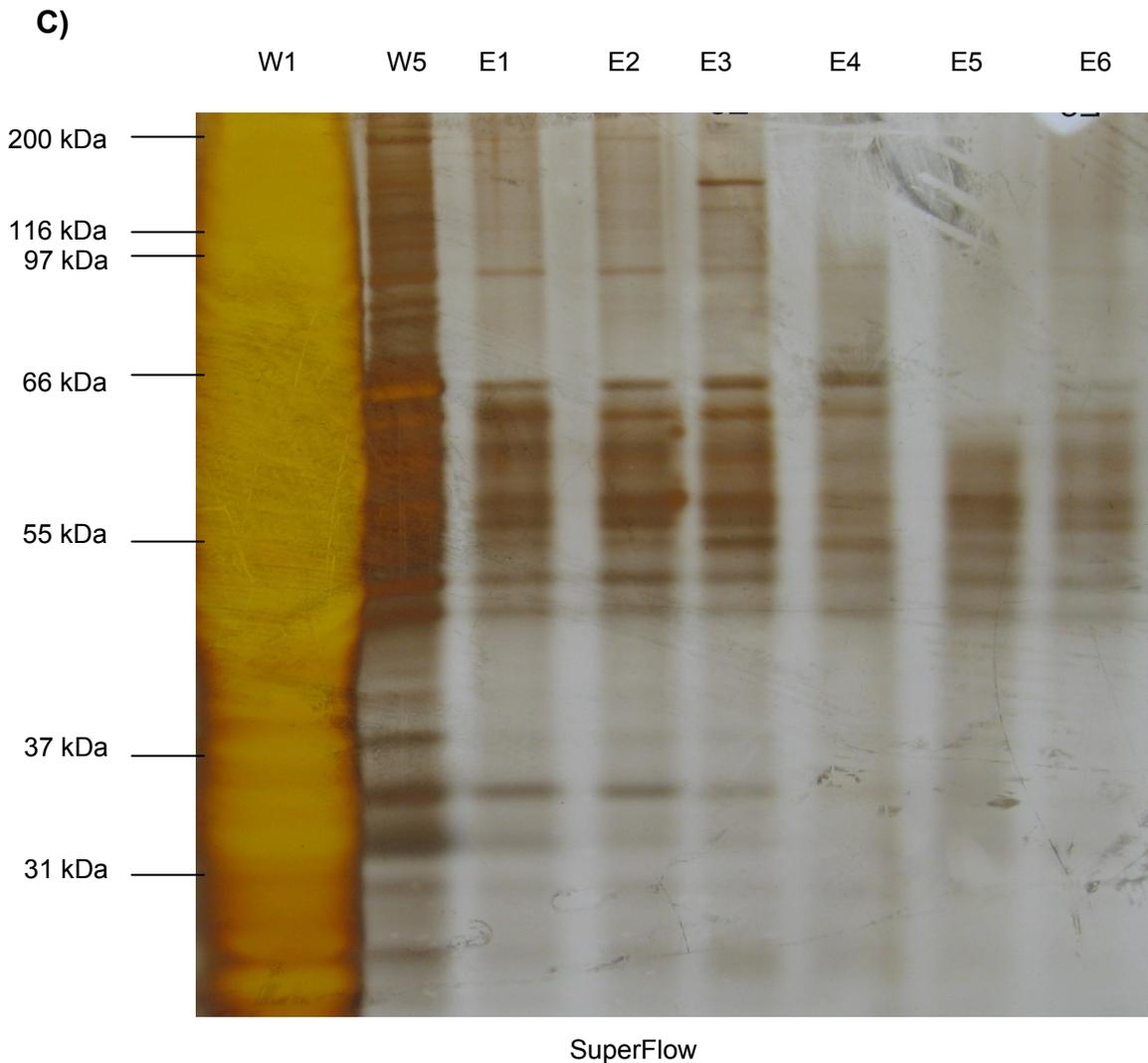


Abb. 25: Silbergelfärbung aller Fraktionen der 3 Trägermaterialien im Vergleich. Bild A zeigt die Fraktionen der Reinigung über MacroPrep, B Sepharose und C SuperFlow. Die mögliche CARP-3xFlag-TEV-Strep Bande ist gekennzeichnet. M: Größenstandard, W: Waschfraktionen, E: Elutionsfraktionen.

3.6.4 Fusionsprotein CARP-HA-THROMBIN-STREP-TEV-1xFLAG

Nachdem nun das Streptactin-Streptag System als effiziente Alternative zum Protein A-IgG-System etabliert war, wurde im nächsten Schritt eine grundlegende Modifikation des TAGs durchgeführt:

1. Das 3xFlag-Tag gegen ein 1xFlag-Tag ausgetauscht. Grund war die Überlegung, dass eine effiziente Elution mit dem 3xFlag-Peptid möglich sein könnte, wenn das Fusionsprotein über das 1xFlag-Peptid an die M2-anti-Flag Antikörper gebunden wird, das eine niedrigere Affinität zum Antikörper besitzt als das 3xFlag-Peptid.

2. Die Anordnung der Flag- und Strep-Tags wurde vertauscht.

Im Befund zeigte sich, dass die Protein-Reinigung über das Strep-Tag bereits bei der Einschritt-Reinigung aus einem Zellextrakt einen relativ sauberen Hintergrund im Silbergel lieferte.

Im Gegensatz dazu zeigte die Reinigung über eine M2-Antikörper-Säule häufig ein „Ausbluten“ von IgG leichten und schweren Ketten, die zu einer deutlichen Verunreinigung der Proben führte.

Daher sollte der erste Reinigungsschritt über die M2-anti-FLAG Säule erfolgen, der zweite dann über die Streptactin-Sepharose.

3. Als weitere Option wurde ein drittes Tag hinzugefügt, das HA-Tag, welches von der Arbeitsgruppe Anderson D. E. et al. im Jahre 1998 beschrieben wurde.

Dieses Tag sollte bei Verwendung von Proteasen zur Elution die Detektion des rekombinanten Proteins erlauben.

4. Neben der TEV-Protease-Stelle wurde eine Thrombin-Schnittstelle in das Tag aufgenommen, um eine weitere Elutionsmöglichkeit zu besitzen.

Die Struktur des Fusionsproteins CARP-HA-THROMBIN-STREP-TEV-1xFLAG zeigt Abb. 26.



Abb. 26: Schematische Darstellung des CARP-HA-THROMBIN-STREP-TEV-1xFLAG Proteins. Die Elemente Thrombin und HA wurden als Alternativen eingebaut, falls eine Bindung bzw. Elution über 1xFlag und Strep-Tag nicht effizient funktionieren sollte. Das HA-Tag kann zur Detektion des Proteins genutzt werden, falls bei Einsatz der Thrombin- bzw. TEV-Schnittstelle kein Flag-Tag zur Detektion mehr zur Verfügung steht.

Zur Durchführung der Tandem-Affinitäts-Reinigung des CARP-HA-THROMBIN-STREP-TEV-1xFLAG Proteins wurde im ersten Schritt das Zelllysat von fünf 10 cm Schalen transient transfizierter HEK293T-Zellen bzw. nicht-transfizierter Kontrollzellen über 200 µl M2-anti-Flag-Agarose gegeben. Das Auftragen des

Zelllysats erfolgte in kleinen Mengen, so daß eine Geschwindigkeit von ca. 10 Tropfen/Minute eingestellt wurde.

Der erste Aufreinigungsschritt erfolgte bei RT und dauerte ca. 1 h. Bei zu geringem Volumen des Zelllysats wurde der Durchlauf noch einmal auf die Säule gegeben bis 1 h Kontaktzeit erreicht wurde. Die Durchlaufaktionen wurden auf Eis gelagert. Die Säule wurde anschließend 2x mit jeweils 1 ml TBS gewaschen. Die Waschfraktionen wurden ebenfalls auf Eis gestellt. Die Elution der gebundenen Proteine erfolgte mit 4x 250 µl 3xFlag-Peptid in TBS (300 µg/ml). Die Eluate wurden für die zweite Aufreinigung aufgehoben und ca. 30 – 50 µl für weitere Analysen entnommen. Die Affinitätsmatrices wurden in 1 ml TBS resuspendiert und ebenfalls für weitere Analysen in Eppendorf-Gefäßen aufgehoben.

Abb. 27 zeigt den Verlauf der Reinigung anhand eines Western Blots.

Die Bindung des CARP-HA-THROMBIN-STREP-TEV-1xFLAG an die M2-Anti-Flag Sepharose erfolgt im Gegensatz zu den Befunden mit den 3xFlag Fusionsproteinen nicht vollständig, da ca. 25% des Proteins im DL erscheinen.

Allerdings werden die gebundenen Proteine mit hoher Effizienz von der Säule wieder eluiert, denn das CARP-HA-THROMBIN-STREP-TEV-1xFLAG Protein erscheint fast quantitativ im Eluat (EF), nur ein geringer Teil bleibt an die M2-anti-Flag Agarose gebunden (FL).

Die gesammelten Eluate wurden für die zweite Affinitätsreinigung über 200 µl Streptactin-Sepharose gegeben. Im Anschluss an die Bindung wurde das Säulenmaterial 2x mit je 1 ml Strep-Waschpuffer gewaschen.

Für die Elution wurden 4x 250 µl 2,5 mM Biotin in Strep-Puffer eingesetzt. Alle Eluate und Waschfraktionen sowie die Streptactin-Sepharose wurden für weitere Analysen aufgehoben.

Abb. 27 zeigt ebenfalls den Verlauf der zweiten Affinitätsreinigung über Streptactin-Sepharose.

Nur ein geringer Teil des auf die Säule gegebenen Materials geht im Durchlauf (DLS) verloren. Die Elution mit Biotin erfolgt aber nahezu vollständig (ES), denn nach Denaturieren wird nur noch ein minimaler gebundener Rest von der Säule eluiert (ST).

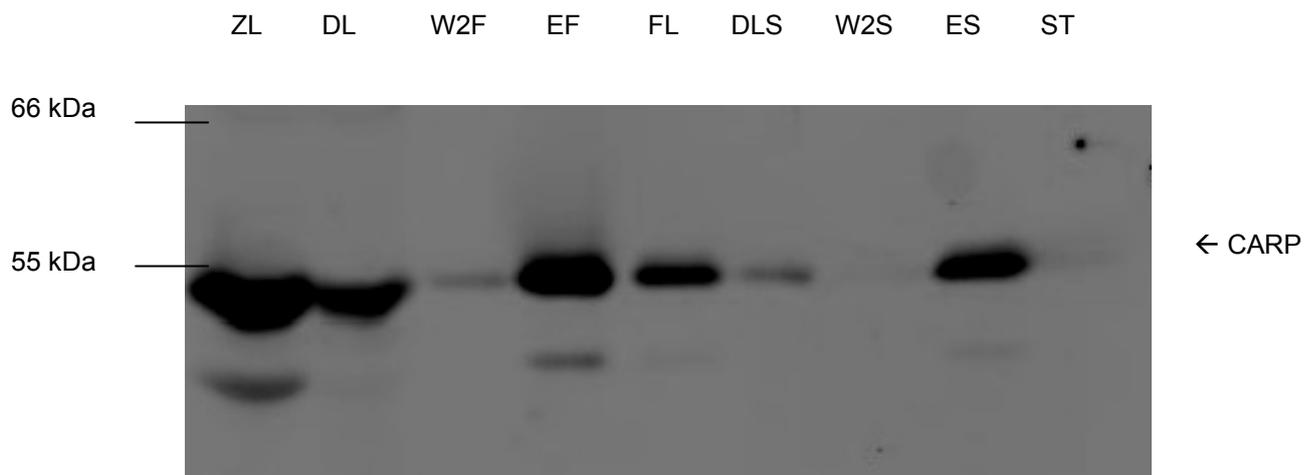


Abb. 27: Tandem-Affinitäts-Reinigung des CARP-HA-THROMBIN-STREP-TEV-1xFLAG Proteins über die M2-Agarose und Streptactin. ZL: Zelllysate, DL: Durchlauf M2-Agarose, W2F: Waschfraktion 2 M2-Agarose, E: Elution von der M2-Agarose, FL: denaturierte M2-Agarose, DLS: Durchlauf Streptactin-Sepharose, W2S: Waschfraktion 2 Streptactin-Sepharose, ES: Elution Streptactin-Sepharose, ST: Streptactin-Sepharose nach Denaturierung.

Für weitere Analysen wurden sämtliche aufgehobene Proben nach Konzentrierung über Strata-Clean dann äquivolumetrisch auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Außerdem wurden die Aufreinigungen von nicht transfizierten HEK293T-Zellen und den CARP-HA-THROMBIN-STREP-TEV-FLAG exprimierenden HEK293T-Zellen verglichen.

Abb. 28 zeigt das Ergebnis der Silbergefärbung auf dem die Aufreinigung transfizierter Zellen mit der einer Kontrolle verglichen wurde.

Während die Kontrollzellen in der Waschfraktion nach Streptactin (ST-WK) und in der Elutionsfraktion (ST-WK) nur geringe Proteinmengen enthielten, lässt sich bei einem ähnlich starken Hintergrund in der Streptactin-Waschfraktion Carp-exprimierender Zellen (ST-WC) ein starkes Proteinprofil nach Elution mit Biotin feststellen (ST-EC). Eine sehr intensive Bande läuft mit der Größe des CARP-Fusionsproteins. Die zusätzlichen Banden könnten, zumindest teilweise, CARP-assoziierte Bindungspartner sein.

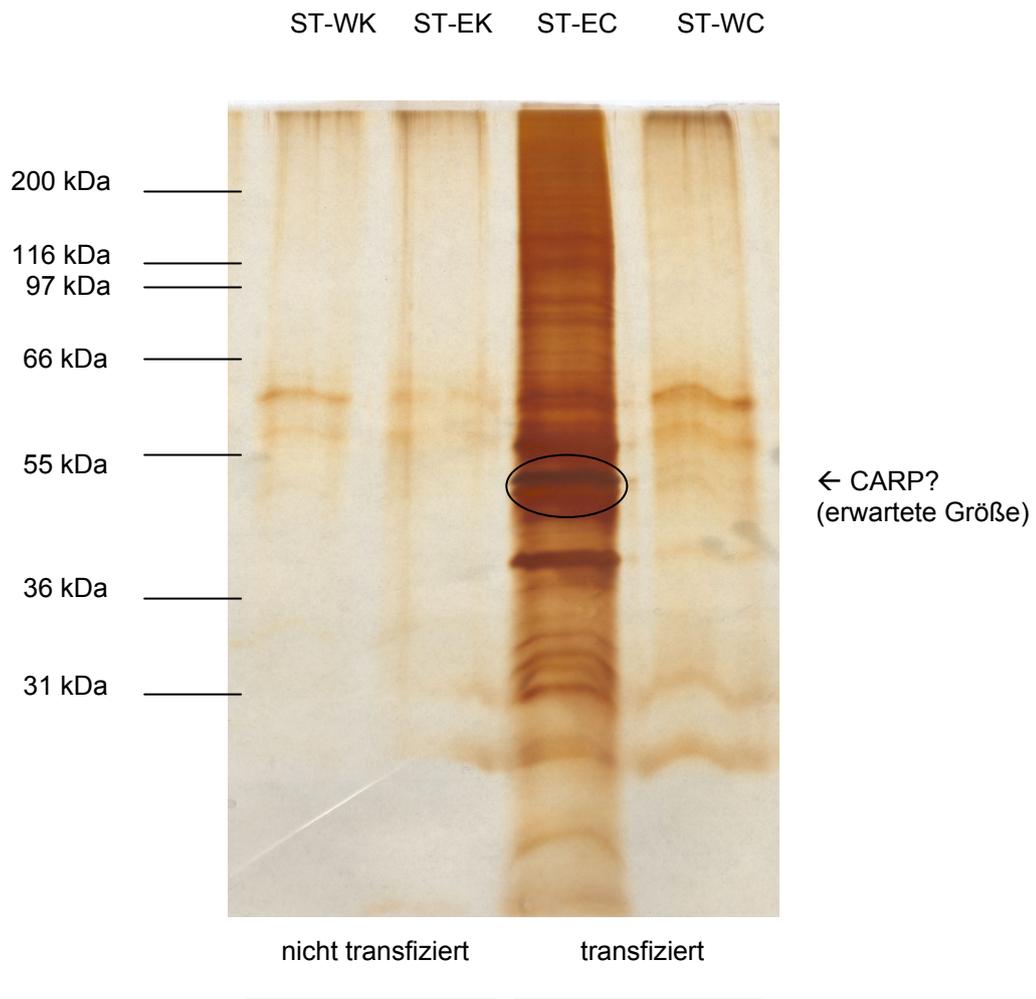


Abb. 28: Silbergelfärbung mit nicht transfizierten HEK293T-Zellen (links) und transfizierten HEK293T-Zellen (rechts) nach der 2. Affinitätsreinigung auf der Strep-Tag-Säule. Beide Eluate wurden zum direkten Vergleich nebeneinander aufgetragen. Das Zielprotein stellt sich in der Elutionsfraktion der transfizierten HEK293T-Zellen dar. ST-W: Streptactin-Wash, ST-E: Strep-Elution.

4. Diskussion

4.1 Die Bedeutung von Proteininteraktionen im Rahmen biologischer Prozesse

Eine Vielzahl von biologischen Prozessen wie Zellteilung, Zellmigration und Signaltransduktion werden in der Regel durch komplexe Signaltransduktionskaskaden reguliert, an denen eine Vielzahl von Proteinen beteiligt sind [2, 43, 76, 67, 58]. Dabei agieren die Proteine selten alleine, vielmehr interagieren sie mit anderen Proteinen und erfüllen dabei verschiedene zelluläre Aufgaben.

Man geht heute davon aus, dass diese Prozesse der Signalweiterleitung nicht auf freier Diffusion von Proteinen beruhen. Der Ausbildung von Proteinkomplexen wird eine wesentliche Bedeutung zugeschrieben [2]. Diese Art der Komplexbildung zwischen Proteinen ermöglicht eine immense Vielfalt an biochemischen Prozessen. Darüber hinaus können durch Proteininteraktionen einzelne Komponenten, die an einem gemeinsamen Signalweg beteiligt sind, in räumliche Nähe gebracht und damit die Weiterleitung eines Signals effizienter gestaltet werden [2]. Macht man sich dies bewusst, so ist es ein vorrangiges Ziel biomedizinischer Forschung Proteininteraktionen als Schlüsselereignis der Signaltransduktion zu erforschen.

Eine Proteininteraktion setzt voraus, dass die miteinander interagierenden Proteine entsprechend gestaltete Oberflächen besitzen, die eine molekulare Wechselwirkung zwischen einzelnen Bindungspartnern ermöglichen [43, 2].

Im Laufe der Evolution haben sich verschiedene konservierte Grundstrukturen entwickelt, die in besonderer Weise spezifische Proteininteraktionen ermöglichen. Hervorzuheben sind dabei die sogenannten Ankyrin-Repeats, die bereits in über 3000 Proteinen nachgewiesen wurden und eine Oberfläche für Protein-Protein-Wechselwirkungen bilden [73, 9].

Das Cardiale-Ankyrin-Repeat-Protein (CARP) besitzt wie seine verwandten Proteine ANKRD2 und DARP neben den 4 Ankyrin-Repeats nur noch eine NLS-Sequenz (Nuclear Localization Signal), zwei PEST-like Sequenzen und mehrere, putative Phosphorylierungsstellen [23, 119].

Damit lässt sich über die Funktion dieses Proteins wenig vorhersagen, außer das es über seine Ankyrin-Repeats an Protein-Protein-Interaktionen beteiligt ist und als Kernprotein an Transkriptionsvorgängen beteiligt sein könnte [119].

Sowohl seine Lokalisation im Zellkern und Zytoplasma [59, 60] als auch die Interaktion mit dem Transkriptionsfaktor YB-1, die von der Arbeitsgruppe Zou Y. et al. gezeigt wurde [119], unterstreicht die Relevanz dieser postulierten Funktionen.

Im Herzen interagiert CARP mit dem Myopalladin, das eine Komponente des Z-Scheiben-Komplexes ist und könnte damit als Vermittler zwischen dem Sarkomer und der Genregulation an der Mechanotransduktion, d. h. der Weiterleitung eines Signals gesteigerter mechanischer Belastung vom Sarkomer in den Zellkern beteiligt sein [3, 64]. CARP und Myopalladin wurden sowohl im Nucleus als auch im Sarkomer (zentrale I-Bande) gefunden.

Die Vermutung liegt nahe, dass Myopalladin und CARP einen Einfluß auf den strukturellen Aufbau des Sarkomers in Kardiomyozyten haben.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Expression von CARP bei verschiedenen Formen einer Herzhypertrophie analysiert, die experimentell in der Maus ausgelöst worden waren.

Frühere Arbeiten belegten bereits, dass insbesondere eine passive Muskeldehnung zu einer erhöhten CARP-Expression führt [78] und dass CARP bei linksventrikulärer Druckbelastung [66] oder aber auch bei verschiedenen Kardiomyopathien bzw. Herzhypertrophien ebenfalls erhöht exprimiert wird [1].

Mittels quantitativer Real-Time-PCR konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass CARP sowohl bei gesteigerter Druckbelastung des Herzens infolge einer Aortenkonstriktion als auch bei einer NO-induzierten dilatativen Kardiomyopathie (exzentrische Hypertrophie) vermehrt exprimiert wurde [45]. Interessanterweise konnte bei einer Hypertrophie, die durch β -adrenerge Dauerstimulation ausgelöst worden war, keine vermehrte CARP-Expression nachgewiesen werden (siehe Ergebnisteil Abb. 7).

Diese Daten zeigen, dass nicht die Hypertrophie der entscheidende Stimulus für eine gesteigerte CARP-Expression darstellt. Vielmehr scheint der Mechanismus der Hypertrophie-Induktion der entscheidende Faktor zu sein [1].

Die Druckbelastung bei transversaler Aortenkonstriktion führt klar zu einer gesteigerten passiven mechanischen Belastung des Myokards.

Dies ist bei der NO-induzierten Hypertrophie in tg-iNOS-my^{-/-} Mäusen jedoch nicht der primäre Stimulus. Vielmehr kommt es bei diesen Herzen zu einer Hemmung der mitochondrialen Atmungskette und damit zu einer eingeschränkten kardialen Energetik mit Abnahme des Kreatinphosphats [45]. In der Folge könnte es zu einer Einschränkung der Pumpfunktion und damit sekundär zu einer gesteigerten passiven mechanischen Belastung kommen.

β-adrenerge Stimulation steigert primär die aktive Kraftentwicklung des Myokards und führt über längere Applikation zu einer gesteigerten Proteinsynthese, der Aktivierung verschiedener Protoonkogene sowie zu einer gesteigerten Fibrose mit Nekrosebildung [86].

Das Ausbleiben einer CARP Induktion im Modell der Isoproterenol induzierten Hypertrophie kann an dieser Stelle nicht entschieden werden, belegt jedoch, dass die CARP Induktion keine stereotype Antwort des Herzens bei einer Hypertrophie darstellt, sondern dass andere, bisher nicht identifizierte Faktoren eine wesentliche Rolle bei der Induktion von CARP spielen.

4.2 Isolierung von Interaktionspartnern mit Hilfe der Tandem-Affinitäts-Reinigung (TAP)

Die mögliche Funktion von CARP als kardialer Mechanosensor, der bei Interaktion mit dem kontraktilem Apparat eine gesteigerte Druckbelastung detektiert und daraufhin in den Kern wandert und dort das Genexpressionsprogramm des Kardiomyozyten moduliert, ist eine interessante Theorie, die den Prozess einer Mechanotransduktion erklären könnte [3, 64].

Da wie bereits ausgeführt, die Funktion von CARP vor allem in der Ausbildung von Proteininteraktionen über seine Ankyrin-Repeats liegen dürfte, war es ein weiteres Ziel dieser Arbeit, die Methodik der Tandem-Affinitäts-Reinigung für CARP zu etablieren.

Die Tandem-Affinitäts-Reinigung stellt eine interessante methodische Weiterentwicklung der Immunpräzipitation (IP) dar [90, 43].

Im Gegensatz zu dieser bereits vielfältig verwendeten Technologie bietet die TAP den Vorteil, dass durch die Reinigung über zwei Affinitätsschritte mit anschließender

Elution unter nativen Bedingungen eine größere Reinheit der zu isolierenden Proteinkomplexe erreicht werden kann [4, 90].

Ein weiterer Vorteil ist die im Vergleich zu anderen Methoden geringe Falsch-positive und Falsch-negative Rate. Die Fehlerrate des Yeast-two-Hybrid-Systems und der Koimmunpräzipitation beträgt ca. 50 – 70 %, die der TAP-Technologie aber nur 15 % [Dziembowski et al. 2004]. Darüber hinaus ist es mit der TAP-Technologie möglich mit relativ geringem Aufwand eine enorme Menge an Daten hinsichtlich Proteininteraktionen zu gewinnen [90].

Außerdem erfolgt die Reinigung durch Bindung über die zusätzlichen Tags und nicht wie bei der IP durch Antikörperbindung an ein Epitop des Zielproteins. Dies ist insofern von Bedeutung, als dass Epitope, die für einen Antikörper zur Verfügung stehen, auch potenzielle Bindungsstellen für interagierende Proteine darstellen könnten.

Die Konsequenz könnte daher sein, dass entweder Proteinkomplexe nicht präzipitiert werden oder dass hochaffine Antikörper bestimmte Proteine aus ihren Komplexen verdrängen.

Als möglicher Nachteil ist zu nennen, dass die Tags, die entweder C- oder N-terminal angeordnet sind, die Funktion des Zielproteins beeinflussen können.

Man muss also festhalten, dass die TAP eine Methode unter verschiedenen Alternativen zur Isolierung von Proteinkomplexen darstellt.

Allerdings wird die Effizienz dieser Technologie durch die nahezu proteomweiten Analysen in *S. cerevisiae* unterstrichen [43].

Die TAP-Methode erlaubt die Aufreinigung von großen Proteinkomplexen auf eine relativ einfache und schnelle Weise. Im Gegensatz zum „two-hybrid System“ können die „Köderproteine“ in ihrer natürlichen Umgebung exprimiert werden, so dass die erhaltenen Komplexe eine hohe Authentizität aufweisen.

Außerdem können mittels TAP auch Bindungspartner identifiziert werden, die in großen Proteinkomplexen aus mehreren Untereinheiten nicht direkt mit dem „Köderprotein“ interagieren.

Erste Untersuchungen wurden in dieser Arbeit mit dem von Gavin A. C. et al. verwendeten Tag durchgeführt.

Dabei war es ein interessanter Nebenbefund, dass rekombinante Proteine mit einem Protein A-Tag im Western Blot über den Fc-Teil eines IgGs detektiert werden können [siehe Publikationen 2].

Offensichtlich kam es nach der Denaturierung der Proteine vor der Gelelektrophorese zu einer ausgeprägten Renaturierung, so dass die ZZ-Domäne des Protein A nach Western Transfer des getaggtten Proteins auf der Membran aktiv war und effizient IgG über ihre Fc-Teile binden konnte.

Diese Eigenschaft erlaubte es, das ZZ-getaggte Protein nur durch den Einsatz eines Peroxidase-gekoppelten Antikörpers auf der Membran zu detektieren.

Da ich für meine Arbeit keinen spezifischen Antikörper gegen CARP besaß, konnte diese Tatsache für weitere Experimente ausgenutzt werden, indem die Membran nur mit dem Sekundärantikörper (Rabbit Anti-Maus IgG, HRP-konjugiert) behandelt wurde. In der Auswertung konnte das rekombinante CARP-Protein über einen Röntgenfilm visualisiert werden.

Folglich ist es also möglich, jedes Fusionsprotein mit einem Protein A-Tag im Western Blot darzustellen ohne einen spezifischen Antikörper zu verwenden.

Diese Technik kann auch auf andere Methoden wie der Immunhistochemie, der FACS-Analyse und der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie angewendet werden. Für die Lokalisation des CAR-Proteins auf subzellulärer Ebene wurde dies genutzt (Abb. 11).

Trotz dieses Vorteils wurde bei der weiteren Optimierung des Reinigungsprotokolls das Ursprungs-TAP-Tag durch andere, besser geeignete Elemente ersetzt. Ausgehend von der Überlegung, dass das CBP mit endogenem Calmodulin interagieren dürfte und so zu einer Beeinflussung Ca^{2+} -abhängiger Prozesse in der Zelle führt mit der Folge, dass eine Aufreinigung der Proteinkomplexe über eine Calmodulin-Affinitätschromatographie behindert wird, wurde eine schrittweise Veränderung des TAP-Tags durchgeführt [53].

Die besten Ergebnisse einer TAP lieferte dabei das Tag mit der Anordnung:

HA-Tag - Thrombin-Spaltstelle – StrepII-Tag – TEV-Spaltstelle - Flag-Tag

Die Konstruktion dieses insgesamt nur 8 kDa großen Tags erlaubt eine vielfältige Kombination von Bindungs- von Elutionsbedingungen.

Die systematische Optimierung des Protokolls in dieser Arbeit hat gezeigt, dass generell der erste Schritt der Aufreinigung immer über die Antikörper-Affinitätsreinigung erfolgen sollte. Der Grund für diese Bedingung liegt in der Beobachtung, dass die Eluate von der anti-Flag-Säule immer noch einen relativ hohen Protein-Hintergrund zeigten. Vor allem war eine starke Verunreinigung der Eluate mit nur lose gebundenen Antikörper Molekülen festzustellen, die als charakteristische 50 und 25 kDa Banden in der Gelelektrophorese erschienen. Alternativ zur Reinigung über die anti-Flag Säule könnte bei dem optimierten Tag auch eine Reinigung über das HA-Tag stattfinden wie im Jahre 1998 von Anderson beschrieben. Diese Option wurde im Rahmen dieser Arbeit allerdings nicht verfolgt. Ausgehend von einer Flag Affinitätsreinigung kann die Elution von der anti-M2 Säule nun entweder über eine Kompetition mit der TEV-Protease erfolgen, bei der das Zielprotein mit seinen anhaftenden Bindungspartnern sequenzspezifisch von der Säule heruntergeschnitten wird und das Flag-Tag samt Antikörper auf der Säule verbleibt.

Alternativ dazu kann eine schonende Elution über ein kompetierendes 3xFlag Peptid erfolgen, das eine höhere Affinität zum M2-Antikörper besitzt und somit das getaggte Protein aus seiner Antigen-Antikörper-Bindung verdrängt.

Der zweite Reinigungsschritt beruht dann auf einer Interaktion des Strep II-Tags, dass u. a von der Arbeitsgruppe Witte im Jahre 2004 beschrieben wurde [106], mit einem modifizierten Streptavidin (Streptactin).

Vorteil dieses Systems ist eine robuste, wiederverwendbare Affinitätsmatrix, die fast kein unspezifisches Bindungsverhalten für Wirtsproteine aufweist. Dazu kommt das schonende Elutionsverfahren, dass die Struktur und die Eigenschaft des rekombinanten Proteins in der Regel nicht beeinträchtigt.

Prinzipiell wird die Bindung von Biotin an Streptavidin durch diese Interaktion imitiert. Der große Vorteil ist, dass das gebundene Zielprotein mit niedermolekularem Desthiobiotin oder Biotin effizient von der Affinitätsmatrix eluiert werden kann. Zur Elution wurde in dieser Arbeit jedoch nicht das von der Firma IBA empfohlene Desthiobiotin verwendet, mit dem man die Streptactin-Säule für eine weitere Aufreinigung regenerieren kann, sondern Biotin selbst. Nachteil dieses Elutionsmittels ist zwar die im Gegensatz zum Desthiobiotin irreversible Bindung an

die Affinitätssäule, jedoch zeigte sich, daß Biotin ein besseres Elutionsergebnis lieferte als Desthiobiotin.

Unabhängig von der Art der Elution, stört am Ende der Aufreinigung kein Peptid und keine Protease im Eluat und die gewonnenen Proteine stehen nach der Gelelektrophorese für eine weitere Analyse (z. B. mittels Massenspektrometrie) zur Verfügung.

Alternativ zur Biotin Elution steht immer noch die Möglichkeit offen, die Proteinkomplexe durch proteolytische Spaltung zu eluieren, da vor das Strep II-Tag eine Thrombin-Schnittstelle eingebaut wurde.

Thrombin, die entscheidende Protease der plasmatischen Gerinnung, schneidet nur selten in Proteinen, die nicht der Gerinnungskaskade angehören, so dass ein Thrombin-Einsatz hier nur mit geringer Wahrscheinlichkeit zur Degradation von Proteinkomplexen führt. Aufgrund der Koelution des Thrombins (das ja auch im Überschuss eingesetzt wird) mit den abgespaltenen Proteinkomplexen lässt sich eine Verunreinigung nicht vermeiden.

Mit dem so konstruierten Tag wurde am Ende der Arbeit eine effiziente Aufreinigung des CARP-C-Tag Proteins aus HEK293T-Zellen ermöglicht.

Neben dem eigentlichen Zielprotein, dem getaggten CARP, wurde in der Silberfärbung von Proteineluaten von der Streptactin-Säule eine Vielzahl von Zusatzprotein-Banden sichtbar. Da diese Banden in dem unter gleichen Bedingungen behandelten Kontrollextrakt aus nicht-transfizierten Zellen fehlten, kann man davon ausgehen, dass es sich bei diesen Proteinen zumindest zum Teil um CARP interagierende Proteine handelt.

Diese Beobachtung wurde wiederholt reproduziert, so dass am Ende der Arbeit festgestellt werden konnte, dass ein effizientes TAP-Protokoll zur Anwendung in Säugerzellen erarbeitet wurde.

5. Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es die Bedeutung des Cardialen-Ankyrin-Repeat-Proteins im Rahmen der Pathophysiologie verschiedener Kardiomyopathien darzustellen, und die Tandem-Affinitätsreinigung von spezifischen Proteinkomplexen aus Säugetierzellen zu etablieren.

Quantitative Real-time-PCR-Messungen ergaben eine erhöhte Expression von CARP in Herzen mit gesteigerter Nachlast durch transversale Aortenkonstriktion sowie bei einer NO-induzierten dilatativen Kardiomyopathie. Interessanterweise führte Induktion einer kardialen Hypertrophie mittels Isoproterenol-Belastung zu keiner gesteigerten CARP-Expression, so dass nicht die Hypertrophie per se ein Signal für die gesteigerte CARP Expression sein kann.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde ein effizientes Protokoll für die Tandemaffinitätsreinigung von CARP aus Säugerzellen etabliert.

Im Rahmen dieser Untersuchungen wurde die CARP cDNA kloniert und als getaggetes Protein in HEK293T-Zellen exprimiert.

Immunhistochemische Untersuchung des Fusionsproteins zeigte eine authentische subzelluläre Lokalisation. Es konnte zudem gezeigt werden, daß CARP nicht nur strikt im Zellkern vorkommt, sondern auch im Zytoplasma lokalisiert ist.

Durch schrittweise Optimierung des TAP-Tags und der Elutionsbedingungen von verschiedenen Affinitätsmatrices gelang es schließlich, CARP aus Säugetierzellen reproduzierbar in einem Zweischrittverfahren über

1. Immunaffinitätschromatographie (anti-Flag Tag Antikörper) und
2. eine Strep II-Tag-Streptactin Affinitätssäule

zu isolieren.

Dabei wurde eine Vielzahl spezifisch koeluierender Proteine nachgewiesen, die als Bindungspartner von CARP nach ihrer Identifizierung Aufschluss über die bisher unbekannt Funktion von CARP geben könnten.

Speziell die Massenspektrometrie stellt eine hocheffiziente Technologie dar, um in der Zukunft Interaktionspartner von CARP zu identifizieren.

6. Abkürzungsverzeichnis:

A

Abb.	Abbildung
Ag	Antigen
Ak	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua dest.	destilliertes Wasser
AR	Ankyrin Repeats

B

bEND	brain endothelial cells
bp	Basenpaare
BPB	Bromphenolblau
BSA	Rinder-Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise

C

ca.	circa
CARP	Cardiales-Ankyrin-Repeat-Protein
CBP	Calmodulin bindendes Peptid
cDNA	copy Desoxyribonukleinsäure
CD44	Cluster of Differentiation 44
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat

D

Da	Dalton
DAPI	4, 6-Diamidino-2-phenylindol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol

E

EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycoltetraessigsäure
et al.	et alteri
evtl.	eventuell

F

FCS	fötales Kälberserum
FITC	Fluoreszein-Isothiocyanat
FL	Flex Linker

G

g	Gramm
GABP β	GA Binding Peptide beta
GFP	Grün Fluoreszierendes Protein
GP	Glykoprotein

H

h	Stunde
HEK293	Human Embryonic Kidney Cells 293

I

IAA	Iodacetamid
Ig	Immunglobulin
IgG	Immunglobulin G
I κ B	Inhibitor of NF κ B α
IL-1 α	Interleukin-1 α
IL-1 β	Interleukin-1 β
iNOS	induzierbare NO-Synthase
IP	Immunpräzipitation

K

Kb	Kilo-Basenpaare
kDa	Kilodalton

L

L1CAM	L1 Cell Adhesion Molecule
-------	---------------------------

M

M	molar
mA	Milliampere
max.	maximal
MgAcetat	Magnesium Acetat
ml	Milliliter
mM	millimolar
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter

N

NaAcetat	Natrium Acetat
Na ₂ EDTA	Dinatrium Ethylendiamin Tetraacetat

NF-κB	nuclear factor kappa B
NGS	Normal Ziegenserum
NLS	Kernlokalisierungssignal
nNOS	neuronaler NO-Synthase
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
P	
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBS	phosphatgepufferte Saline
PFA	Paraformaldehyd
PMSF	Phenylmethylsulfonyl-fluorid
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
R	
RG	Reaktionsgefäß
RNA	Ribonukleinsäure
RP	Resuspensionspuffer
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
+/-RT	+/-Reverse Transkriptase
RT-PCR	Real-Time Polymerase-Kettenreaktion
S	
SDS	Natriumdodecylsulfat
T	
Tab.	Tabelle
TAP	Tandem Affinity Purification
Taq-Polymerase	Thermus aquaticus Polymerase
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TEV	Tobacco Etch Virus
Tris	Trishydroxymethyl-Aminomethan
Tris-Glycin	Trishydroxymethyl-Aminomethan Glycin
TE	Tris / EDTA-Puffer
TGF-β	Transformierender Wachstumsfaktor beta
TNF-α	Tumornekrosefaktor alpha
U	
U	Unit
u. a.	unter anderem

V

V

Volt

W

WT

Wildtyp

Y

YB-1

Y-Box-Protein 1

Z

z. B.

zum Beispiel

7. Literaturverzeichnis

1. Aihara Y, Kurabayashi M, Saito Y, Ohyama Y, Tanaka T, Takeda S, Tomaru K, Skiguchi K, Arai M, Nakamura T and Nagai R

Cardiac ankyrin repeat protein is a novel marker of cardiac hypertrophy: role of M-CAT element within the promoter

Hypertension **36**: 48-53, 2000

2. Alberts B

The cell as a collection of protein machines: preparing the next generation of molecular biologists

Cell **92**: 291-294, 1998

3. Bang ML, Mudry RE, McElhinny AS, Trombitás K, Geach AJ, Yamasaki R, Sorimachi H, Granzier H, Gregorio CC and Labeit S

Myopalladin, a novel 145-kilodalton sarcomeric protein with multiple roles in Z-disc and I-band protein assemblies

J Cell Biol **153**: 413-427, 2001

4. Bauer A and Kuster B

Affinity purification-mass spectrometry

Eur J Biochem **270**: 570-578, 2003

5. Baumeister A, Arber S and Caroni P

Accumulation of muscle ankyrin repeat protein transcript reveals local activation of primary myotube endocompartments during muscle morphogenesis

J Cell Biol **139**: 1231-1242, 1997

6. Bennett V and Baines AJ

Spectrin and ankyrin-based pathways: metazoan inventions for integrating cells into tissues

Physiol Rev **81**: 1353-1392, 2001

8. Bennett V and Stenbuck PJ

Human Erythrocyte Ankyrin

The Journal of Biological Chemistry **255**: 2540-2548, 1980

9. Bennett V and Stenbuck PJ

Identification and Partial Purification of Ankyrin, the High Affinity Membrane Attachment Site for Human Erythrocyte Spectrin

The Journal of Biological Chemistry **254**: 2533-2541, 1979

10. Bergmann JE, Tokuyasu KT and Singer SJ

Passage of an integral membrane protein, the vesicular stomatitis virus glycoprotein, through the Golgi apparatus en route to the plasma membrane

Proc Natl Acad Sci USA **78**: 1746-1750, 1981

11. Birkenmeier CS, Whites RA, Peters LL, Hall EJ, Lux SE and Barker JE

Complex Patterns of Sequence Variation and Multiple 5' and 3' Ends Are Found among Transcripts of the Erythroid Ankyrin Gene

The Journal of Biological Chemistry **268**: 9533-9540, 1993

12. Björk I, Petersson BA and Sjöquist J

Some physicochemical properties of protein A from *Staphylococcus aureus*

Eur J Biochem **29**: 579-584, 1972

13. Blancar MA and Rutter WJ

Interaction cloning: identification of a helix-loop-helix zipper protein that interacts with c-Fos

Science **256**: 1014-1018, 1992

14. Bland V, Kourilsky P and Israel A

NF-kappa B and related proteins: Rel/dorsal homologues meet ankyrin-like repeats

Trends Biochem Sci **17**: 135-140, 1992

15. Boengler K, Pipp F, Fernandez B, Ziegelhoeffer T, Schaper W and Deindl E

Arteriogenesis is associated with an induction of the cardiac ankyrin repeat protein (carp)

Cardiovasc Res **59**: 573-581, 2003

16. Bork P

Hundreds of ankyrin-like repeats in functionally diverse proteins: mobile modules that cross phyla horizontally?

Proteins **17**: 363-374, 1993

17. Bours V, Villalobos J, Burd PR, Kelly K and Siebenlist U

Cloning of mitogen-inducible gene encoding a kappa B DNA-binding protein with homology to the rel oncogene and to cell-cycle motifs

Nature **348**: 76-80, 1990

18. Breeden L and Nasmyth K

Cell cycle control of the yeast HO gene: cis- and trans-acting regulators.

Cell **48**: 389-397, 1987

19. Breeden L and Nasmyth K

Similarity between cell-cycle genes of budding yeast and fission yeast and the Notch gene of Drosophila

Nature **329**: 651-654, 1987

20. Carrington JC and Dougherty WG

A viral cleavage site cassette: identification of amino acid sequences required for tobacco etch virus polyprotein processing

Proc Natl Acad Sci USA **85**: 3391-3395, 1988

21. Chang JY

Thrombin specificity. Requirement for apolar amino acids adjacent to the thrombin cleavage site of polypeptide substrate

Eur J Biochem **151**: 217-224, 1985

22. Chang JY, Alkan SS, Hilschmann N and Braun DG

Thrombin specificity. Selective cleavage of antibody light chains at the joints of variable with joining regions and joining constant regions

Eur J Biochem **151**: 225-230, 1985

23. Chu W, Burns DK, Swerlick A and Presky DH

Identification and Characterization of a Novel Cytokine-inducible Nuclear Protein from Human Endothelial Cells

The Journal of Biological Chemistry **270**: 10236-10245, 1995

24. Csapo A, Erdos T, De Mattos CR, Gramss E and Moscovitz C

Stretch-induced uterine growth, protein synthesis and function

Nature **207**: 1378-1379, 1965

25. Davis JQ and Bennett V

Brain ankyrin. A membrane-associated protein with binding sites for spectrin, tubulin and the cytoplasmic domain of the erythrocyte anion channel

J Biol Chem **259**: 13550-13559, 1984

26. Davis N, Gosh S, Simmons DL, Tempst P, Liou HC, Baltimore D and Bose HR Jr

Rel-associated pp40: an inhibitor of the rel family of transcription factors

Science **253**: 1268-1271, 1991

27. de Martin R, Vanhove B, Cheng Q, Hofer E, Csizmadia V, Winkler H and Bach FH

Cytokine-inducible expression in endothelial cells of an I kappa B alpha-like gene is regulated by NF kappa B

EMBO J **12**: 2773-2779, 1993

28. de Waard V, van Achterberg TA, Beauchamp NJ, Pannekoek H and de Vries CJ

Cardiac ankyrin repeat protein (CARP) expression in human and murine atherosclerotic lesions: activin induces CARP in smooth muscle cells
Arterioscler Thromb Vasc Biol **23**: 64-68, 2003

29. Dougherty WG, Carrington JC, Cary SM and Parks TD

Biochemical and mutational analysis of a plant virus polyprotein cleavage site
EMBO J **7**: 1281-1287, 1988

30. Dougherty WG, Cary SM and Parks TD

Molecular genetic analysis of a plant virus polyprotein cleavage site: a model
Virology **171**: 356-364, 1989

31. Dougherty WG and Parks TD

Molecular genetic and biochemical evidence for the involvement of the heptapeptide cleavage sequence in determining the reaction profile at two tobacco etch virus cleavage sites in cell-free assays
Virology **172**: 145-155, 1989

32. Dougherty WG, Parks TD, Cary SM, Bazan JF and Fletterick RJ

Characterization of the catalytic residues of the tobacco etch virus 49-kDa proteinase
Virology **172**: 302-310, 1989

33. Drakas R, Prisco M and Baserga R

A modified tandem affinity purification tag technique for the purification of protein complexes in mammalian cells
Proteomics **5**: 132-137, 2005

34. Einhauer A and Jungbauer A

Affinity of the monoclonal antibody M1 directed against the FLAG peptide
J Chromatogr A **921**: 25-30, 2000

35. Einhauer A and Jungbauer A

The FLAG peptide, a versatile fusion tag for the purification of recombinant proteins

J Biochem Biophys Methods **49**:455-465, 2001

36. Einhauer A, Schuster M, Wasserbauer E and Jungbauer A

Expression and purification of homogenous proteins in *Saccharomyces cerevisiae* based on ubiquitin-FLAG fusion

Protein Expr Purif **24**: 497-504, 2002

37. Eisenberg D, Marcotte EM, Xenarios I and Yeates TO

Protein function in the post-genomic era

Nature **405**: 823-826, 2000

38. Fischer M, Goldschmitt J, Peschel C, Brakenhoff JPG, Kallen KJ, Wollmer A, Grötzinger J and Rose-John S

A bioactive designer cytokine for human hematopoietic progenitor cell expansion

Nature Biotechnology **15**: 142-145, 1997

39. Fontaine L, Meynial-Salles I, Girbal L, Yang X, Croux C and Soucaille P

Molecular characterization and transcriptional analysis of adhE2, the gene encoding the NADH-dependent aldehyde/alcohol dehydrogenase responsible for butanol production in alcoholgenic cultures of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824

J Bacteriol **184**: 821-830, 2002

40. Forrer P, Stumpp MT, Binz HK and Plückthun A

A novel strategy to design binding molecules harnessing the molecular nature of repeat proteins

FEBS Lett **539**: 2-6, 2003

41. Forsgren A and Sjöquist J

“Protein A” from *S. aureus*. I. Pseudo-immune reaction with human gamma-globulin

J Immunol **97**: 822-827, 1966

42. Garcia-Anoveros J and Corey DP

The molecules of mechanosensation

Annu Rev Neurosci **20**: 567-594, 1997

43. Gavin AC, Bösche M, Krause R, Grandi P, Marzioch M, Bauer A, Schultz J, Rick JM, Michon AM, Cruciat CM, Remor M, Höfert C, Schelder M, Brajenovic M, Ruffner H, Merino A, Klein K, Hudak M, Dickson D, Rudi T, Gnau V, Bauch A, Bastuck S, Huhse B, Leutwein C, Heurtier MA, Copley RR, Edlmann A, Querfurth E, Rybin V, Drewes G, Raida M, Bouwmeester T, Bork P, Seraphin B, Kuster B, Neubauer G and Superti-Furga G

Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes

Nature **415**: 141-147, 2002

44. Gödecke A, Flögel U, Zanger K, Ding Z, Hirchenhain J, Decking UK and Schrader J

Disruption of myoglobin in mice induces multiple compensatory mechanisms

Proc Natl Acad Sci **18**: 10495-500, 1999

45. Gödecke A, Molojavyi A, Heger J, Flögel U, Ding Z, Jacoby C and Schrader J

Myoglobin protects the heart from inducible nitric-oxide synthase (iNOS)-mediated nitrosative stress

J Biol Chem **24**: 21761-6, 2003

46. Graham FL, Smiley J, Russell WC and Nairn R

Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5

J Gen Virol **36**: 59-74, 1977

47. Graham FL and van der Eb AJ

A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA
Virology **52**: 456-467, 1973

48. Granzier H and Labeit S

Cardiac titin: an adjustable multi-functional spring
J Physiol **541**: 335-342, 2002

49. Guan KL and Dixon JE

Eukaryotic proteins expressed in *Escherichia coli*: an improved thrombin cleavage and purification procedure of fusion proteins with glutathione S-transferase
Anal Biochem **192**: 262-267, 1991

50. Hanai J, Chen LF, Kanno T, Ohtani-Fujita N, Kim WY, Guo WH, Imamura T, Ishidou Y, Fukuchi M, Shi MJ, Stavnezer J, Kawabata M, Miyazono K and Ito Y

Interaction and functional cooperation of PEBP2/CBF with Smads. Synergistic induction of the immunoglobulin germline $\text{C}\alpha$ promoter
J Biol Chem **274**: 31577-31582, 1999

51. Haskill S, Beg AA, Tompkins SM, Morris JS, Yurochko AD, Sampson-Johannes A, Mondal K, Ralph P and Baldwin AS Jr

Characterization of an immediate-early gene induced in adherent monocytes that encodes I kappa B-like activity
Cell **65**: 1281-1289, 1991

52. Haun RS and Moss J

Ligation-independent cloning of glutathione S-transferase fusion genes for expression in *Escherichia coli*
Gene **112**: 37-43, 1992

53. Head JF

A better grip on calmodulin

Curr Biol **2**: 609-611, 1992

54. Heger J, Gödecke A, Flögel U, Merx MW, Molojavyi A, Kühn-Velten WN and Schrader J

Cardiac-specific overexpression of inducible nitric oxide synthase does not result in severe cardiac dysfunction

Circ Res **1**: 93-9, 2002

55. Hopp TP, Gallis B and Prickett KS

Metal-binding properties of a calcium-dependent monoclonal antibody

Mol Immunol **33**: 601-608, 1996

56. Hopp TP, Prickett KS, Price VL, Libby RT, March CJ, Ceretti DP, Urdal DL and Conlon PJ

A short polypeptide marker sequence useful for recombinant protein identification and purification

Bio/Technology **6**: 1204-1210, 1988

57. Hoshijima M

Mechanical stress-strain sensors embedded in cardiac cytoskeleton: Z disk, titin and associated structures

Am J Physiol Heart Circ Physiol **290**: 1313-1325, 2006

58. Ignatz RA and Massagué J

Transforming growth factor-beta stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into the extracellular matrix

J Biol Chem **261**: 4337-4345, 1986

59. Ishiguro N, Baba T, Ishida T, Takeuchi K, Osaki M, Araki N, Okada E, Takahashi S, Saito M, Watanabe M, Nakada C, Tsukamoto Y, Kenzo S, Ito K, Fukayama M, Mori S, Ito H and Moriyama M

Carp, a Cardiac Ankyrin-Repeated Protein, and Its New Homologue, Arpp, Are Differentially Expressed in Heart, Skeletal Muscle, and Rhabdomyosarcomas

Am J Pathol **160**: 1767-1778, 2002

60. Jeyaseelan R, Poizat C, Baker RK, Abdishoo S, Isterabadi LB, Lyons GE and Kedes L

A novel cardiac-restricted target for doxorubicin. CARP, a nuclear modulator of gene expression in cardiac progenitor cells and cardiomyocytes

J Biol Chem **272**: 22800-22808, 1997

61. Jonk LJ, Itoh S, Heldin CH, ten Dijke P and Kruijer W

Identification and functional characterization of a Smad binding element (SBE) in the JunB promoter that acts as a transforming growth factor-beta, activin and bone morphogenetic protein-inducible enhancer

J Biol Chem **273**: 21145-21152, 1998

62. Kanai H, Tanaka T, Aihara Y, Takeda S, Kawabata M, Miyazono K, Nagai R and Kurabayashi M

Transforming growth factor-beta/Smads signaling induces transcription of the cell type-restricted ankyrin repeat protein CARP gene through CAGA motif in vascular smooth muscle cells

Circ Res **88**: 30-36, 2001

63. Klevit RE, Blumenthal DK, Wemmer DE and Krebs EG

Interaction of calmodulin and a calmodulin-binding peptide from myosin light chain kinase: major spectral changes in both occur as the result of complex formation

Biochemistry **24**: 8152-8157, 1985

64. Knöll R, Hoshijima M and Chien K

Cardiac mechanotransduction and implications for heart disease

J Mol Med **81**: 750-756, 2003

65. Knuesel M, Wan Y, Xiao Z, Holinger E, Lowe N, Wang Wei and Liu Xuedong

Identification of Novel Protein-Protein Interactions Using A Versatile Mammalian Tandem Affinity Purification Expression System

Mol Cell Proteomics **2** : 1225-1233, 2003

66. Kuo H, Chen J, Ruiz-Lozano P, Zou Y, Nemer M and Chien KR

Control of segmental expression of the cardiac-restricted ankyrin repeat protein gene by distinct regulatory pathways in murine cardiogenesis

Development **126**: 4223-4234, 1999

67. Laiho M, Rönstrand L, Heino J, Decaprio JA, Ludlow JW, Livingston DM and Massagué J

Control of junB and extracellular matrix protein expression by transforming growth factor-beta 1 is independent of simian virus 40 T antigen-sensitive growth-sensitive growth-inhibitory events

Mol Cell Biol **11**: 972-978, 1991

68. Lambert S, Yu H, Prchal JT, Lawler J, Ruff P, Speicher D, Cheung MC, Kan YW and Palek J

cDNA sequence for human erythrocyte ankyrin

Proc Natl Acad Sci USA **87**: 1730-1734, 1990

69. Li J, Mahajan A and Tsai MD

Ankyrin repeat: a unique motif mediating protein-protein-interactions

Biochemistry **45**: 15168-15178, 2006

70. Li Q, Dai X-Q, Shen PY, Cantiello HF, Karpinski E and Chen X-Z

A modified mammalian tandem affinity purification procedure to prepare functional polycystin-2 channel

FEBS Lett **576**: 231-236, 2004

71. Linke WA and Granzier H

A spring tale: new facts on titin elasticity

Biophys J **75**: 2613-2614, 1998

72. Löfdahl S, Guss B, Uhlén M, Philipson L and Lindberg M

Gene for staphylococcal protein A

Proc Natl Acad Sci USA **80**: 697-701, 1983

73. Lux SE, Tse WT, Menninger JC, John KM, Harris P, Shalev O, Chilcote RR, Marchesi SL, Watkins PC and Bennett V

Hereditary spherocytosis with deletion of human erythrocyte ankyrin gene on chromosome 8

Nature **345**: 736-739, 1990

74. Main ER, Jackson SE and Regan L

The folding and design of repeat proteins: reaching a consensus

Curr Opin Struct Biol **13**: 482-489, 2003

75. Maroux S, Baratti J and Desnuelle P

Purification and specificity of porcine enterokinase

J Biol Chem **246**: 5031-5039, 1971

76. Massagué J and Polyak K

Mammalian antiproliferative signals and their targets

Curr Opin Genet Dev **5**: 91-96, 1995

77. Michaely P and Bennett V

The ANK repeat: a ubiquitous motif involved in macromolecular recognition

Trends Cell Biol **2**: 127-129, 1992

78. Miller MK, Bang ML, Witt CC, Labeit D, Trombitas C, Watanabe K, Granzier H, McElhinny AS, Gregorio CC and Labeit S

The muscle ankyrin repeat proteins: CARP, ankrd2/Arpp and DARP as a family of titin filament-based stress response molecules

J Mol Biol **333**: 951-964, 2003

- 79. Mochizuki H, Schwartz JP, Tanaka K, Brady RO and Reiser J**
High-titer human immunodeficiency virus type 1-based vector systems for gene delivery into nondividing cells
J Virol **72**: 8873-8883, 1998
- 80. Mosavi LK, Cammett TJ, Desrosiers DC and Peng ZY**
The ankyrin repeat as molecular architecture for protein recognition
Protein Sci **13**: 1435-48, 2004
- 81. Murphy JT and Lagarias JC**
Purification and characterization of recombinant affinity peptide-tagged oat phytochrome A
Photochem Photobiol **65**: 750-758, 1997
- 82. Nilsson B, Abrahmsén L and Uhlén M**
Immobilization and purification of enzymes with staphylococcal protein A gene fusion vectors
EMBO J **4**: 1075-1080, 1985
- 83. Ohno H, Takimoto G and McKeithan TW**
The candidate proto-oncogene bcl-3 is related to genes implicated in cell lineage determination and cell cycle control
Cell **60**: 991-997, 1990
- 84. Osadchii OE**
Cardiac hypertrophy induced by sustained beta-adrenoreceptor activation: pathophysiological aspects
Heart Fail Rev **1**: 66-86, 2007
- 85. Osadchii OE**
Myocardial phosphodiesterases and regulation of cardiac contractility in health and cardiac disease
Cardiovasc Drugs Ther **3**: 171-94, 2007

86. Osadchii OE, Woodiwiss AJ, Deftereos D and Norton GR

Temporal changes in myocardial adrenergic regulation with the progression to pump dysfunction after chronic beta-adrenoreceptor activation in rats

Pflugers Arch **2**: 251-60, 2007

87. Parks TD, Leuther KK, Howard ED, Johnston SA and Dougherty WG

Release of proteins and peptides from fusion proteins using a recombinant plant virus proteinase

Anal Biochem **216**: 413-417, 1994

88. Peters LL and Lux SE

Ankyrins: structure and function in normal cells and hereditary spherocytes

Semin Hematol **30**: 85-118, 1993

89. Pette D

Historical perspectives: plasticity of mammalian skeletal muscle

J Appl Physiol **90**: 1119-1124, 2001

90. Puig O, Caspary F, Rigaut G, Rutz B, Bouveret E, Bragado-Nilsson E, Wilm M and Séraphin B

The tandem affinity purification (TAP) method: a general procedure of protein complex purification

Methods **24**: 218-229, 2001

91. Reiser J, Harmison G, Kluepfel-Stahl S, Brady RO, Karlsson S and Schubert M

Transduction of nondividing cells using pseudotyped defective high-titer HIV type 1 particles

Proc Natl Acad Sci USA **93**: 15266-15271, 1996

92. Rigaut G, Shevchenko A, Rutz B, Wilm M, Mann M and Seraphin B

A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration

Nat Biotechnol **17**: 1030-1032, 1999

93. Rose JK and Bergmann JE

Altered cytoplasmic domains affect intracellular transport of the vesicular stomatitis virus glycoprotein

Cell **34**: 513-524, 1983

94. Rose JK and Gallione CJ

Nucleotide sequences of the mRNA's encoding the vesicular stomatitis virus G and M proteins determined from cDNA clones containing the complete coding regions

J Virol **39**: 519-528, 1981

95. Rothman JE and Lodish HF

Synchronised transmembrane insertion and glycosylation of a nascent membrane protein

Nature **269**: 775-780, 1977

96. Sackin H

Mechanosensitive channels

Annu Rev Physiol **57**: 333-353, 1995

97. Sadoshima J and Izumo S

Mechanotransduction in stretch-induced hypertrophy of cardiac myocytes

J Recept Res **13**: 777-794, 1993

98. Sadoshima J, Takahashi T, Jahn L and Izumo S

Roles of mechano-sensitive ion channels, cytoskeleton and contractile activity in stretch-induced immediate-early gene expression and hypertrophy of cardiac myocytes

Proc Natl Acad Sci USA **89**: 9905-9909, 1992

99. Schmidt TG, Koepke J, Frank R and Skerra A

Molecular interaction between the Strep-tag affinity peptide and its cognate target, streptavidin

J Mol Biol **255**: 753-766, 1996

100. Schmidt TG and Skerra A

The random peptide library-assisted engineering of a C-terminal affinity peptide, useful for detection and purification of a functional Ig Fv fragment
Protein Eng **6**: 109-122, 1993

101. Schuster M, Einhauer A, Wasserbauer E, Süssenbacher F, Ortner C, Paumann M, Werner G and Jungbauer A

Protein expression in yeast; comparison of two expression strategies regarding protein maturation
J Biotechnol **84**: 237-248, 2000

102. Sedgwick SG and Smerdon SJ

The ankyrin repeat: a diversity of interactions on a common structural framework
Trends Biochem Sci **24**: 311-316, 1999

103. Shi Y, Reitmaier B, Regenbogen J, Slowey RM, Opalenik SR, Wolf E, Goppelt A and Davidson JM

CARP, a Cardiac Ankyrin Repeat Protein, Is Up-Regulated during Wound Healing and Induces Angiogenesis in Experimental Granulation Tissue
Am J Pathol **166**: 303-312, 2005

104. Sjö Dahl J

Repetitive sequences in protein A from *Staphylococcus aureus*. Arrangement of five regions within the protein, four being highly homologous and Fc-binding
Eur J Biochem **73**: 343-351, 1977

105. Sjö Dahl J

Structural studies on the four repetitive Fc-binding regions in protein A from *Staphylococcus aureus*
Eur J Biochem **78**: 471-490, 1977

106. Skerra A and Schmidt TG

Use of the Strep-Tag and streptavidin for detection and purification of recombinant proteins

Methods Enzymol **326**: 271-304, 2000

107. Smyth N, Odenthal U, Merkl B and Paulsson M

Eukaryotic expression and purification of recombinant extracellular matrix proteins carrying the Strep II tag

Methods Mol Biol **139**: 49-57, 2000

108. Stefanini M, De Martino C and Zamboni L

Fixation of ejaculated spermatozoa for electron microscopy

Nature **216**: 173-174, 1967

109. Stofko-Hahn RE, Carr DW and Scott JD

A single step purification for recombinant proteins. Characterization of a microtubule associated protein (MAP 2) fragment which associates with the type II cAMP-dependent protein kinase

FEBS Lett **302**: 274-278, 1992

110. Terpe K

Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems

Appl Microbiol Biotechnol **60**: 523-533, 2003

111. Tewari M, Dobrzanski P, Mohn KL, Cressmann DE, Hsu JC, Bravo R and Taub R

Rapid induction in regenerating liver of RL/IF-1 (an I kappa B that inhibits NF-kappa B, RelB-p50 and c-Rel-p50) and PHF, a novel kappa B site-binding complex

Mol Cell Biol **12**: 2898-2908, 1992

112. Thompson CC, Brown TA and McKnight SL

Convergence of Ets- and notch-related structural motifs in a heteromeric DNA binding complex

Science **253**: 762-768, 1991

113. Toneguzzo F and Ghosh HP

In vitro synthesis of vesicular stomatitis virus membrane glycoprotein and insertion into membranes

Proc Natl Acad Sci USA **75**: 715-719, 1978

114. Tsukamoto Y, Senda T, Nakano T, Nakada C, Hida T, Ishiguro N, Kondo G, Baba T, Sato K, Osaki M, Mori S, Ito H and Moriyama M

Arpp, a New Homolog of CARP, Is Preferentially Expressed in Type 1 Skeletal Muscle Fibers and Is Markedly Induced by Denervation

Laboratory Investigation **82**: 645-655, 2002

115. Uhlén M, Nilsson B, Guss B, Lindberg M, Gatenbeck S and Philipson L

Gene fusion vectors based on the gene for staphylococcal protein A

Gene **23**: 369-378, 1983

116. Voss S and Skerra A

Mutagenesis of a flexible loop in streptavidin leads to higher affinity for the Strep-tag II peptide and improved performance in recombinant protein purification

Protein Eng **10**: 975-982, 1997

117. Wong C, Rougier-Chapman EM, Frederick JP, Datto MB, Liberati NT, Li JM and Wang XF

Smad3-Smad4 and AP-1 complexes synergize in transcriptional activation of the c-Jun promoter by transforming growth factor beta

Mol Cell Biol **19**: 1821-1830, 1999

118. Zheng CF, Simcox T, Xu L and Vaillancourt P

A new expression vector for high level protein production, one step purification and direct isotopic labelling of calmodulin-binding peptide fusion proteins
Gene **186**: 55-60, 1997

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

8. Publikationen

Weser S, Gerlach M, Kwak DM, Czerwinska M and Gödecke A

Detection of TAP-tagged proteins in Western blot, confocal laser scanning microscopy and FACS using the ZZ-domain

J Biochem Biophys Methods **68**: 189-194, 2006

Experimental Biology 2007, Washington DC:

Naguib M, Kwak DMS, Reinartz M, Kurig B, Weser S and Gödecke A

The Cardiac Ankyrin Repeat Protein (ANKRD1) Is Associated With Proteins Of The Cytoskeleton

The FASEB Journal **21**: 760 – 766, 2007

Deutsche Gesellschaft für Kardiologie, Herz- Kreislaufforschung, Frühjahrstagung 2007:

Naguib M, Kwak DMS, Reinartz M, Kurig B, Weser S und Gödecke A

Das Kardiale Ankyrin Repeat Protein (CARP) ist mit Proteinen des Zytoskeletts assoziiert

Clin Res Card **96** (Suppl 1): P1223, 2007

Deutsche Physiologische Gesellschaft 2007:

Naguib M, Kwak DMS, Reinartz M, Kurig B, Weser S and Gödecke A

The Cardiac Ankyrin Repeat Protein (ANKRD1) Is Associated With Proteins Of The Cytoskeleton

Acta Physiologica **198** (Suppl 653): 126, 2007

Deutsche Physiologische Gesellschaft 2008:

Naguib M, Fazeli S, Sommer R, Kwak DMS, Kurig B, Reinartz M, Metzger S and Gödecke A

ANKRD1 is associated with dynamic cytoskeleton dependent processes in HEK293 cells

Acta Physiologica **192** (Suppl 663): 192, 2008

9. Danksagung

Ich danke Gott, dass er mir die Kraft gibt die Hürden im Leben zu meistern und meine Familie beschützt.

Mein großer Dank geht an meinen Doktorvater Herrn Prof. Dr. rer. nat. Axel Gödecke, der mir das Thema zur Verfügung stellte. Es waren sehr lehrreiche und erfahrungsvolle Jahre, die ich unter seiner Leitung verbringen durfte. Sowohl menschlich als auch fachlich ist Herr Prof. Gödecke ein großes Vorbild.

Ich danke ihm für seine pausenlose Unterstützung und Hilfestellung, die ich all' die Jahre erhalten habe.

Ich bedanke mich aus tiefstem Herzen bei meiner Familie, meiner Freundin und meinen Freunden. Ohne sie wäre all' das nicht möglich gewesen und auch vollkommen bedeutungslos...

내 가족을 위해, 내 조국을 위해!

Ein großes Dankeschön geht auch an Frau Patzer, Frau Küsters, Fr. Dr. Emde und an Fr. Dr. Naguib. Ohne deren Hilfe und fachliche Unterstützung, hätte ich diese Arbeit nicht so toll hinbekommen. Vielen Dank!

10. Curriculum Vitae

PERSÖNLICHE DATEN

Name, Vorname	Kwak, Min-Seok
Geburtsdatum	24. November 1980
Geburtsort	Krefeld
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch

SCHULAUSBILDUNG

08/1987 – 07/1991	Barbara-Gerretz-Grundschule, Meerbusch
08/1991 – 06/2000	Cecilien-Gymnasium, Düsseldorf

ZIVILDienst

08/2000 – 06/2001	Dominikus-Krankenhaus, Düsseldorf
-------------------	-----------------------------------

STUDIUM

10/2001 – 06/2008	Studium der Humanmedizin an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
10/2005 – 03/2006	Forschungssemester
09/2003	Ärztliche Vorprüfung
06/2008	2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung

SONSTIGES

Sprachkenntnisse	Koreanisch, Englisch, Spanisch, Latein
Hobbys	Taekwondo, Basketball, Fotografie, Kunst

11. Anhang

Funktionelle Parameter der Hypertrophie Mausmodelle, die im Rahmen dieser Arbeit mittels RT-PCR auf CARP-Expression untersucht wurden (Die Daten wurden von Dr. A. Molojavyi erhoben und zur Beurteilung der verwendeten Proben hier zusammengefasst).

Tabelle A 1: Vergleich funktioneller Parameter von Mäuseherzen in vivo unter basalen Bedingungen und nach transversaler Aortenkonstriktion (TAC).

	basal		TAC	
Ped [mmHg]	3,1 ±	0,6	11,4 ±	4,5 **
DP [mmHg]	93 ±	8,3	130 ±	6,9 **
dP/dt _{max} [mmHg/s]	11989 ±	1585	6859 ±	848 **
dP/dt _{min} [mmHg/s]	-7471 ±	1312	-5893 ±	813 *
dP/dt/iP [s ⁻¹]	175,9 ±	11,3	150 ±	11 **
tau	2,6 ±	0,5	9,9 ±	1,8 **
SV [μl]	18 ±	4,3	15 ±	5,8 *
HZV [μl]	10648 ±	1857	7002 ±	3232 **
HF [min ⁻¹]	603 ±	38	457 ±	51 **
EDV [μl]	22,7 ±	3,9	30,9 ±	6,1 *
ESV [μl]	4,8 ±	1,1	16 ±	5,7 **

Die Tabelle listet Mittelwerte ± Standardabweichung zur Herzfunktion für je n=6 gemessene Tiere unter basalen Bedingungen und nach transversaler Aortenkonstriktion an. Die Zahl in Klammern gibt die jeweilige Anzahl der gemessenen Tiere an. * p<0,05 vs. Wildtyp.

(HR= Herzfrequenz, LVDP= links-ventrikulärer entwickelter Druck, Ves= endsystolisches Volumen, Ved=enddiastolisches Volumen, SV= Schlagvolumen, EF= Ejektionsfraktion, HZV= Herzzeitvolumen, dP/dt_{max} = maximale Druckanstiegsgeschwindigkeit, dP/dt_{min} = maximale Druckabfallgeschwindigkeit, dP/dt/iP = Kontraktilitätsindex).

Die signifikante Veränderung aller funktionellen Parameter zeigt eine deutliche Funktionsverschlechterung infolge gesteigerter Druckbelastung des Herzens (s. Anstieg im DP).

Tabelle A 2: Funktionelle Charakterisierung der Wildtyp Mäuse (WT), Myoglobin-Knockout Mäuse (myo^{-/-}), Mäuse mit Kardiomyozyten-spezifischer iNOS Überexpression (tg-iNOS), und doppelt transgenen Mäusen (tg-iNOS/myo^{-/-}).

	WT (12)	myo ^{-/-} (13)	tg-iNOS (12)	tg-iNOS/myo ^{-/-} (12)
HR (1/min)	579 ± 67	583 ± 73	559 ± 42	559 ± 61
LVDP (mm Hg)	88 ± 7.4	84 ± 8	83 ± 8	77 ± 11*
Ves (µl)	11.0 ± 5.3	12 ± 4	13 ± 5	26 ± 6*
Ved (µl)	25.1 ± 7.8	27 ± 7	28 ± 6	36 ± 5*
SV (µl)	14.4 ± 4.0	15 ± 4	15 ± 5	11 ± 5
EF (%)	61 ± 14	6 ± 13	54 ± 12	31 ± 11*
HZV (µl/min)	8324 ± 2238	8840 ± 2396	8319 ± 2848	6034 ± 2262
dP/dt _{max} (mm Hg/s)	10838 ± 1519	10110 ± 1538	9943 ± 1648	7254 ± 2205*
dP/dt _{min} (mm Hg/s)	6942 ± 979	6362 ± 1545	5783 ± 1169*	5385 ± 1116*

Die Tabelle listet Messwerte zur Herzfunktion auf, die mittels Konduktanzmanometrie an anästhesierten Mäusen in vivo gewonnen wurden. Die Zahl in Klammern gibt die jeweilige Anzahl der gemessenen Tiere an. * p<0,05 vs. Wildtyp.
 (HR= Herzfrequenz, LVDP= links-ventrikulärer entwickelter Druck, Ves= endsystolisches Volumen, Ved=enddiastolisches Volumen, SV= Schlagvolumen, EF= Ejektionsfraktion, HZV= Herzzeitvolumen, dP/dt_{max} = maximale Druckanstiegsgeschwindigkeit, dP/dt_{min} = maximale Druckabfallgeschwindigkeit)

Tabelle A 3: Funktionelle Charakterisierung der Herzfunktion bei einer Isoproterenol-induzierten Herzinsuffizienz.

	basal		ISO		
dP/dt _{max} [mmHg*s ⁻¹]	10043 ±	1366	14165 ±	1247	**
dP/dt _{min} [mmHg*s ⁻¹]	8195 ±	1092	11082 ±	1390	*
dP/dt /iP [s ⁻¹]	147 ±	13	170 ±	15	**
Ved [μl]	28 ±	5	38 ±	3	**
Ves [μl]	9 ±	3	22 ±	5	**
EF [%]	69 ±	7	43 ±	12	**
HR [min ⁻¹]	549 ±	27	692 ±	39	**

Die Tabelle zeigt Messwerte zur Herzfunktion, die an je n=8 Tieren mittels Konduktanzmanometrie an anästhesierten Mäusen in vivo gewonnen wurden. basal: undehandelte Tiere, ISO (Isoproterenol Applikation für 14 d (4 mg/(kg*d))). * p<0,05 vs. basal. ** p<0,01 vs. basal. (HR= Herzfrequenz, Ves= endsystolisches Volumen, Ved=enddiastolisches Volumen, EF= Ejektionsfraktion, dP/dt_{max} = maximale Druckanstiegsgeschwindigkeit, dP/dt_{min} = maximale Druckabfallgeschwindigkeit).

Isoproterenol-Behandlung führt zur einer gesteigerten Kontraktilität (s. Anstiege in dP/dt_{max}, dP/dt_{min}, dP/dt /iP. Mit der chronischen Isoproterenol-Behandlung ist eine linksventrikuläre Dilatation verbunden (s. Ves und Ved), die sich auch in einer eingeschränkten Ejektionsfraktion (EF) niederschlagen.