Universität Ulm

Institut für Pharmakologie und Toxikologie

Leiter: Prof. Dr. Peter Gierschik

Herstellung und Reinigung von TPD52-Fusionsproteinen zur Proteintransduktion von Säugetierzellen

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin

(Dr. med.)

der Medizinischen Fakultät

der Universität Ulm

vorgelegt von

Oliver Schindler

geb. in Frankfurt (Oder)

2011

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Thomas Wirth

1. Berichterstatter: PD Dr. Barbara Möpps

2. Berichterstatter: PD Dr. Oliver Zimmermann

Tag der Promotion: 12.01.2012

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis III

1. Einleitung 1

1.1 Chemokine und ihre Rezeptoren 2

1.1.1 Chemokine 2

1.1.2 Chemokinrezeptoren - Sieben transmembranäre G-Protein-gekoppelte Rezeptoren 4

1.2 MCP-1/CCL2 und seine Rezeptoren CCR2a und CCR2b 8

1.3 Die Tumorproteinfamilie D52 11

1.4 Ziele der Arbeit 13

2. Material 15

3. Methoden 23

3.1 Mikrobiologische Methoden 23

3.2 Molekularbiologische Methoden 24

3.3 Kultivierung eukaryotischer Zellen 29

3.4 Proteinbiochemische Methoden 32

3.5 Aufreinigung von Proteinen - Chromatografische Methoden 39

3.6 Proteintransduktion von Säugetierzellen 41

4. Ergebnisse 45

4.1 Herstellung von Strep-TPD52-kodierenden cDNAs 46

4.1.1 Herstellung einer Strep-TPD52-kodierenden cDNA für die bakterielle Expression 46

4.1.2 Herstellung einer Strep-TPD52-kodierenden cDNA für die Expression in Säugetierzellen 46

4.2. Untersuchungen zur Lokalisation und Funktionalität des Strep-TPD52-Proteins in HEK293-Zellen 47

4.2.1 Analyse der subzellulären Lokalisation von Strep-TPD52 im Vergleich zu Myc-TPD52 in HEK293-Zellen 47

4.2.2 Analyse der Funktionalität von Strep-TPD52 im Vergleich zu Myc-TPD52 in HEK293-Zellen 48

4.3 Optimierung der Proteinexpression von den Strep-TPD52-Fusionsproteinen im bakteriellen Expressionssystem 51

4.4 Chromatografische Reinigung des Strep-TPD52-Proteins an einer Strep-Tactin®-Matrix 53

4.5 Chromatografische Reinigung der in der Fraktion F1 enthaltenen Strep-TPD52-Fusionsproteine an einer Superdex 200-Matrix 56

4.6 Proteintransduktion verschiedener Säugetierzellen mit Strep-TPD52 60

4.6.1 Proteintransduktion von COS-7-Zellen mit Strep-TPD52 61

4.6.2 Proteintransduktion von HEK293-Zellen mit Strep-TPD52-Proteinen 63

4.6.3 Proteintransduktion von THP-1-Zellen mit Strep-TPD52-Proteinen 64

4.7 Herstellung einer TAT-HA-TPD52-kodierenden cDNA für die Expression in Säugetierzellen 65

5. Diskussion 67

6. Zusammenfassung 75

7. Literaturverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

7TM-GPCR	7-transmembranärer G-Protein-gekoppelter Rezeptor
A	Adenosin
A	Adenin
Abb.	Abbildung
ad	bis zu (lateinisch)
AK	Antikörper
ANTP	*antennapedia*, Drosophila-Gen
ApoE	Apolipoprotein-E
APS	Ammoniumpersulfat
B16-F0	murine Melanom-Zelllinie
BHK	*baby hamster kidney cell line*
BSA	Rinderserumalbumin
BsaI	Restriktionsendonuklease
bzw.	beziehungsweise
C	Cystein
C	Cytidin
C2-Toxin	binäres C2-Toxin von *clostridium botulinum*
C2I	Protein I des binären C2-Toxins
C2II	Protein II des binären C2-Toxins
Ca^{2+}	Kalziumion
CCL	CC *chemokine ligand*
CCR	CC *chemokine receptor*
CD	*cluster of differentiation*
cDNA	*complementary DNA*
CHO-K	*chinese hamster ovary cell line*
Cl	Chlorid-Ion
CMF-PBS	Calcium- und Magnesium-freies PBS
CO_2	Kohlenstoffdioxid
COS-7-Zellen	*african green monkey kidney cells*
C-Terminus	Carboxylterminus
CV-1 Fibroblasten	Affennieren Fibroblasten (Zell-Linie)
CX_3CL	CX_3C *chemokine ligand*

CX_3CR	CX_3C *chemokine receptor*
CXCL	CXC *chemokine ligand*
CXCR	CXC *chemokine receptor*
Da	Dalton
ddH_2O	bidestilliertes Wasser
DH5α	Bakterienstamm *(Escherichia coli)*
DMEM	*dulbecco's modified eagle medium*
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2´-Desoxynukleotid-5´-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
E. coli	*Escherichia coli*
ECL	*enhanced chemiluminescence*
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	und andere (lateinisch)
FCS	*fetal calf serum* (fötales Kälberserum)
FITC	Flourescein
g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s2)
G	Glycin
G	Guanin
G-Protein	Guaninnukleotid-bindendes Protein
Gα	α-Untereinheit eines heterotrimeren G-Proteins
GEF	*guanine nucleotide exchange factor*
GTP	Guanosin-5´-triphosphat
h	Stunde
h (als Präfix)	human
H_2O	Wasser
HABA	2-(4-Hydroxyphenylazo) benzoesäure
H	Wasserstoff
HEK293	*human embryonic kidney cells* (Zelllinie)
HeLa	*human epithelial cervix adenocarcinoma cells*
HepG2	*human hepatoblastoma cell line*
HindIII	Restriktionsendonuklease
His-*tag*	*tag* aus sechs Histidinen

HIV	humanes Immundefizienz-Virus
HSV-TK	Herpes-simplex-Virus-Thymidinkinasegen
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
K	Kalium-Ion
Kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
Kpn1	Restriktionsendonuklease
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
LDL	*low densitiy lipoprotein*
LDLox	oxidiertes *low densitiy lipoprotein*
LMW	*low molekular weight marker*
LPS	Lysophosphatidsäure
MAL	*myelin and lymphocyte protein*
MAPK	*mitogen-activated protein kinase*
MCP	*monocytic chemoattractant-protein*
MDCK	*madin-darby canine kidney cells*
Mg	Magnesium-Ion
MEM	*minimum essential medium*
M_r	*relative molar mass*
mRNA	messenger RNA
Myc-*tag*	Myc-Epitop-*tag*; EQKLISEEDL
N-Terminus	Aminoterminus
Na	Natrium
NC-IUPHAR	*Nomenclature Committee of the International Union of Pharmacology*
NIH3T3	murine embryonale Fibroblasten (Zell-Linie)
OD_{550}	Optische Dichte bei 550 nm
p.a.	*pro analysis*
P19	murine testikuläre Teratokarzinomzellen (Zell-Linie)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAX5	*paired box 5*
PBS	*phosphate-buffered saline*
PCR	polymerase chain reaction

PEG	Polyethylenglykol
PEST-Sequenz	*polypeptide sequence enriched in proline (P), glutamic acid (G), serine (S) and threonine (T)*
pH	*pondus Hydrogenii*
PLCβ	Phospholipase C-ß
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PO_4	Phosphat-Ion
PTD	Protein-Transduktions-Domäne
Rac	*ras-related C3 botulinum toxin substrate*
RE	Restriktions-Endonuklease
Rho	*ras-homologous protein*
RhoGEF	Rho-Guaninnukleotid-Austauschfaktor
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	*rounds per minute*
RT	Raumtemperatur
SDS	*sodium dodecyl sulfate* (Natriumlaurylsulfat)
SOC	*super optimal broth*
SRE	*serum response element*
SRF	*serum response factor*
Strep-*tag*	Strep-*tag* II®; WSHPQFEK
T	Temperatur
T	Thymidin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Essigsäure-EDTA
Tat	*transactivator of transkription*
TCF	*tertiary complex factor*
TEMED	Tetramethylethylendiamin
THP-1	*human acute monocytic leukemia cells* (Zelllinie)
T_m	*annealing-temperature*
TNFα	Tumornekrosefaktor α
TPD52-54	Tumor Protein D52-54
Tris	Tris (hydroxymethyl)-aminomethan
U	*unit*
ÜN	über Nacht

UV	ultraviolett
VP22	Transkriptionsfaktor kodiert vom humanen Herpes simplex 1 Virus
XbaI	Restriktionsendonuklease
XhoI	Restriktionsendonuklease

1. Einleitung

Eine enorme Anzahl an klinischen und experimentellen Studien haben genetische Faktoren und Faktoren der Umwelt aufgedeckt, welche das Risiko einer Herz-Kreislauferkrankung beeinflussen. Eine bedeutende Rolle bei den meisten dieser Erkrankungen spielt die chronische Entzündung, mit einer damit einhergehenden fibrotischen Umgestaltung der arteriellen Gefäßwände – auch Atherosklerose genannt (Libby, 2002; Naghavi *et al*., 2003; Libby u. Ridker, 2004; Schober *et al*., 2005; Apostolakis *et al*., 2010; Speyer u. Ward, 2011). Die Pathogenese der Atherosklerose ist bis zum heutigen Zeitpunkt immer noch nicht vollständig aufgeklärt. Reize wie Hypoxie und immunologische oder mechanische Verletzungen der Gefäßwände führen scheinbar zu strukturellen Veränderungen, die Modifikationen in Gefäßdurchmesser und Lumenweite herbeiführen können (Ward *et al*., 2000; Savoia u. Schiffrin, 2006; Stenmark *et al*., 2006; Schober u. Zernecke, 2007). Jede Schicht der Arterienwand kann von diesem Umbau betroffen sein. Die Adventitia kann fibrosieren, die Media hyper- oder hypotrophieren und die Intima hyperplasieren (Schober u. Zernecke, 2007). So kann solch ein Umbau beispielsweise auch den Durchmesser des Lumens vergrößern (*outlaw remodeling*) und damit eine mögliche chronische Hypoxie nachgeschalteten Gewebes kompensieren (Ward *et al*., 2000; Schoenhagen *et al*., 2001). Die für den Menschen eher problematischere Einengung des Gefäßlumens (*inward remodeling*) kann sich – auf Grund der chronischen Hypoxie des vom Gefäß versorgten Gewebes – in einer koronaren Herzerkrankung, pulmonalen Hypertension, einer Restenose nach Stentimplantation und vielen anderen Spätfolgen manifestieren (Schwartz *et al*., 1998; Ward *et al*., 2000). Hierbei spielen oft Intima- und Media-Verdickungen eine entscheidende Rolle, wobei oftmals eine Beteiligung verschiedener Entzündungszellen und glatter Muskelzellen nachgewiesen wurde (Ward *et al*., 2000; Schober *et al*., 2005; Stenmark *et al*., 2005). Neben den mechanischen Reizungen wird auch oxidativer Stress als atherogener Faktor beschrieben. Hierbei führt eine lokale Ansammlung von oxidiertem LDL (oxLDL) in den großen Arterien ebenfalls zu einer Infiltration von Monozyten in die Gefäßwand. Nach der Einwanderung können sich die Monozyten in lipidbeladene Schaumzellen umwandeln und proinflammatorische Zytokine, chemotaktische Botenstoffe und Enzyme, welche extrazelluläre Matrixproteine degradieren können, sezernieren. Diese anfänglichen Läsionen werden makroskopisch als weißgelbliche Fettstreifen, sogenannte *fatty streaks*, sichtbar und stellen die Grundlage für die Ausbildung atherosklerotischer Plaques dar. Die durch verschiedene Chemotaxine, insbesondere durch Chemokine wie

monocytic chemoattractant-protein-1 (MCP-1) gesteuerte, fortlaufende Infiltration von Monozyten aber auch von T-Lymphozyten, natürlichen Killerzellen, dendritischen Zellen, Mastzellen und glatten Muskelzellen in das subendotheliale Kompartiment bedingt die chronische immer weiter fortschreitende Umgestaltung der Gefäßwände – die sogennnte Atherosklerose (Libby 2002; Apostolakis *et al*., 2010). Die damit verbundene Einengung des Gefäßlumens, d.h die Bildung von Plaques, vermindert eine ausreichende Durchblutung nachgeschalteten Gewebes. Letztendlich kann es zu Erosionen und Rupturen dieser Plaques kommen – die pathophysiologischen Hintergründe für akute ischämische Ereignisse.

1.1 Chemokine und ihre Rezeptoren

1.1.1 Chemokine

Als wichtiger Bestandteil der Singalübertragung zwischen den bei der Atherosklerose beteiligten Zellen wurden die chemotaktischen Zytokine – die Chemokine – und ihre dazugehörigen Rezeptoren ausgemacht. Das Wort Chemokin wurde 1993 beim dritten internationalen Symposium chemotaktischer Zytokine in Baden neugeschöpft (Taub u. Oppenheim, 1993). Chemokine wurden als zentrale Regulatoren von Leukozytenfunktionen beschrieben. So steuern sie die Leukozytenadhäsion an die Gefäßwand und die transendotheliale Migration in das subendotheliale Kompartiment, sind aber auch für die Regulation der Hämatopoese von Bedeutung (Rollins, 1996; Manzo *et al*., 2003; Charo u. Taubman, 2004; Moser *et al*., 2004). Chemokine sind 8-12 kDa kleine, heparinbindende, vorwiegend sekretierte Proteine, die die Einwanderung von zirkulierenden Leukozyten in verletztes oder entzündetes Gewebe steuern (Gerard u. Rollins, 2001; Rot u. von Andrian, 2004; Barlic u. Murphy 2007; Deshmane *et al*., 2009; Apostolakis *et al*., 2010). Auch für die Regulation der Funktionen von nicht-hämatopoetischen Zellen wie Endothelzellen, glatten Muskelzellen und Astrozyten sind Chemokine von Bedeutung. Sie sind an der Regulation der Embryogenese, Neurogenese, Angiogenese und sogleich an der Tumorzellinfiltration und Metastasierung beteiligt (Coussens u. Werb, 2002; Bernardini *et al*., 2003; Lazarini *et al*., 2003; Müller *et al*., 2003). Außerdem können einige Chemokine das Eindringen vom humanen Immundefizienz-Virus (HIV) in ihre Zielzellen blockieren (Lusso, 2000; Baggiolini, 2001; Lusso, 2002). Das erste Chemokin – der Plättchenfaktor Vier, welcher prokoagulatorisch wirkt – konnte bereits 1977 isoliert werden (Walz *et al*., 1977). Bis zum jetzigen Zeitpunkt wurden über 50 verschiedene Chemokine identifiziert, die auf Grund ihrer Struktur in vier

Gruppen eingeteilt werden können. Basierend auf der Anzahl und Anordnung von konservierten Cysteinen im aminoterminalen Abschnitt des Moleküls, zwischen denen Disulfidbrücken ausgebildet werden können, werden sie in C-, CC-, CXC- und CX_3C-Chemokine eingeteilt (Baggiolini 2001; Mackay 2001; Charo u. Taubman, 2004; Barlic *et al*., 2007). Die Mitglieder der CXC-, CC- und CX_3C-Chemokine besitzen vier konservierte Cysteine, wohingegen C-Chemokine nur über zwei Cysteine verfügen, welche dem zweiten und vierten Cystein der anderen Gruppen entsprechen (Murphy *et al*., 2000). Bei den Chemokinen der CXC- und CX_3C-Subfamilien sind diese amino-terminal gelegenen ersten beiden Cysteine durch eine (CXC) bzw. drei (CX_3C) Aminosäuren getrennt. Die meisten bekannten Chemokine sind Mitglieder der CC- oder der CXC-Subfamilie. Die Gruppe der CX_3C-Chemokine umfasst nur das Fractalkine (Bazan *et al*., 1997) und die der C-Chemokine nur das Lymphotactin α und β (Kelner *et al*., 1994). Eine CXC-Chemokin-ähnliche cDNA wurde auch in der Spezies Neunauge identifiziert. Dieser Fund lässt vermuten, dass der Ursprung der Chemokine und vielleicht auch deren Unterteilung in Subfamilien phylogenetisch weit zurück reicht (Najakshin *et al*., 1999). Im Gegensatz zu den meisten anderen Chemokinen die sezerniert werden, setzt sich das Fractalkine aus einer Chemokindomäne, einer in der Plasmamebran verankerten transmembranären Domäne und einer zytoplasmatische Domäne zusammen. Mit seiner Struktur einhergehend fungiert es als direktes Adhäsionsmolekül bei der Bindung an den Rezeptor CX_3CR1 (Imai *et al*., 1997). Fractalkine vermag so sowohl in Membran-verankerter als auch löslicher Form die Migration von Leukozyten zu steuern. Mit Ausnahme von CXCL16 besitzt keines der anderen Chemokine eine transmembranäre Domäne. Jedoch sind sie in der Lage, nach ihrer Sekretion an Glykosaminoglykane der Plasmamembran von z.B. Endothelzellen zu binden. Diese Fähigkeit sorgt für eine mögliche Akkumulation von chemotaktischen Stoffen an eben dieser Plasmamembran. Ein an der Endothelzell-Plasmamembran erzeugter Gradient an gebundenen Chemokinen kann von zirkulierenden Leukozyten perzepiert werden und in diesen Zellen zur Aktivierung von β_2-Integrinen führen. Die Zellen können so an das Endothel binden und ins Gewebe transmigrieren (Tanaka *et al*., 1993). Es wird vermutet, dass Chemokine primär als Monomere agieren, jedoch dimerisieren oder multimerisieren sie scheinbar sobald sie in höherer Konzentration vorliegen (Baggiolini *et al*., 1997). Funktionelle Analysen haben gezeigt, dass Dimerisierung und Hereromerisierung von Chemokinen regulatorische Effekte hervorrufen und es liegen zahlreiche Hinweise darauf vor, dass auch Chemokinrezeptoren die Fähigkeit besitzen zu di- und oligomerisieren (von Hundelshausen *et al*., 2005; Thelen *et al*., 2010).

Für das Chemokin CCL2 wurde sowohl eine Homodimerisierung als auch eine Homooligomerisierung ermittelt (Proudfoot *et al*., 2003; Crown *et al*., 2006; Proudfoot, 2006). Darüber hinaus wurde für CCL2 eine starke Neigung zur Heterodimerisierung mit CCL8 beschrieben (Crown *et al*., 2006). Neben der Einteilung der Chemokine auf Grund von strukturellen Merkmalen beruht eine zweite verbreitete Einteilung auf den von Chemokinen regulierten Funktionen. So gibt es eine Gruppe von Chemokinen, die maßgeblich an der Kontrolle inflammatorischer Prozesse beteiligt sind; eine zweite Gruppe umfasst Chemokine, die eher Einfluss auf die Homöostase des Immunsystems haben und zur dritten Gruppe zählen Chemokine, denen eine Rolle in beiden Bereichen zukommt. Entsprechend dieser Einteilung werden inflammatorisch-induzierbare von hömeostatisch-konstitutiven Chemokinen und von Chemokinen mit überlappender Funktion unterschieden (Murphy *et al*., 2000). Die Expression und Sekretion inflammatorisch-induzierbarer Chemokine wird über proinflammatorische Mediatoren, wie Lysophosphatidsäure (LPS), Interleukin-1 (IL-1) und Tumornekrosefaktor α (TNFα) reguliert. Diese Chemokine sind an der Organisation des angeborenen und erworbenen Immunsystems beteiligt. Die sog. homöostatischen Chemokine werden konstitutiv in lymphoiden Zellen und Geweben exprimiert und spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation der durch dendritische Zellen und Lymphozyten kontrollierten Immunantwort (Baggiolini 2001; Cyster 1999a; Cyster 1999b). Bemerkenswert ist, dass Gene, die für inflammatorische Chemokine kodieren, als Cluster auf den Chromosomen 4 (CXC-Chemokine) und 17 (CC-Chemokine) anzutreffen sind, während die Genloci der homöostatischen Chemokine verteilt auf verschiedene Chromosomen – darunter Chromosom 1, 2, 5, 7, 9, 10 und 16 – vorliegen (Murphy *et al*., 2000).

1.1.2 Chemokinrezeptoren - Sieben transmembranäre G-Protein-gekoppelte Rezeptoren

Alle bisher bekannten Chemokine agieren über die Aktivierung zelloberflächenständiger sieben-transmembranärer (7TM) G-Protein-gekoppelter Rezeptoren (GPCR) der Rhodopsinfamilie (Murphy *et al*., 2000; Cambien *et al*., 2001). Die Familie der GPCRs umfasst die größte Anzahl von Zelloberflächenmolekülen und ist damit eine der größten Proteinfamilien überhaupt. In Vertebraten kodieren 1-4 % des Genoms für GPCRs (Bockaert u. Pin, 1999) und im Genom des Menschen wurden bislang mehr als 800 verschiedene, GPCR-kodierende DNA-Sequenzabschnitte nachgewiesen (Fredriksson *et al.*, 2003, Milligan *et al*., 2006). Zu den spezifischen Liganden dieser Rezeptorklasse zählen Pheromone, Geruchs- oder Geschmacksstoffe, Nukleotide, Lipide, Peptide, Ionen und auch Photonen. Die cDNAs aller bereits bekannten GPCRs kodieren für Proteine, die

aus etwa 350-500 Aminosäuren bestehen und die alle eine einheitliche Tertiärstruktur aufweisen (Baldwin, 1994; Strader *et al.*, 1994; Strader *et al*., 1995). So setzen sich die GPCRs aus einem extrazellulären amino-terminalen und einem intrazellulären carboxyl-terminalen Segment, sowie sieben nahezu kreisförmig angeordneten α-helikalen Transmembrandomänen (25-30 Aminosäuren) zusammen, die über drei intrazelluläre und drei extrazelluläre Schleifen miteinander verbunden sind (Strader *et al.*, 1994). Auf Grund von primären und sekundären Sequenz- und Strukturmerkmalen lassen sich GPCRs in verschiedene Subfamilien unterteilen. So wurde von Fredriksson *et al.* (2003) eine Einteilung in fünf Subfamilien vorgenommen. Die erste Subfamilie enthält Rhodopsin und Rhodopsin-ähnliche Rezeptoren, zur zweiten Subfamilie gehören Sekretinrezeptoren, die dritte Subfamilie umfasst Glutamatrezeptoren, die vierte Subfamilie wird von Adhäsionsrezeptoren gebildet und zur fünften Subfamilie zählen die *frizzeled* and *taste2* Rezeptoren. Die größte Gruppe der GPCRs mit bislang 284 gelisteten Mitgliedern bildet die erste Subfamilie, mit Rhodopsin als Prototyp (IUPHAR-DB: Sharman et al., 2011). Zu dieser Subfamilie gehören auch die Chemokinrezeptoren. Zu den für Chemokinrezeptoren typischen Merkmalen zählen Längen von 340-370 Aminosäuren, ein saures amino-terminales Segment, eine zumindest der Aminosäurenabfolge DRYLAIVHA-ähnliche Sequenz in der zweiten intrazellulären Schleife, eine kurze basische dritte intrazelluläre Schleife und ein Cystein in jeder der vier extrazellulären Domänen (Murphy *et al*., 2000). Im Jahre 2000 gelang es der Gruppe um Palczewski als erste, eine Kristallstruktur des Rhodopsin zu ermitteln (Palczewski *et al*., 2000). Die Analysen der Struktur des Rhodopsins bestätigten die Lage und Anordnung der sieben transmembranären Domänen. Darüber hinaus konnte die Existenz einer bisher nur postulierten achten Helix (8th Helix), die sich intrazellulär im carboxyl-terminalen Abschnitt des Rezeptors ausbildet und parallel zur Plasmamembran zum liegen kommt, bestätigt werden (Baldwin, 1993; Unger *et al*., 1997; Lomize *et al*., 1999; Palczewski *et al*., 2000). In der Zwischenzeit wurden weitere Kristallstrukturen von GPCRs der Rhodopsin-Familie, darunter von α- und β-Adreozeptoren, von dem Adenosinrezeptor A2 und dem D3-Dopaminrezeptor beschrieben (Cherezov *et al*., 2007; Rasmussen *et al*., 2007; Jaakola *et al*., 2008; Warne *et al*., 2008; Chien *et al*., 2010). Erst Ende 2010 wurde die erste Kristallstruktur eines Chemokinrezeptors, die des CXCR4 Rezeptors, veröffentlicht (Wu *et al*., 2010). Die an diesen Strukturen gewonnenen Erkenntnisse stimmen im Wesentlichen mit denen an der Rhodopsinstruktur ermittelten überein.

Interessanterweise konnte für GPCRs, darunter auch zahlreiche Chemokinrezeptoren wie CCR2, CCR5 und CXCR4 gezeigt werden, dass sie Homodimere ausbilden (Benkirane *et al*., 1997; Lapham *et al*., 1999; Rodríguez-Frade *et al*., 1999). Darüber hinaus liegen Hinweise auf die Heterodimerisierung von Chemokinrezeptoren mit anderen GPCRs der Rhodopsin-Familie, darunter auch Opioidrezeptoren, vor (Springael *et al*., 2005; Hébert, 2008; Sohy *et al*., 2009; Kramp *et al*., 2010). Welche Bedeutung der Homo- und/oder Heterodimerisierung für die Signalübertragung durch Chemokinrezeptoren zukommt, ist zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht vollständig verstanden und steht daher im Zentrum zahlreicher Forschungsbemühungen.

Indem Chemokinrezeptoren die von Chemokinen regulierten Signale ins Zellinnere weiterleiten, sind sie maßgeblich an der Regulation des angeborenen und des erworbenen Immunsystems beteiligt. Mit dem Ziel eine uniforme Bezeichnung für Chemokinrezeptoren zu schaffen, entwickelte das *Nomenclature Committee der International Union of Pharmacology* (NC-IUPHAR) eine einheitliche Nomenklatur. Bisher wurden für den Menschen 19 Chemokinrezeptoren beschrieben. Entsprechend ihrer Interaktion mit den Chemokinen werden die Rezeptoren in die CC- , CXC- , CX_3C- und C-Chemokinrezeptoren eingeteilt. Die Familie der CXC-Rezeptoren besteht aus 6 Mitgliedern (CXCR1-6), die der CC-Rezeptoren aus elf Vertretern (CCR1-11) und sowohl die Familie der CX_3C- Rezeptoren als auch die der C-Rezeptoren umfasst mit CX_3CR1 und XCR1 nur einen Vertreter (Olson und Ley, 2002). Pharmakologisch relevante Spleißvarianten werden mit kleinen Buchstaben in alphabetisch aufsteigender Reihenfolge bezeichnet. So wurden im Gegensatz zur Maus im Menschen mit CCR2a und CCR2b zwei Varianten des CCR2 Rezeptors identifiziert, die sich nur in ihren carboxyl-terminalen Abschnitten unterscheiden (Murphy *et al*., 2000). Neben den genannten Chemokinrezeptoren wurden interessanterweise weitere Chemokin-bindende membranäre Moleküle, wie D6 und Duffy beschrieben, die in ihrer Struktur Chemokinrezeptoren ähneln. Da für diese Proteine, nach Bindung von Chemokinen, bisher keine Übertragung von Signalen ins Zellinnere ermittelt wurde, sind sie *per Definitionem* keine Chemokinrezeptoren (Horuk, 1994; Nibbs *et al*., 1997). Da D6 und Duffy aber Chemokine binden, können sie auf diese Weise zumindest die Chemokin-Homöostase beeinflussen (Balkwill, 2004; Graham, 2009; Rot 2010).

Obgleich der Ähnlichkeiten der einzelnen Rezeptoren untereinander, besitzt jeder einzelne Chemokinrezeptor eine ganz spezifische Funktion und eigene Gewebeexpression. Die

strukturell sehr unterschiedlichen Chemokin-Liganden weisen interessanterweise häufig zu mehreren Chemokinrezeptoren eine Affinität auf (Murphy *et al*., 2000; Balkwill 2004: siehe Abb. 1; Wells *et al*., 2006). Jedoch scheinen die einzelnen Chemokine nur mit Vertretern der entsprechenden Chemokinrezptorsubfamilie zu interagieren, d.h. CC-Chemokinrezeptoren binden nur CC-Chemokine und CXC-Chemokinrezptoren nur CXC-Chemokine (Murphy *et al*., 2000; Balkwill 2004). Eine Ausnahme stellt das Duffy Protein dar, das sowohl CCL2 und CCL5, als auch CXCL1 und CXCL8 bindet (Kashiwazaki, 2003; Balkwill, 2004, Wells *et al*., 2006). Jedoch gibt es auch Chemokinrezeptoren, die sehr spezifisch nur mit einem oder wenigen Liganden interagieren. Zu diesen Rezeptoren zählen insbesondere Vertreter, die Funktionen der Gruppe der homöostatischen Chemokine vermitteln, wie CXCR4 und CXCR5 (Balkwill, 2004, Wells *et al.*, 2006).

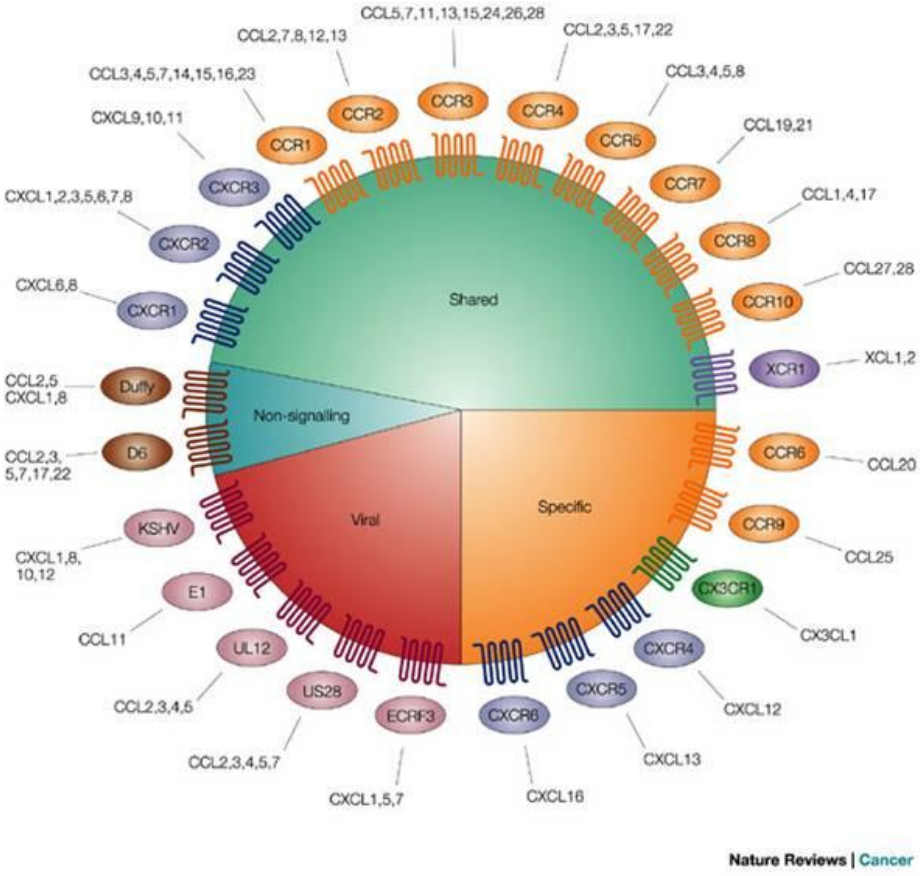


Abb. 1: Chemokine und Chemokinrezeptoren (Balkwill, 2004).

Nach Aktivierung durch ihre Liganden interagieren die meisten Chemokinrezeptoren, darunter auch die CC-Chemokinrezeptoren CCR2a und CCR2b, mit Pertussistoxin-sensitiven heterotrimeren G-Proteinen und regulieren auf diese Weise zahlreiche Effektoren wie Adenylylzyklasen, Phosphoinosit-3-Kinasen, Phospholipase Cβ-Isoenzyme

und *mitogen-activated protein kinases* (MAPKs) (Thelen, 2001; Thelen u. Stein, 2008). Auch über die Kopplung von Chemokinrezeptoren mit Pertussistoxin-insensitiven heterotrimeren G-Proteinen, darunter Mitglieder der $G\alpha_{12/13}$ und der $G\alpha_q$-Subfamilie, liegen Hinweise vor (Molon *et al*., 2005; Shi *et al*., 2007; Wong *et al*., 2007; Thelen u. Stein, 2008). Auf diese Weise können auch kleine GTPasen, wie RhoA und Rac aktiviert werden, die maßgeblich an der Organisation des Aktinzytoskeletts und der Regulation der Gentranskription beteiligt sind (Terashima *et al*., 2005).

1.2 MCP-1/CCL2 und seine Rezeptoren CCR2a und CCR2b

Die CC-Chemokinsubfamilie stellt mit mindestens 28 bekannten Mitgliedern die größte Fraktion der bisher bekannten Chemokine dar (Balkwill, 2004; Wells *et al*., 2006). Die beiden ersten der vier konservierten Cysteine, welche charakteristisch für die Chemokine-Struktur sind, befinden sich bei den Vertretern der CC-Chemokine direkt nebeneinander (Murphy *et al*., 2000). Für die CC-Chemokine wurde gezeigt, dass sie insbesondere als chemotaktische Moleküle für Monozyten wirken und dementsprechend lassen sie sich in chronisch entzündetem Gewebe mit Monozyteninfiltrat nachweisen (Braunersreuther *et al.*, 2007). Das am Besten untersuchteste Chemokin der CC-Chemokine ist das *monocytic chemoattractant-protein-1* (MCP-1), das nach der neuen Nomenklatur auch als CCL2 bekannt ist (van Coillie *et al*., 1999; Murphy *et al*., 2000; Schober *et al*., 2004; Deshmane *et al*., 2009). Bei MCP-1/CCL2 handelt es sich um das erste Chemokin, welches mit dem Krankheitsbild Atherosklerose in Verbindung gebracht werden konnte (Nelken *et al*., 1991; Rollins, 1996; Barlic *et al*., 2007). MCP-1/CCL2 wird von den meisten Atherosklerose-relevanten Zellen wie Monozyten, Makrophagen, Gefäßendothelzellen und glatten Gefäßmuskelzellen synthetisiert und sezerniert und fungiert als chemotaktischer Lockstoff für Monozyten, T-Gedächtniszellen und basophile Granulozyten (Charo u. Taubman, 2004; Yadav *et al*., 2010). Diesem Chemokin wird eine Schlüsselrolle u. a. bei der Rekrutierung von Monozyten aus dem Gefäß in frühe atherosklerotische Läsionen, der Entwicklung von Intimahyperplasie nach Angioplastie und in der Regulation der Angiogenese zugeschrieben (Charo u. Taubman, 2004; Gautier *et al*., 2009). Nach einer mechanischen Verletzung der Gefäßwand kommt es zur Heraufregulierung der MCP-1/CCL2-mRNA-Expression innerhalb von vier Stunden und es wird ein Anstieg der MCP-1/CCL2-Proteinkonzentration in der Arterienwand und im Blutkreislauf beobachtet (Taubman *et al*., 1992; Furukawa *et al*., 1999; Schober *et al*., 2004). Werden proinflammathorische Moleküle wie Adhäsionsmoleküle, Zytokine, Chemokine und

Wachstumsfaktoren durch Zellen der Gefäßwand, beispielsweise auf Grund einer Störung der Endothelzellfunktion, freigesetzt, kommt es zur Rekrutierung von Monozyten und T-Lymphozyten in die Gefäßwand (Charo u. Taubman, 2004). Der Kreislauf – bestehend aus der Freisetzung von MCP-1/CCL2 und eine dadurch kontinuierliche Aktivierung von Monozyten und T-Lymphozyten, welche erneut MCP-1/CCL2 sekretieren – führt zu einer chronischen Entzündung der Gefäßwand, welche atherogene Gefäßveränderungen hervorruft. Dieses Phänomen konnte in der frühen Phase der Atherogenese und bei der Restenosierung nach Angioplastie beobachtet werden (Charo u. Ransohoff, 2006; Schober u. Zernecke, 2007). Schon seit einiger Zeit werden oxidierte Lipide als Entstehungsfaktor für atherogene Veränderungen betrachtet. Es wurde berichtet, dass schon minimal oxidiertes *low-densitiy* Lipoprotein eine Produktion von MCP-1/CCL2 in Gefäßwandzellen, Endothelzellen und glatten Muskelzellen induziert (Cushing *et al*., 1990). Dies könnte die molekulare Verbindung zwischen oxidierten Lipoproteinen und der Schaumzellrekrutierung in der Gefäßwand darstellen. Das Chemokin MCP-1/CCL2 steuert aber auch die gerichtete Migration von Gefäßendothelzellen bei Wundheilungsprozessen nach Gefäßwandverletzungen (Weber *et al*., 1999) und hat Einfluss auf die Angiogenese und Arteriogenese und somit auf das Aussprießen von neuen Kapillargefäßen und auf das vaskuläre *remodeling* von kollateralen Gefäßen (Buschmann *et al*., 2003). Versuche an Tiermodellen konnten zeigen, dass die Expression eines MCP-1/CCL2-Antagonisten eine Reduktion atherosklerotischer Läsionenen und eine signifikante Hemmung des vaskulären *remodelings* nach koronarer Intervention zur Folge hat (Ni *et al*., 2001; Usui *et al*., 2002; Schepers *et al*., 2006). Aber auch für andere mit einem entzündlichen Filtrat assoziierte Erkrankungen, darunter neurodegenerative und Tumorerkrankungen, sowie chronisch entzündliche Darmerkrankungen, sind MCP-1/CCL2, CCR2a und CCR2b von Bedeutung (Connor *et al*., 2004; El Khoury *et al*., 2007; Mizutani *et al*., 2009; Conductier *et al*., 2010; Zhang *et al*., 2010b).

Die Signale des Chemokins MCP-1/CCL2 werden im Menschen von den CC-Chemokinrezptoren CCR2a und CCR2b in die Zelle übertragen (Charo *et al*., 1994; Wong *et al*., 1997; Sanders *et al*., 2000). Bei diesen CC-Chemokinrezeptoren handelt es sich um zwei Isoformen, die durch einen alternativen Spleißvorgang aus einer gemeinsamen hRNA hervorgehen. Beide Isoformen sind bis zu der Aminosäure 313 identisch und unterscheiden sich nur in der Länge und Aminosäuresequenz der carboxylterminalen intrazellulären Abschnitte – die Aminosäuresequenz von CCR2a umfasst 374 und die von CCR2b 360 Aminosäuren (Charo *et al*., 1994; Wong *et al*., 1997). RNAs der beiden Rezeptoren

wurden in Monozyten, dendritischen Zellen, natürlichen Killerzellen, T-Lymphozyten, glatten Gefäßmuskelzellen und Gefäßendothelzellen nachgewiesen (Murphy *et al*., 2000; Spinetti *et al*., 2004; Gálvez *et al*., 2005; Navratilova, 2006; Deshmane *et al*., 2009). Jedoch unterscheiden sich die beiden Rezeptorproteine hinsichtlich ihrer Präsenz auf der Zelloberfläche. So lassen sich zum Beispiel auf monozytären Zellen wesentlich mehr CCR2b- als CCR2a-Rezeptorproteine nachweisen (Wong *et al*., 1997; Tanaka *et al*., 2002) und CCR2b wird für die Regulierung der zellulären Funktionen dieser Zellen als der wichtigere Rezeptor vermutet (Proudfoot *et al*., 2000; Proudfoot, 2002). Jedoch konnte für beide Rezeptoren an transient- oder stabil-transfizierten Zellen nach Stimmulation mit MCP-1/CCL2 eine Inhibition von Adenylylzyklasen und Induktion der Chemotaxis der entsprechenden Zellen nachgewiesen werden (Myers *et al*., 1995). Dabei wurden für beide Rezeptoren sowohl Interaktionen mit Pertussistoxin-sensitiven, als auch -insensitiven heterotrimeren G-Proteinen beschrieben (Charo *et al*., 1994; Kuang *et al*., 1996; Wong *et al*., 1997; Sanders *et al*., 2000, Shi *et al*., 2007, Tian *et al*., 2008). Die Untersuchungen der Arbeitsgruppe haben gezeigt, dass es sowohl bei Expression von CCR2a, als auch CCR2b in COS-7-Zellen zu einer Liganden-stimulierten Aktivierung des Transkriptionsfaktors *serum response factor* (SRF) kommt. Diese Aktivierung wird durch Koexpression der Pertussistoxin-insensitiven G-Proteine G_q und G_{14} verstärkt (Dissertation: Julia Schuhholz, 2010). Interessanterweise finden sich Bindungsstellen für SRF, sog. *serum response elements*, in Promotoren einer Vielzahl von Genen, die unter anderem für Proteine kodieren, die an der Organisation des Aktinzytoskeletts von Bedeutung oder auch an der Steuerung der myogenen Differenzierung von zum Beispiel Gefäßmuskelzellen und Kardiomyozyten beteiligt sind (Miano *et al*., 2007; Li *et al*., 2009). Neben MCP-1/CCL2 binden die CCR2-Rezeptoren auch die ebenfalls inflammatorisch wirkenden CC Chemokine MCP-2, MCP-3 und MCP-4 (Charo *et al*., 1994; Ben-Baruch *et al*., 1995; Gong *et al*., 1997; Wain *et al*., 2002).

In der Maus findet sich im Gegensatz zum Menschen nur ein CCR2-Rezeptor, der in seiner Aminosäuresequenz des carboxyl-terminalen Abschnitts der des humanen CCR2b-Rezeptors ähnelt. Zu den aktivierenden Liganden des murinen CCR2-Rezeptors gehören JE und FIC, die sehr wahrscheinlich die murinen Orthologe von MCP-1 und MCP-3 darstellen (Boring *et al*., 1996; Kurihara u. Bravo, 1996). Apolipoprotein-E-defiziente (ApoE-/-) Mäuse neigen unter cholesterinreicher *Western high fat*-Diät zu schwersten Ausprägungen von Atherosklerose. Eine zusätzliche CCR2-Defizienz führt in diesem experimentell etablierten Atherosklerosemodell zu einer 50 %igen Reduktion der Größe

atherosklerotischer Plaques gegenüber normalen ApoE-/-defizienten Mäusen (Boring *et al*., 1998). Auch Experimente mit MCP-1/CCL-2-defizienten, CCR2-defizienten oder aber auch MCP-1-überexprimierenden Mäusen unterstützen die Hypothese, dass MCP-1/CCL2 über Bindung an CCR2-Rezeptoren die Rekrutierung von Monozyten in atheromatöse Plaques steuert (Charo u. Taubman, 2004). So führte in knochenmarkstransplantierten Mäusen die Überexpression von MCP-1/CCL2 in Makrophagen der Gefäßwand zu einer lokalen Infiltration von Monozyten bzw. Makrophagen, Zunahme der Schaumzellen und verstärkten Atherosklerose (Grewal *et al*., 1997; Aiello *et al*., 1999).

1.3 Die Tumorproteinfamilie D52

Die Tumorprotein D52-Familie besteht aus kleinen Proteinen, für deren Mitglieder verschiedene Funktionen beschrieben wurden und die als Adapterproteine Schlüsselfunktionen in verschiedenen physiologischen Funktionen von Zellen zu übernehmen scheinen (Boutros *et al*., 2004). Das erste Mitglied der D52-Familie, ein kleines 28 kDa schweres Protein, wurde wegen seiner mRNA-Überexpression in humanen Mamma- und Basalzellkarzinomzellen entdeckt und aus diesem Grund Tumorprotein D52 genannt (Byrne *et al*., 1995). Als strukturell verwandte Proteine wurden TPD53 und TPD54 als weitere Mitglieder dieser Proteinfamilie identifiziert (Byrne *et al*., 1998). Hinzu kommt, dass sowohl vom humanen TPD52 als auch den anderen Familienmitgliedern Isoformen identifiziert wurden (Proux *et al*., 1996; Nourse *et al*., 1998). Phylogenetische Analysen lassen vermuten, dass TPD52, TPD53 und TPD54 von einer gemeinsamen D52-ähnlichen Sequenz abstammen (Boutros *et al*., 2004). Interessanterweise lassen sich Gene, die für TPD52-ähnliche Proteine kodieren, auch in primitiven Organismen nachweisen (Byrne *et al*., 1996; Boutros *et al*., 2004). Das für humanes TPD52-kodierende Gen und damit das erste Gen der Proteinfamilie D52, wurde vor ungefähr 25 Jahren auf dem Chromosom 8q21 entdeckt (Byrne *et al*., 1995). Die D52-Proteine der Säugetiere sind kleine hydrophile Polypeptide mit einer Länge von 180 – 200 Aminosäuren, die eine aus 50 Aminosäuren bestehende *coiled-coil*-Domäne aufweisen (Byrne *et al*., 1996; Nourse *et al*., 1998). Dieser Domäne wird eine wichtige Funktion bei der Interaktion mit homologen oder heterologen Molekülen zugeschrieben (Proux *et al*., 1996; Chen *et al*., 1997; Byrne *et al*., 1998; Sathasivam *et al*., 2001; Proux-Gillardeaux *et al*., 2003; McFarlane *et al*., 2009). Darüber hinaus weisen diese D52-Proteine eine amino-und carboxyl-terminal gelegene PEST-Sequenz (reich an Prolin-*P*, Glutaminsäure-*E*, Serin-*S* und Threonin-*T*) auf, die scheinbar für die Regulation der Proteinstabilität von Bedeutung ist (Byrne *et al*., 1996).

Die Funktionen von Mitgliedern der TPD52-Proteinfamilie sind nicht vollständig verstanden. Jedoch liegen Hinweise vor, dass Mitglieder dieser Proteinfamilie an der Steuerung der Regulation des Vesikeltransports der Zelle und der exozytotischen Sekretion beteiligt sind (Thomas *et al*., 2002; Boutros *et al*., 2003; Wilson *et al*., 2003; Tiacci *et al*., 2005). Dabei interagieren sie z.B. mit Proteinen wie Annexin VI, Syntaxin 1, MAL2 und 14-3-3-Proteinen (Thomas *et al*., 2002; Boutros *et al*., 2003; Proux-Gillardeaux *et al*., 2003; Wilson *et al*., 2003; Tiacci *et al*., 2005). Für TPD52 konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass der Einfluss des Proteins auf Sekretionsvorgänge und lysosomale Transportvorgänge durch eine Ca^{2+}/Calmodulin-abhängige Phosphorylierung reguliert wird (Kaspar *et al*., 2003; Chew *et al*., 2008; Thomas *et al*., 2010). Neuere Untersuchungen haben Hinweise darauf geliefert, dass die Phosphorylierung von TPD52 Einfluss auf das *trafficking* von Endomembranen in der Zytokinese hat (Thomas *et al*., 2010). Entsprechend wurde beobachtet, dass die Überexpression von TPD52 in einer Prostata-Karzinomzelllinie zu einer erhöhten Proliferation und interessanterweise erhöhten Migration der Zellen führt (Ummanni *et al*., 2008).

Eine Überexpression von TPD52 wurde in verschiedenen humanen Tumoren, darunter der Brust, der Lunge (Chen *et al*., 1996; Bhattacharjee *et al*., 2001; Garber *et al*., 2001), der Prostata (Ahram *et al*., 2002; Rhodes *et al*., 2002; Best *et al*., 2003; Rubin *et al*., 2004; Wang *et al*., 2004), des Ovars (Shridhar *et al*., 2001), des Endometriums (Risinger *et al*., 2003) und auch der Leber nachgewiesen (Byrne *et al*., 1995; Chen *et al*., 1996; Chen *et al*., 2002). Da in benignen Prostatatumoren eher eine geringe Expression von TPD52 und in hochgradigen intraepithelialen Neoplasien, Malignomen und deren Metastasen der Prostata eine relativ schnell ansteigende Expression zu beobachten ist, wird TPD52 auch als potentieller Tumormarker diskutiert (Rubin *et al*., 2004; Wang *et al*., 2004, Byrne *et al*., 2005, Shehata *et al*., 2008; Petrova *et al*., 2008; Byrne *et al*., 2010). Auch für TPD54 wurde eine vermehrte prognostisch signifikante Expression in Brustkrebs und Pankreaskrebs beschrieben (Miller *et al*., 2004; Nakamura *et al*., 2004). Eine Überexpression von TPD53 in Tumorzellen wurde dagegen selten beobachtet (Rhodes *et al*., 2004). Vertreter der TPD52-Familie konnten in verschiedenen subzellulären Kompartimenten nachgewiesen werden und sind scheinbar auch an Funktionen außerhalb des Zytoplasmas beteiligt (Boutros *et al*., 2004). So wurde TPD52-Protein in Zellkernen verschiedener Karzinomzellen nachgewiesen (Byrne *et al*., 2005). Überdies wird TPD52 in B-Zellen und Plasmazellen exprimiert (Tiacci *et al*., 2005). Hierbei ist auffällig, dass die Expression von TPD52 erst nach der Differenzierung der B-Zelle zur Plasmazelle ein

Maximum erreicht (Tiacci *et al.*, 2005). Im Gegensatz dazu wird die Expression vieler für die B-Zell-Differenzierung wichtiger B-Zell-Moleküle, z. B. von *paired box* 5 (PAX5), CD19, CD79a, CD20 und CD22, während der Reifung der B-Zelle zur Plasmazelle herunterreguliert (Tiacci *et al*., 2005). In der Thiel-Myelomzelllinie konnte gezeigt werden, dass TPD52 kalziumabhängig an Annexin VI binden kann, was vermuten lässt, dass es eine regulatorische Funktion im Bezug auf die Sekretionsprozesse von Plasmazellen besitzt (Thomas *et al*., 2002; Tiacci *et al*., 2005).

Ob, und wenn ja, welche Funktionen TPD52 durch die Beeinflussung der Signalübertragung der CCR2-Rezeptoren für entzündliche oder mit entzündlichen Infiltraten assoziierte Erkrankungen wie Atherosklerose und Tumorerkrankungen hat, ist bisher unklar. In vorausgegangenen Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe war in – mit oxidiertem LDL-behandelten – monozytären kultivierten THP-1 Zellen eine Abnahme der mRNA-Expression von TPD52 beobachtet worden (unveröffentliche Beobachtungen der Arbeitsgruppe). Interessanterweise wurde für FROUNT, einem spezifischen Nicht-G-Protein-Interaktionspartner von CCR2b, eine Korrelation mit der Zunahme der Expression von MCP-1/CCL-2 und CCR2 Rezeptoren bei Herzinsuffizienz beobachtet (Terashima *et al*., 2005; Satoh *et al.* 2007).

1.4 Ziele der Arbeit

In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe wurde TPD52 unter Anwendung des Hefe-*two hybrid*-Systems als neuer Nicht-G-Protein-Interaktionspartner der menschlichen Chemokinrezeptoren CCR2a und CCR2b identifiziert. Die mRNA von TPD52 wurde sowohl in primären als auch kultivierten humanen monozytären Zellen nachgewiesen. Interessanterweise wurde in weiteren Untersuchungen beobachtet, dass in kultivierten monozytären THP-1-Zellen die mRNA Expression von TPD52 nach Behandlung der Zellen (48 h) mit oxidiertem LDL abnimmt (unveröffentlichte Ergebnisse der Arbeitsgruppe). In Untersuchungen an kultivierten Säugetierzellen wie embryonalen Nierenzellen (HEK293) und Affennierenzellen (COS-7-Zellen) wurde bei Koexpression von TPD52 mit humanen CCR2a oder CCR2b Rezeptoren eine Inhibierung der von diesen Rezeptoren regulierten Rezeptorfunktionen beobachtet. Dabei wurde ein Zusammenhang zwischen der Präsenz von TPD52 und der Inhibierung der Kopplung der CCR2-Rezeptoren an heterotrimere G-Proteine, insbesondere an Gα-Untereinheiten der $G\alpha_q$-Familie wie $G\alpha_q$ und $G\alpha_{14}$ ermittelt (Dissertation: Julia Schuhholz, 2010). Ausgehend von

diesen Beobachtungen, stellte sich im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Frage, welchen Einfluss die erhöhte Präsenz von TPD52 auf die von CCR2-Rezeptoren-regulierten Funktionen in kultivierten monozytären Zellen haben könnte. Da kultivierte monozytäre Zellen wie THP-1 Zellen nur mit einer geringen Effizienz mit DNA-Konstrukten transfiziert werden können, sollte nun der Versuch unternommen werden, TPD52 als gereinigtes Protein durch Proteintransduktion in Säugetierzellen einzubringen. Dazu sollten TPD52-Fusionsproteine hergestellt werden, die eine chromatografische Reinigung des Proteins unter Zuhilfenahme eines Affinitäts-*tags* wie dem Strep-*tag* erlauben. Das Strep-TPD52-Protein sollte in Bakterien exprimiert und aus den bakteriellen Lysaten durch Affinitätschromatografie gereinigt werden. Das gereinigte Protein sollte im Anschluss zur Proteintransduktion verschiedener Säugetierzellen – darunter HEK293-, COS-7- und THP-1-Zellen – eingesetzt werden.

2. Material

2.1 Chemikalien

Acrylamidlösung 30 % 4K-Mix	AppliChem, Darmstadt
Adefo Entwickler/Fixierer RTU60	Adefo-Chemie GmbH, Dietzenbach
Agar Agar Serva *high gel-strength*	Serva Electrophoresis, Heidelberg
Agarose	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat (APS)	Serva Bioproducts, Heidelberg
Ampicillin, Natriumsalz	Sigma, Deisenhofen
Anhydrotetrazyklin	IBA GmbH, Göttingen
Avidin	IBA GmbH, Göttingen
Baktotrypton	Becton Dickinson, Heidelberg
Benzamidin	Sigma, Deisenhofen
β-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Serva Electrophoresis, Heidelberg
Chloramphenicol	Roth, Karlsruhe
Coomassie brilliant blue G250	Serva Electrophoresis, Heidelberg
D-Desthiobiotin	IBA GmbH, Göttingen
D(+)-Glucose, Monohydrat	Merck, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, Deisenhofen
Dithiothreitol (DTT)	Serva Electrophoresis, Heidelberg
dulbecco's modified eagle medium (DMEM)	GIBCO® Invitrogen Cell Culture, Karlsruhe
ECL™ *western blotting detection reagent*	Amersham Biosciences, Freiburg
EDTA, Dinatriumsalz-Dihydrat	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Genaxis Biotechnologie, Spechbach
Fötales Kälberserum (FCS)	GIBCO® Invitrogen Cell Culture, Karlsruhe
γ-Globulin, Lyophilisat	BioRad Laboratories GmbH, München
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Glycin	AppliChem, Darmstadt
2-(4-Hydroxyphenylazo) benzoesäure (HABA)	IBA GmbH, Göttingen
HEPES	PAA Laboratories GmbH, Cölbe

Immunglobulin G (IgG), Maus	Sigma, Deisenhofen
Kaliumchlorid	Roth, Karlsruhe
λ DNA/EcoRI + HindIII-Marker	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
L-Glutamin	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Lipofectamine™ 2000 Reagent	Invitrogen, Karlsruhe
Leupeptin	Serva Electrophoresis, Heidelberg
Strep-Merlin	Eigene Arbeitsgruppe
Natriumchlorid	AppliChem, Darmstadt
Natriumlaurylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
Natriumpyruvat	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
N,N-Dimethylformamid	Merck, Darmstadt
Opti MEM® I	GIBCO®Invitrogen Cell Culture, Karlsruhe
Passiv Lysis Puffer (5x)	Promega, Madison, USA
Penicillin/Streptomycin (100x)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Pepstatin A	Serva Electrophoresis, Heidelberg
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma, Deisenhofen
Polyethylenglykol (PEG) 6000	Serva Electrophoresis, Heidelberg
Ponceau S-Konzentrat	Sigma, Deisenhofen
Pyronin Y	Sigma, Deisenhofen
Rinderserumalbumin, Fraktion V; pH 7,0 (BSA)	Serva Electrophoresis, Heidelberg
RPMI 1640 Medium	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Salzsäure 37 %	VWR International, Fontenay sous Bois, Frankreich
skim milk powder (Magermilchpulver)	Fluka, Neu-Ulm
Sojabohnen-Trypsininhibitor	Fluka, Neu-Ulm
Strep-Tactin®-MacroPrep	IBA GmbH, Göttingen
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	AppliChem, Darmstadt
Thimerosal	Sigma, Deisenhofen
Trasylol® 1,0 (Aprotininlösung)	Bayer Vital, Leverkusen

Tris (Tris (hydroxymethyl)-aminomethan)	USB Corporation, Cleveland, USA
Triton X-100	Sigma, Deisenhofen
Trypanblau	Merck, Darmstadt
Trypsin/EDTA-Lösung	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Tween® 20	Sigma, Deisenhofen
yeast extract SERVABACTER®	Serva Electrophoresis, Heidelberg

Sämtliche verwendeten und hier nicht aufgeführten Chemikalien, biochemische Reagenzien und Lösungsmittel wurden in *p.a.*-Qualität von AppliChem (Darmstadt), Fluka (Neu-Ulm), Merck (Darmstadt), Riedel-de-Haën (Selze), Roth (Karlsruhe) oder Sigma-Aldrich (Deisenhofen) bezogen.

2.2 Enzyme, Nukleinsäuren und Kits

ABI PRISM™ ready reaction dye	Applied Biosystems, Weiterstadt
BioPORTER Reagent®	Gene Therapy Systems, Inc., San Diego, USA
Desoxynukleosidtriphosphat-Set	Boehringer, Mannheim
DNA-Marker III	MBI-Fermentas, St. Leon-Rot
Dual Luciferase® Reporter Assay System	Promega, Madison, USA
low molecular weight marker (LMW)	Sigma, Deisenhofen
Lysozym	Boehringer, Mannheim
Nucleobond® -PC-100-Kit	Macherey-Nagel, Düren
Nucleospin® -Kit	Macherey-Nagel, Düren
Phusion™-*high-Fidelity*-Polymerase	Finnzymes, Espoo, Finnland
QIAquick® -Gel-Extraction-Kit	Qiagen, Hilden
Restriktions-Endonukleasen	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Taq-DNA-Polymerase	Sigma, Deisenhofen
Trypsin Roche	Diagnostics, Mannheim
T4-DNA-Ligase	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Zero-Blunt®-PCR-Cloning-Kit	Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe
Terminator™-Cycle-Sequencing-Kit	Perkin-Elmer, Weiterstadt

2.3 Verbrauchsmaterial

Agfa Cronex5 *medical X-ray film*	Agfa-Gevaert N.V., Mortsel, Belgien
Blotpapier (# 3030-917)	Whatman, Dassel
Nitrozellulosemembran-Filter (0,45 µm)	Schleicher & Schuell, Dassel
Pasteurpipetten	Brand, Wertheim
Polykarbonat-Zentrifugenröhrchen	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Protran® Nitrozellulosemembran	Whatman, Dassel
Reagiergefäße (1,5 ml, 39 x 10,8 mm ø, farblos)	Sarstedt, Nürnberg
Skalpell	Aesculap, Tuttlingen
Spritzen (1 ml)	Becton Dickinson, Heidelberg
Spritzenfilter Millex® HV (0,45 µm)	Millipore Corporation Bedford, USA
Zellkulturschalen, ø 100 mm	Renner, Dannstadt
12-Loch-Zellkultur-Testplatten	Renner, Dannstadt
48-Loch-Zellkultur-Testplatten	Greiner, Kremsmünster, Österreich

2.4 Pro- und eukaryotische Zellstämme

COS-7 (*african green monkey kidney cells-7*)	Freundlicherweise von der Abteilung Virologie der Universität Ulm zur Verfügung gestellt.
HEK293 (human embryonal kidney cells)	Freundlicherweise von der Abteilung Virologie der Universität Ulm zur Verfügung gestellt.
THP-1	Freundlicherweise von der Abteilung Virologie der Universität Ulm zur Verfügung gestellt.
E. coli DH5α	Clontech/ITC Biotechnology, Heidelberg
E. coli Rosetta® 2 (DE3) *competent cells*	Novagen®, Merck, Darmstadt

2.5 Plasmide

pASK-IBA45plus	IBA GmbH, Göttingen
pcDNA3.1(+/-)	Invitrogen, Karlsruhe

pCR®-Blunt	Invitrogen, Karlsruhe
pCR2.1®	Invitrogen, Karlsruhe
pSRE.L	Dr. D. Wu, New Haven, USA
pTAT-HA	M. Becker-Hapak, St. Louis, USA
pRL-TK	Promega, Madison, USA

2.6. Plasmid-DNA-Konstrukte

Folgende Plasmide lagen in der Arbeitsgruppe vor:

Flag-CCR2b(WT)-pcDNA3.1(+)	Dr. M. Oppermann, Göttingen
Myc-TPD52-pcDNA3.1(-)	eigene Arbeitsgruppe
TPD52-pCR2.1	eigene Arbeitsgruppe

Folgende DNA-Konstrukte wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit hergestellt:

Strep-TPD52-pASK-IBA45plus
Strep-TPD52-pcDNA3.1(-)
pTAT-HA-TPD52

2.7 Oligonukleotide

Die folgenden Oligonukleotide wurden von der Firma Thermo Electron Corporation, Ulm bezogen.

2.7.1 Vektor-spezifische Oligonukleotide

pCRblunt-*reverse*: 5´- CAGGAAACAGCTATGAC- 3´

pCRblunt-*universe*: 5´- GATAAACGACGGCCAG- 3´

pcDNA-*reverse*: 5´- TAGAAGGCACAGTCGAGG- 3´

pcDNA-*universe*: 5´- TAATACGACTCACTATAGGG- 3´

2.7.2 Sonstige Oligonukleotide

Strep-TPD52-1:
5´- GGTCTCAGCGCC GACCGCGGCGAGCAAGGTC- 3´

Strep-TPD52-2
5´- GGATCCTCACAGGCTCTCCTGTGTCTTT -3´

2.8 Molekulargewichtsmarker für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die molekularen Massen wurden mit Hilfe des *low molekular weight marker* (LMW) der Firma Sigma (Deisenhofen) bestimmt.

Tab. 1: Im LMW enthaltene Proteine und deren Molekulargewichte.

Protein	LMW Molekulargewicht [kDa]
Serumalbumin des Rindes	66
Ovalbumin	45
Glycerinaldehyd-3-Phoshpat-Dehydrogenase	36
Carboanhydrase, Erythrozyten des Rindes	29
Trypsinogen, Pankreas des Rindes	24
Trypsininhibitor, Sojabohnen	20
α-Laktalbumin, Rind	14,2

2.9 Antikörper

2.9.1 Primäre Antikörper

Tab. 2: In der Arbeit verwendete primäre Antikörper.

Name	Art des Antikörpers	Herkunft
StrepMAB-classic (Anti-Strep-tag® II)	Monoklonales Maus IgG	IBA GmbH, Göttingen
B28p (AntiTPD52)	Monoklonales Maus IgG	Dr. E. Tiacci, Institut für Hämatologie, Universität Perugia, Italien

2.9.2 Sekundäre Antikörper (Peroxidase-gekoppelt)

Tab. 3: In der Arbeit verwendete sekundäre Antikörper.

Name	Art des Antikörpers	Herkunft
Anti-Maus-IgG	Ziegen-IgG	Sigma, Deisenhofen

2.10 Geräte

ÄKTA™ *explorer* 100	Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
Brutschrank Kelvitron® T	Heraeus Instruments, Fellbach
Certomat HK (Temperaturregeleinheit)	Braun, Melsungen
Certomat® R (Schüttlereinheit)	Braun, Melsungen
Chromatografie-Säule HR 5/10	GE Healthcare, München
Elektrophoresekammer für SDS-PAGE, groß	Hoefer-Amersham Biosciences, Freiburg
Elektrophoresekammer für SDS-PAGE, klein	Sigma, Deisenhofen
Fotometer *qene quant pro*	Amersham Biosciences, Freiburg
Hamilton-Mikroliter™-Spritze, 100 µl	Hamilton Bonaduz, Bonaduz, Schweiz
Hamilton-Mikroliter™-Spritze, 250 µl	Hamilton Bonaduz, Bonaduz, Schweiz
Horizontalgelkammer	MBT-Brand, Heidelberg
Immunoblot-Transferkammer	Renner GmbH, Dannstadt
J2-HS Zentrifuge	Beckman Instruments, München
Luminometer Mithras LB 940	Berthold Technologies, Bad Wildbad
Magnetrührer IkaCombimag RCH	Janke & Kunkel, Staufen
Magnetrührer IkaCombimag RCO	Janke & Kunkel, Staufen
Minifuge T	Hereaus Sepatech, Osterode
Mikroskop IMT-2	Olympus, Hamburg
Optima™ TLX Ultrazentrifuge	Beckman Instruments, München
Sicherheitswerkbank BSB 4A	Gelaire, Sydney, Australien
Sicherheitswerkbank HERA Safe	Heraeus Instruments, Fellbach
Sicherheitswerkbank Uniflow UVUB 1200	Uni Equip, Martinsried
Sonifier® B-12	Branson Ultraschall, Dietzenbach
Sorvall Ultrazentrifuge OTD50B	Du Pont Instruments, Bad Nauheim
Spektrofotometer DU 640	Beckman Instruments, München

Superdex HR 200 10/30	GE Healthcare, München
thermocycler PTC-200	MJ-Research, Biozym, Oldendorf
Tischzentrifuge 5415 C	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge 5417 R	Eppendorf, Hamburg
Transilluminator IL 200M	Bachofer, Reutlingen
Videodokumentations-System CF8/1 DX	Kappa Meßtechnik GmbH, Gleichen

2.11 Software

Tab. 4: In der Arbeit verwendete Software.

Programm	Herkunft
Microsoft Office Word 2010	Microsoft Corporation, Washington, USA
PG_Prot (BASIC-Programm)	Prof. Dr. P. Gierschik, Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Universität Ulm
SHARP-Scanner Scan JX/WIN V4.0	Krystek EDV, Hamburg

3. Methoden

3.1 Mikrobiologische Methoden

3.1.1 Herstellung von Luria-Bertani-Medium und -Agarplatten

Für die Kultivierung der beiden *Escherichia coli*-Bakterienstämme (*E. coli*) DH5α und Rosetta 2 (DE3), wurde autoklaviertes Luria-Bertani (LB)-Medium verwendet. Die mit Antibiotikaresistenz-vermittelnden Plasmiden transformierten Bakterien wurden anschließend auf Antibiotika-haltigen Agarplatten bzw. LB-Medium kultiviert (z.B. Ampicillin 50 µg/ml und/oder Chloramphenicol 34 µg/ml). Dies führte zur Selektion der Bakterien, welche das Plasmid erfolgreich aufgenommen hatten. Zur Herstellung von LB-Agarplatten wurde autoklaviertes LB-Medium mit Agar versetzt. Nach Abkühlung auf Handwärme wurden die entsprechenden Antibiotika hinzugegeben. Die Lösung wurde vor dem Erstarren in Petrischalen gegossen. Die erstarrten LB-Agarplatten wurden bei 4 °C gelagert.

LB-Medium:	1,0 % (m/V)	Bactotrypton
	0,5 % (m/V)	Hefeextrakt
	1,0 % (m/V)	NaCl
	in ddH_2O	
LB-Agar:	2 % (m/V)	Agar in LB-Medium
Ampicillin-Lösung:	50 mg/ml in H_2O; steril filtriert	
Chloramphenicol:	34 mg/ml in H_2O; steril filtriert	

3.1.2 Transformation von Bakterien

Unter Transformation versteht man das Einbringen einer spezifischen Plasmid-DNA in Bakterien. Die dafür eingesetzten Bakterien wurden dazu durch Behandlung mit einem Ca^{2+}-haltigen Puffer zunächst kompetent gemacht. Die aliquotierten kompetenten Bakterien lagen in der Arbeitsgruppe vor. Waren die Plasmide zuvor durch Ligation generiert worden, wurde die Hälfte des Ligationsansatzes zur Transformation von 100 µl kompetenter Bakterien eingesetzt. Wurde ein zuvor in Bakterien bereits vermehrtes Plasmid erneut in Bakterien eingebracht, z.B. zur Expression der vom Plasmid-kodierten Proteine, ein Vorgang der als Retransformation bezeichnet wird, wurden nur 25 µl Bakterien verwendet. Zur Vermehrung von Plasmiden wurden DH5α-Bakterien, zur Proteinexpression wurden Rosetta (DE3)-Bakterien verwendet. Für die Transformation

wurden entsprechende Aliquots der Bakterien auf Eis aufgetaut und mit der Plasmid-DNA versetzt. Die Bakterien wurden für 15-30 min auf Eis mit den Plasmiden inkubiert, dann einem Hitzeschock für 45 Sekunden bei 42 C° ausgesetzt, einige Sekunden wieder auf Eis inkubiert und nach Zusatz einer Nährlösung (250 µl SOC-Medium, ohne Antibiotikum) zur Regeneration für 60 min bei 37 C° unter Schütteln inkubiert (200 *rpm*; Certomat® R). Der Hitzeschock (*heat shock*) macht die Bakterienwände durchlässig und ermöglicht somit eine Aufnahme der Plasmid-DNA in die Bakterienzelle. Im Anschluss wurden die so behandelten Bakterien auf einer Antibiotikum-haltigen LB-Agar-Platte ausgestrichen (bei einer Retransformation wurden lediglich 50 µl des Ansatzes verwendet).

SOC-Medium:	10 mM	NaCl
	2,5 mM	KCl
	10 mM	$MgCl_2$
	20 mM	Glucose
	2,0 % (m/V)	Trypton
	0,5 % (m/V)	Hefeextrakt

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Vervielfältigung und Präparation von Plasmid-DNA

Die Plasmid-tragenden *E. coli* wurden in LB-Medium mit den entsprechenden Antibiotika unter Standardbedingungen kultiviert (200 *rpm*, 37 C°, ÜN; Certomat® R). Die Präparation der Plasmid-DNA aus 1,5 ml Bakterienkultur wurde mittels dem NucleoSpin®-Kit von Macherey-Nagel (Minipräparation) und die Präparation aus 50 ml Bakterienkultur mittels Nucleobond®-AX 100 Kit von Macherey-Nagel (Midipräparation) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die so isolierte Plasmid-DNA wurde bei -20 °C gelagert.

3.2.2 Konzentrationsbestimmungen von Nukleinsäuren in Lösung

Die Nukleinsäurekonzentration einer Lösung kann spektralfotometrisch, durch Ermittlung der Extinktion bei 260 nm, in einer Quarzküvette gemessen werden. Eine optische Dichte (1 OD) entspricht hierbei 50 µg/ml doppelsträngiger DNA, 33 µg/ml einzelsträngiger Oligonukleotid-DNA oder 40 µg/ml RNA. Die Reinheit der Nukleinsäurelösung kann über das Verhältnis der Extinktionen bei 260 nm und 280 nm ($OD_{260/280}$) ermittelt werden. Hohe Werte zwischen 1,8 und 2,0 weisen auf eine hohe Reinheit und niedrigere Werte auf Verunreinigungen durch Proteine hin.

3.2.3 Auftrennung von DNA in Agarosegelen

Nukleinsäuren können auf Grund ihrer Molekülladung durch Anlegen eines elektrischen Feldes in einem Agarosegel ihrer Größe nach aufgetrennt werden. Das Agarosegel entspricht einem gelartigen Netz, das sich aus langen Agarosepolymer-Fäden zusammensetzt. Auf diese Weise entstehen Gelporen, die umso kleiner sind, je höher die Konzentration der Agaraose gewählt wird. Kleinere Moleküle können sich daher schneller durch das Gel bewegen als größere. Die eingesetzte Agarosekonzentration des Gels richtete sich demnach nach der Größe der aufzutrennenden Moleküle (siehe hierfür unten stehende Tabelle 5). Für die Agarose-Gelektrophorese wurde eine Horizontalgelapparatur verwendet. Zur Herstellung des Agarosegels wurde die entsprechende Menge an Agarose in Elektrophoresepuffer (TAE) eingewogen und unter starkem Rühren aufgekocht. Die Agaroselösung wurde nach Abkühlen auf *ca.* 50 °C mit 0,5 mg/ml Ethidiumbromid – einem Phenanthridinfarbstoff – versetzt und zum Erstarren in einen Gelschlitten gegossen. Der Farbstoff Ethidiumbromid interkaliert zwischen den Basen doppelsträngiger DNA und verändert dabei sein Anregungsspektrum. Bei Anregung mit ultraviolettem Licht (UV-Licht) wird die Fluoreszenz stark erhöht, was dazu führt, dass die Stellen im Agarosegel, an denen sich DNA-Moleküle befinden, leuchten. Um ein Herabsinken der DNA-Proben in die vorgefertigten Geltaschen zu gewährleisten, wurden die Proben mit jeweils 5 µl glycerinhaltigem Probenpuffer versetzt, welcher durch den Farbstoff Bromphenolblau zusätzlich eine Verfolgung der Lauffront der Proben ermöglichte. Die Proben wurden anschließend in die Taschen des mittlerweile erstarrten Agarosegels geladen und die DNA bei einer konstanten Feldstärke von 10 V/cm in 1x TAE, für 30 min elektrophoretisch aufgetrennt. Die Auftrennung der DNA wurde mittels Transilluminator IL 200M (Bachofer) und unter Verwendung eines Videodokumentations-Systems CF8/1 DX (Kappa Messtechnik GmbH) fotografisch dokumentiert.

Tab. 5: Optimaler Trennbereich linearer DNA in Abhängigkeit verschiedener Agarosekonzentrationen.

Agarosekonzentration [% (m/V)]	Trennbereich linearer DNA [kb]
0,7	0,8-10
0,9	0,5-7
1,2	0,4-6
1,5	0,2-0,3
2,0	0,1-0,2

1x TAE:	40 mM	Tris-HCl; pH 8,0
	1,0 mM	EDTA
	0,1 % (V/V)	Essigsäure
Ethidiumbromidlösung:	10 mg/ml	Ethidiumbromid in ddH_2O, Lagerung im Dunkeln
6x DNA-Probenpuffer:	30 % (V/V)	Glycerin
	50 mM	EDTA; pH 8,0
	0,25 % (m/V)	Bromphenolblau

3.2.4 Extraktion von DNA aus Agarosegelen

Die zuvor in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennte DNA sollte aus dem Agarosegel extrahiert werden. Dazu wurde die gewünschte DNA-Bande mit Hilfe des Transilluminators IL 200M (Bachofer) identifiziert und das dazugehörige Gelfragment mit einem sterilen Skalpell aus dem Agarosegel heraus geschnitten. Die im Gelfragment enthaltende DNA wurde unter Verwendung des QIAquick Gel Extraction Kit (Quiagen) nach Angaben des Herstellers aus dem ausgeschnittenen Gelstück extrahiert. Die DNA wurde bei -20 °C gelagert.

3.2.5 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Die Spaltung von DNA wurde mit Restriktionsendonukleasen (REs) nach den Angaben der Enzym-Hersteller durchgeführt. Die Restriktionsansätze wurden nach einer vom Hersteller empfohlenen Temperatur und Zeit (z.B. 37 °C, 1 h) inkubiert und anschließend für die gelelektrophoretische Auftrennung im Agarosegel mit 5 µl 6x DNA-Probenpuffer versetzt. Zur Identifizierung der Größe der DNA-Fragmente wurde ein Molekulargewichtsstandard mit DNA-Fragmenten bekanter Größe (Marker III- λ DNA gespalten mit EcoRI + HindIII) ebenfalls elektrophoretisch aufgetrennt. Das Ergebnis der Restriktionsanalyse wurde unter Verwendung des Videodokumentations-Systems CF8/1 DX (Kappa Messtechnik GmbH) fotografische dokumentiert.

Restriktionsansatz:	0,5-1,0 µg	Plasmid-DNA
	1,5 µl	10 x Restriktionspuffer
	0,3 µl	Restriktionsenzyme (10 U/µl)
	ad 15 µl mit ddH_2O	

3.2.6 Ligation von DNA-Fragmenten in Plasmidvektoren

Wird ein DNA-Fragment mit einem linearisierten Vektorplasmid über Phosphodiesterbindungen verknüpft, erhält man ein rekombinantes Plasmid, welches unter anderem in kompetente Zellen eingeschleust werden kann. Für die Ligation wurde die T4-DNA-Ligase (Fermentas) verwendet. Diese Ligase katalysiert die Bildung der Phosphodiesterbrücken zwischen dem 5´-Phosphat-Ende und dem 3´-Hydroxyl-Ende doppelsträngiger DNA. Um eine ausreichende Ligationseffizienz zu erzielen, sollte das molare Verhältnis von Vektor zu DNA-Fragment mindestens eins zu drei betragen.

Ligationsansatz:	1,5 µl	10 x Ligationspuffer
	2,0 µl	Vektor (1:10) (*ca.* 20 ng)
	8,0 µl	DNA-Fragment (ca. 100 ng)
	1,5 µl	T4-Ligase (1 U/µl)
	ad 15 µl mit ddH_2O	

Der Ligationsansatz wurde anschließend über Nacht bei 16 °C inkubiert. Die mit dem DNA-Fragment versehenen Plasmidvektoren wurden entweder in kompetente Bakterienzellen transformiert oder bei -20 °C gelagert.

3.2.7 Polymerase chain reaction (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion ermöglicht eine Vermehrung (Amplifikation) oder Modifikation eines bestimmten DNA- oder cDNA-Fragments. Das Prinzip der PCR beruht auf dem Durchlaufen mehrerer Zyklen, wobei die DNA exponentiell vervielfältigt wird. Produkte vorheriger Zyklen dienen dabei als Vorlage für die Bildung weiterer DNA-Fragmente. Der Zyklus beginnt jeweils mit der DNA-Doppelstrang-Denaturierung (*denaturation*). Anschließend werden synthetisch hergestellte Oligonukleotide (*primer*), welche am 5´- und am 3´-Ende des gewünschten DNA-Abschnittes (Matrize) binden können, angelagert (*annealing*). Eine Verwendung von spezifischen Oligonukleotiden ermöglicht hierbei eine gegenüber der Originalsequenz modifizierte DNA-Kopie. Mit diesem Mechanismus ist es möglich, dass neue Mutationen oder Restriktionsschnittstellen gezielt in das DNA-Fragment eingebaut werden. Die Taq-Polymerase – eine thermostabile DNA-Polymerase aus dem Archaebakterium *Thermus aquaticus* (Mullis u. Faloona, 1987; Saiki *et al.*, 1988) – amplifiziert anschließend den von den Oligonukleotiden begrenzten Bereich, in 5´→3´-Richtung der DNA (*primer extension*). Alle Abschnitte der Zyklen

wurden nach Standard-PCR-Ansatz und -Programm (siehe Tabelle 6) in einem *thermocycler* (PTC-200, MJ-Research) durchgeführt.

Standard-PCR-Ansatz:	10 µl	5 x Phusion HF-Puffer
	1 µl	10 µM Oligonukleotid 1
	1 µl	10 µM Oligonukleotid 2
	1 µl	10 mM dNTP-Mix
	x µl	Matritzen-DNA (*ca.* 500 ng)
	1 µl	Phusion™-*high-Fidelity*-Polymerase (2 U/µl)
	ad 50 µl mit ddH_2O	
5 x Phusions HF-Puffer:	50 mM	Tris-HCl; pH 8,3
	250 mM	KCl
	15 mM	$MgCl_2$
	0,01 % (m/V)	Gelantine

PCR-Standardprogramm:

Tab. 6: PCR-Standardprogramm.

Schritt	Temperatur	Dauer	Anzahl der Zyklen
Denaturierung	95 °C	3 min	1
Denaturierung	95 °C	1 min	40
Anlagerung der Oligonukleotide	x °C (T_m)	1,5 min	40
Extension	72 °C	1,5 min	40
Schlussextension	72 °C	10 min	1
Lagerung	4 °C	unbegrenzt	

Die spezifische *annealing*-Temperatur (T_m) wurde anhand der Oligonukleotid-Sequenzen, nach Nelson & Brutlag (1971) – siehe unten stehende Formel – berechnet.

$$Tm\,[°C] = [4 \times (G + C)] + [2 \times (A + T)]$$

G = Anzahl der Guanine

C = Anzahl der Cytidine

A = Anzahl der Adenine

T = Anzahl der Thymidine

3.2.8 Automatisierte, nicht radioaktive DNA-Sequenzanalyse

Zur Sequenzanalyse der rekombinanten DNAs in den verschiedenen Vektoren wurde eine automatisierte DNA-Sequenzierung unter Verwendung der *dye terminator*-Sequenziermethode durchgeführt (Sanger *et al*., 1977; Applied Biosystems). Dazu wurden vektorspezifische Oligonukleotide eingestzt. Auf diese Weise wurden die Sequenzen aller im Rahmen der vorliegenden Arbeit hergestellten cDNAs auf ihre Richtigkeit hin überprüft.

Die Sequenzierungen wurden freundlicherweise von Frau Gierschik durchgeführt.

3.3 Kultivierung eukaryotischer Zellen

3.3.1 Kultivierung von african green monkey kidney cells (COS-7-Zellen)

Adhärente COS-7-Zellen wurden in Zellkulturschalen (∅ 10 cm, Renner) in 10 ml COS-7-Zellmedium kultiviert. Die Kultivierung erfolgte steril im Inkubator bei 37 °C und 10 % CO_2 in Wasserdampf gesättigter Atmosphäre. Das Nährmedium wurde alle 2 bis 3 Tagen ausgewechselt und die Zellen bei Konfluenz zur Vereinzelung umgesetzt. Dazu wurde das alte Medium abgesaugt, die Zellen mit 5 ml sterilem, Calcium- und Magnesium-freiem, gepuffertem Phosphatpuffer (pH 7.2; 1 x CMF-PBS) gewaschen und anschließend mit 2 ml Trypsin/EDTA-Lösung (PAA Laboratories GmbH) versetzt. Um die Zellen abzulösen, wurden sie für 5 min bei 37 C° im Brutschrank inkubiert. Die meisten bestehenden Zell-Zell- sowie auch die Zell-Matrix-Kontakte sollten hierdurch gelöst werden (Trypsinierung). Daraufhin wurden die Zellen mit 8 ml des COS-7-Zell-Mediums abgespült und die daraus entstandene Zellsuspension in ein 15 ml-Röhrchen überführt. Diese Zellsuspension wurde bei Raumtemperatur für 3 bis 5 min bei 173 *g* zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Zellpellet wurde in 5 ml frischem Zellmedium resuspendiert und in einer gewünschten Verdünnung (z.B. 1:5 oder 1:10) auf neue Zellkulturschalen verteilt.

COS-7-Zellmedium:	10 %	hitzeinaktiviertes FCS (*fetal calf serum*)
	1 %	L-Glutamin (200 mM)
	1 %	Penicillin- (10 000 U/ml) Streptomycin- (10 mg/ml) Lösung
	in DMEM-Medium (ohne Natriumpyruvat, mit 4,5 g/l Glucose, mit L-Glutamin)	

10 x CMF-PBS:	677 mM	Tris
	27 mM	KCl
	80 5mM	Na_2HPO_4 x 2 H_2O
	14,7 mM	KH_2PO_4 ; pH 7,2
Trypsin/EDTA-Lösung:	0,05 %	Trypsin
	0,02 %	EDTA (m/V)
	in 1 x CMF-PBS	

3.3.2 Kultivierung von human embryonic kidney 293-Zellen

Adhärente *human embryonic kidney* 293 (HEK293)-Zellen wurden in Zellkulturschalen (∅ 10 cm, Renner) in 10 ml HEK293-Zellmedium bei 37 °C und 10 % CO_2 in Wasserdampf gesättigter Atmosphäre kulitviert. Um die Zellen zu vereinzeln, wurden diese mit 10 ml Nährmedium abgespült und die Zellsuspension in ein 15 ml-Röhrchen überführt. Diese Zellsuspension wurde bei Raumtemperatur für 3 bis 5 min bei 173 *g* zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Zellpellet wurde in 5 ml frischem Medium resuspendiert und in einer gewünschten Verdünnung (z.B. 1:5 oder 1:10) auf neue Zellkulturschalen verteilt.

HEK293-Zellmedium:	2,5 %	HEPES (1M)
	1 %	Natriumpyruvat (100mM)
	in COS-7-Zellmedium (siehe 3.3.1)	

3.3.3 Kultivierung von monozytären THP-1-Zellen

Monozytäre nicht adhärente humane THP-1-Zellen wurden ebenfalls in Zellkulturschalen (∅ 10 cm, Renner) in 10 ml THP-1-Zellmedium bei 37 °C und 10 % CO_2 in Wasserdampf gesättigter Atmosphäre kultiviert. Um die Zellen zu vereinzeln, wurden diese in ein 15 ml-Röhrchen überführt, die Zellsuspension bei Raumtemperatur für 3 bis 5 min bei 173 *g* zentrifugiert und das Zellpellet in 5 ml frischem Medium resuspendiert. Die Zellen wurden in einer gewünschten Verdünnung (z.B. 1:5 oder 1:10) auf neue Zellkulturschalen verteilt.

THP-1-Zellmedium:	10 %	hitzeinaktiviertes FCS (*fetal calf serum*)
	1 %	L-Glutamin (200 mM)
	1 %	Penicillin- (10 000 U/ml) Streptomycin- (10 mg/ml) Lösung
	2,5 %	HEPES (1M)

1 % Natriumpyruvat (100mM)
in 1640-Medium (ohne Natriumpyruvat, mit 4,5 g/l Glucose mit L-Glutamin)

3.3.4 Zellzahlbestimmung

Für die Transfektions- und Transduktionsversuche wurden die Säugetierzellen (COS-7-, HEK293- und THP-1-Zellen) in einer definierten Zellzahl ausgesät. Um die dazu notwendige Zellzahl zu ermitteln, wurde jeweils ein Aliquot der gewonnen Zellsuspensionen in einem Verhältnis 1:4 mit Trypanblaulösung versetzt und ein Aliquot dieses Gemisches in die Neubauer-Zellzählkammer pipettiert. Die Zellzahl wurde unter Verwendung eines Mikroskops bestimmt. Dazu wurden die vier im Mikroskop sichtbaren großen Quadrate ausgezählt. Da die Zellzahl eines Quadrats einem Volumen von 1 ml entspricht, wurde die ermittelte Zellzahl durch vier dividiert, dies ergab die Zellzahl pro ml Zellsuspension. Dieser Wert wurde mit der entsprechenden Verdünnung (1:4) verrechnet. Die Menge an Zellen wurde entsprechend der gewählten Zellkulturschalen ausgesät (Tabelle 7).

Tab. 7: Zellzahlen und Volumina der Medien der zur Transfektion und Transduktion eingesetzten Säugetierzellen.

Zellkulturschalentyp	Zellzahl/Loch	Medium/Loch
∅ 100 mm-Schale	$1{,}6 \times 10^6$	10 ml
12-Loch-Platte	2×10^5	2 ml
48-Loch-Platte	4×10^4	0,5 ml

Trypanblaulösung: 0,5 % (m/V) Trypanblau
in 0,85 %iger (m/V) NaCl-Lösung

3.3.5 Transfektion von COS-7-Zellen mit dem Transfektionsreagenz Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen)

Um die Funktionalität des mit dem Strep-tag-versehenen Proteins zu überprüfen, wurde Strep-TPD52 zusammen mit dem CCR2b-Chemokin-Rezeptor in COS-7-Zellen exprimiert. Dazu wurden die Zellen mit Strep-TPD52- und/oder CCR2b-kodierenden Plasmiden unter Verwendung des Transfektionsreagenz Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen) nach Standard- Ansatz (siehe Tabelle 8) transfiziert. Für die Transfektion wurden 4×10^4 Zellen pro Vertiefung einer 48 Loch-Platte ausgesät. Die Transfektion

wurde am Folgetag nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Mindestens eine Stunde vor Transfektionsbeginn wurde das COS-7-Zellmedium (siehe 3.3.1) gewechselt. Für die Transfektion wurden je Dreifachansatz zwei Lösungen angesetzt. Lösung A enthielt die zu transfizierende DNA, der Opti-MEM (GIBCO® Invitrogen Cell Culture) zugesetzt wurde. Lösung B enthielt das Transfektionsreagenz Lipofectamine™ 2000 in Opti-MEM. Die Menge des eingesetzten Transfektionsreagenz war von der zu transfizierenden DNA-Menge abhängig (1:2 (w/V)). Nach Inkubation von 5 min bei RT wurden die beiden Lösungen vereint und gemischt und das Gemisch für weitere 20 min inkubiert. Im Anschluss wurde das DNA-Lipofectamine™ 2000-Gemisch auf die Zellen getropft und die Zellen 24 h bei 37 °C und 10 % CO_2 in Wasserdampf gesättigter Atmosphäre inkubiert.

Tab. 8: Standard-Ansatz für die Transfektion von COS-7-Zellen mit dem Transfektionsreagenz LipofectamineTM 2000 (Invitrogen).

Zellkulturschalentyp	DMEM-Medium	OptiMEM I (je Lösung)	DNA	Lipofectamine™ 2000
48-Loch Platte	250 µl	25 µl	0,2 µg	0,4 µl

Opti-MEM: serumfreies Opti-MEM® I, ohne Zusatz von FCS und Antibiotika

3.4 Proteinbiochemische Methoden

3.4.1 Proteinexpression in Bakterien

Zunächst wurden *E. coli* Rosetta 2 (DE3)-Zellen mit dem Strep-TPD52-pASK-IBA45plus-Plasmid transformiert. Eine Einzelkolonie wurde dann am Folgetag dazu verwendet eine 50 ml Übernachtkultur (37 °C, 200 *rpm*) mit Chloramphenicol (34 µg/ml) und Ampicillin(50 µg/ml) -haltigem LB-Medium anzulegen. Am nächsten Tag wurde diese Vorkultur dazu verwendet, Hauptkulturen anzuimpfen (Verhältnis 1:20). Diese Bakterienzellkulturen wurden dann unter Standardbedingungen bis zum Erreichen einer OD_{550} von ungefähr 0,6 inkubiert (37 °C, 200 *rpm*). Anschließend wurde die Proteinexpression induziert. Dafür wurden die Bakteriensuspensionen mit 0,2 µg Anhydrotetrazyklin/ml Kulturvolumen versetzt. Anhydrotetrazyklin bindet an den Tetrazyklinrepressor, welcher daraufhin seine Affinität gegenüber dem Tetrazyklinoperator verliert und löst somit die Expression des gewünschten Proteins aus. Die Proteinexpression wurde unter unterschiedlichen Expressionsbedingungen durchgeführt. Hierbei wurden verschiedene Expressionsumgebungstemperaturen und -zeiten bezüglich ihres Effekts auf die Expressionseffizienz hin analysiert. Anschließend wurden die

Bakterienzellsuspensionen für 10 min bei 9950 *g* und 4 °C zentrifugiert. Die so gewonnen Bakterienpellets wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

Anhydrotetrazyklinlösung:	2 mg/ml	Anhydrotetrazyklin
	in N,N-Dimethylformamid	

3.4.2 Extraktion von Proteinen aus E. coli Rosetta 2 (DE3)-Zellen

Die (wie in 3.4.1 beschrieben) gewonnenen Bakterienpellets wurden in entsprechenden Mengen Lysispuffer A resuspendiert. Für die Zelllyse der Bakterien wurden diese zunächst für 90 min auf Eis inkubiert und im Anschluss für 4 x 30 s bei max. 50 W – noch immer auf Eis – sonifiziert. Die Sonifizierung sollte zum vollständigen Aufschluss der Bakterienzellen und zur Zerstörung von DNA-Strängen führen. Abschließend wurden die so gewonnen Bakterienzelllysate für 1 h bei 90 000 *g* und 4 °C zentrifugiert, um unlösliche Zellanteile zu entfernen. Die löslichen Fraktionen wurden entweder direkt zur proteinchemischen Analyse oder zur Aufreinigung der in ihnen enthaltenen Strep-TPD52-Fusionsproteine verwendet oder zur späteren Aufarbeitung in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

Lysispuffer A:	1 mM	DTT
	1 mg/ml	Lysozym
	1 µM	Pepstatin
	1 µM	Leupeptin
	100 µM	PMSF
	1 µg/ml	Aprotinin
	2 µg/ml	Sojabohnen-Trypsininhibitor
	in 100 mM	Tris-HCl; pH 8,0; 150 mM NaCl,
	1 mM EDTA	

3.4.3 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Die Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford ist eine sehr empfindliche photometrische Methode, die dazu dient, die Konzentration der in einer Proteinlösung enthaltenen Proteine zu bestimmen. Das Prinzip beruht darauf, dass der in dem Bradfordreagenz enthaltene Triphenylmethanfarbstoff Coomassie-Brillant-Blau G-250 im sauren Milieu Komplexe mit den hydrophoben Seitenketten von Proteinen bildet. Diese Komplexbildung stabilisiert die blaue, unprotonierte und anionische Sulfonatform des

Farbstoffes und es kommt so zu einer Verschiebung des Absorptionsspektrums – zu einem Absorptionsmaximum bei 595 nm. Der Unterschied beider Extinktionskoeffizienten (freier Farbstoff zu Protein-Farbstoff-Komplex) ermöglicht eine Bestimmung der Zunahme der Absorption bei 595 nm und damit eine Messung der Proteinkonzentration einer Proteinlösung. Zunächst wurde eine Eichgerade unter Verwendung einer Standardproteinlösung (γ-Globulin) bekannter Konzentration erstellt. Dazu wurde die Proteinstandardlösung entsprechend der in Tabelle 9 aufgeführten Angaben, mit H_2O verdünnt und mit 200 µl 5 x Bradfordreagenz versetzt. Von den zu analysierenden Proteinlösungen wurden zwischen 10 und 20 µl mit H_2O auf 800 µl aufgefüllt und dann gleichfalls mit 200 µl 5 x Bradfordreagenz versetzt.

Nach kurzem Mischen der Proben wurde die Extinktion photometrisch bei 595 nm bestimmt. Es wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt. Das Erstellen der Eichgerade und die Bestimmung der Konzentration der zu untersuchenden Proteinproben wurden mit der Software PG_Prot (BASIC-Programm) durchgeführt.

Tab. 9: Verdünnung der γ-Globulin-Standardproteinlösung zur Erstellung einer Eichgeraden.

γ-Globulin-Proteinlösung [µl]	ddH_2O [µl]	Proteinkonzentration [µg/ml]
0	800	0
10	790	4,25
20	780	8,50
30	770	12,75
40	760	17,00
50	750	21,25

γ-Globulin-Proteinlösung:	0,34 mg/ml in ddH_2O	
5x Bradford-Reagenz:	400 mg	Coomassie-Brillant-Blau G250
	209 ml	100 %iges Ethanol
	500 ml	*ortho*-Phosphorsäure (85 %)
	291 ml	filtriertes ddH_2O

3.4.4 Sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

Bei der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli (1970) handelt es sich um eine analytische Methode, die zur Auftrennung und Analyse von Proteinen aus Proteingemischen eingesetzt wird. Die Elektrophoresen wurden mit großen oder kleinen

Gelen in verschiedenen Vertikalapparaturen durchgeführt. Für kleine Gele wurde das Sigma-System (Sigma) für große das Hofer-System (Hofer-Amersham Biosciences) verwendet. Genauere Angaben zu den Apparaturen finden sich in Tabelle 10.

Tab. 10: Plattengröße und Abstandshalter der in der Arbeit verwendeten SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese-Vertikalapparaturen.

System	Glasplattengröße [mm]	Abstandshalter [mm]
Sigma	80 x 100	1,0
Hofer	160 x 180	1,5

Für die Auftrennung der Proteine wurden Polyacrylamidgele mit 10 % oder 12,5%igem Trenngel und einem 6 %igen Sammelgelanteil, wie in Tabelle 11 aufgeführt, angefertigt. Die angegebenen Mengen an Acrylamidlösungen entsprechen dabei einem großen Gel oder vier kleinen Gelen. Nachdem das Trenngel in die Glaskammer gegossen worden war, wurde es mit einem dünnen Isopropanol-Flüssigkeitsfilm überschichtet. Sobald das Gel vollständig polymerisiert war (nach ungefähr 20 min), wurde das Isopropanol vorsichtig entfernt, die Oberfläche kurz mit H_2O gespült, und anschließend das Sammelgel gegossen. Im Anschluss wurde der Kamm für die späteren Geltaschen eingesetzt. Nachdem das Gel auspolimerisert war, wurde der Kamm gezogen und die Taschen zunächst mit H_2O und dann mit 1x Laufpuffer gespült. Die Protein-haltigen Proben bzw. der *low molecular weight marker* (Sigma) in Probenpuffer wurden mittels einer 100 µl-Hamilton-Spritze (Hamilton Bonaduz) in die Taschen geladen. Die SDS-PAGE wurde bei den kleinen Gelen (Sigma-System) bei einer konstanten Stromstärke von 125 mA für 1 h 15 min und bei den großen Gelen (Hoefer-System) bei 45 mA für 3 h in 1 x Laufpuffer durchgeführt.

Tab. 11: Mengenangaben zur Herstellung der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Polyacrylamidgele.

	Trenngellösung	Trenngellösung	Sammelgellösung
Prozent (m/V) Acrylamid/Bisacrylamid (29:1)	10 %	12,5 %	6 %
30 % (m/V)-Acrylamid/Bisacrylamid (29:1)-Fertiglösung	11 ml	12,5 ml	2 ml
ddH_2O	13 ml	9,5 ml	5,3 ml
Trenngelpuffer: 1,5 M Tris-HCl; pH 8,8 steril filtriert	8,5 ml	7,5 ml	-
Sammelgelpuffer: 0,5 M Tris-HCl; pH 6,8 steril filtriert	-	-	2,5
10 % (m/V) SDS	330 µl	300µl	100µl

10 % (m/V) APS	300µl	300µl	100µl
TEMED	20µl	20µl	10µl

2 x Probenpuffer:	125 mM	Tris-HCl; pH 6,8
	4 % (m/V)	Natriumdodecylsulfat (SDS)
	20 % (V/V)	Glycerin
	10 % (V/V)	β-Mercaptoethanol
	0,02 % (m/V)	Pyronin Y
10 x Laufpuffer:	250 mM	Tris
	1,9 M	Glycin
1 x Laufpuffer:	25 mM	Tris
	190 mM	Glycin
	0,1 % (m/V)	Natriumdodecylsulfat (SDS); pH 8,6

3.4.5 Coomassie-Brillant-Blau-Färbung von Proteinen

Wie unter 3.4.3 bereits beschrieben, vermag der Triphenylmethanfarbstoff Coomassie-Brillant-Blau G-250 Proteine unspezifisch anzufärben. Um die Auftrennung der in den Proteinlösungen enthaltenen Proteine im SDS-PAGE zu analysieren, wurde das Gel in einer Essigsäure-enthaltenen Coomassie-Brillant-Blau G-250 inkubiert. Auf diese Weise wurden die Proteine fixiert und gleichzeitig angefärbt. Im Anschluss wurde das Gel in einer Entfärbelösung geschwenkt, um überschüssiges Farbreagenz zu entfernen.

Coomassie-Färbelösung:	0,14 % (m/V)	Coomassie Brilliantblau R 250
	50 % (V/V)	Methanol
	10 % (V/V)	Essigsäure
Entfärbelösung:	10 % (V/V)	Methanol
	10 % (V/V)	Essigsäure

3.4.6 Western blot-Analysen

Unter dem Begriff *blotting* versteht man die Übertragung von DNA, RNA oder Proteinen auf eine Trägermembran. Dabei bezeichnet *western blot* den Transfer von Proteinen aus einem Polyacrylamidgel auf z.B. eine Nitrozellulosemembran, dem in der Regel der Nachweis eines Proteins mittels immunochemischer Verfahren folgt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die Proteine nach SDS-PAGE auf eine Protran®

Nitrozellulosemembran (Schleicher & Schuell) elektrophoretisch übertragen. Dazu wurde die Membran luftblasenfrei über das Gel gelegt und beide zwischen jeweils zwei Lagen Blotpapier (Whatman-Paper) und zwei Schaumstoffschwämmen mit Hilfe einer Plastikhalterung eingespannt. Diese wurde daraufhin in eine mit Tankpuffer gefüllte Transferkammer – die Blotapparatur – eingehängt. Die Proteine wurden so bei einer konstanten Stromstärke von 125 mA und einer maximalen Leistung von 2 W innerhalb von 12 h auf die Nitrozellulosemembran übertragen. Um die Qualität des Transfers zu überprüfen, wurden die transferrierten Proteine mit dem Farbstoff Ponceaurot angefärbt. Der Azofarbstoff Ponceaurot bindet reversibel an positiv geladene Aminogruppen der Proteine. Die Lage der Markerbanden wurde markiert und die Nitrozellulosemembran mit ddH_2O vorsichtig entfärbt. Die auf der Membran fixierten Proteine wurden anschließend mit Hilfe von spezifischen Antikörpern immunochemisch detektiert.

Transferpuffer:	10 % (V/V)	10x Laufpuffer
	20 % (V/V)	Methanol in ddH_2O
Ponceaulösung:	0,2 % (V/V)	Ponceau S
	3 % (m/V)	Trichloressigsäure

3.4.7 Immunochemischer Nachweis von Proteinen

Die zuvor mittels *western blot* auf eine Nitrozellulosemembran übertragenen Proteine (siehe 3.4.6) wurden im Anschluss immunochemisch mittels spezifischer Antikörper analysiert. In der vorliegenden Arbeit wurden dazu Antikörper eingesetzt, die gegen das Strep-Epitop oder ein TPD52-Epitop gerichtet waren. Für den Nachweis der Proteine wurde die Nitrozellulosemembran zunächst mit einem Tween (0.1% V/V)-haltigen Waschpuffer, der entweder 1 % (W/V) Rinderserumalbumin- oder 5 % (W/V) Magermilchpulver (je nach Antikörper) enthielt, für 45 min bei Raumtemperatur inkubiert. Auf diese Weise wurde die Membran abgesättigt (geblockt), so dass die später eingesetzten Antikörper nicht unspezifisch an die Membran binden konnten. Im Anschluss wurde die Membran einmal kurz mit PBS/Tween-Puffer gewaschen und mit dem ersten Antikörper für mindestens 1 h bei Raumtemperatur schwenkend inkubiert. Der Antikörper war dazu nach Herstellerangaben mit PBS/Tween-Puffer verdünnt worden. Nach der Inkubation wurde der Antikörper entfernt und die Membran 3 x 10 min mit PBS/Tween gewaschen. Anschließend wurde der zweite Antikörper, ein mit dem Enzym Peroxidase konjugierter Anti-Maus-IgG, für 45 min auf die Nitrozellulosemembran gegeben. Der zweite Antikörper ist spezifisch gegen den ersten Antikörper gerichtet. Anschließend wurde die

Membran erneut 3 x für 10 min mit PBS/Tween-Puffer und abschließend 1x für 10 min mit PBS-Puffer gewaschen. Die an der Membran gebundenen Antikörper wurden durch Zugabe eines Substrats für die konjugierte Peroxidase in einer enzymatischen Reaktion, die zur Chemoluminiszenz führt, sichtbar gemacht. Dazu wurde die Nitrozellulosemembran in einem 1:1-Gemisch der ECL-Lösungen 1 und 2 (Amersham, GE Healthcare) für 1 min inkubiert und die Chemolumineszenssignale durch Belichtung eines Röntgenfilms detektiert. Der Röntgenfilm wurde zur Auswertung entwickelt.

PBS-Puffer:	80 mM	Na_2HPO4
	80 mM	NaH_2PO_4
	100 mM	NaCl; pH 7,5
PBS/Tween-Puffer:	0,5 % (V/V)	Tween® 20 in PBS
Magermilchpulverlösung:	5 % (V/V)	Magermilchpulver in PBS/Tween
Rinderserumalbuminlösung:	3 % (V/V)	Rinderserumalbumin in PBS/Tween

3.4.8 Luziferase Assey

Die SRF-abhängige Gentranskription wurde mit Hilfe des *Dual Luciferase® Reporter Assay Systems* (Promega, Madison) untersucht. Dazu wurden die Zellen zusätzlich mit zwei Reporterplasmiden kotransfiziert. Ein Reporterplasmid – pSRE.L (*firefly*) – trägt die cDNA der Luziferase des amerikanischen Glühwürmchens *Photinus pyralis* (*firefly*-Luziferase) unter der Kontrolle des transkriptionellen Regulatorelements SRE.L – einem Derivat des *serum response element* (SRE) von c-fos. Dieses Regulatorelement wurde so verändert, dass es zwar den Transkriptionsfaktor SRF, aber nicht mehr den *tertiary complex factor* (TCF) binden kann. Somit führt die Bindung von SRF an den Promotor des Reporterplasmids zur Transkription des *firefly*-Luziferase-Gens. Die Menge an *firefly*-Luziferase stellt damit ein Maß für die Aktivität des Transkriptionsfaktors SRF dar. Das zweite Reporterplasmid – pRL-TK – trägt die cDNA einer weiteren Luziferase; die der Koralle *Renilla reniformis* (*Renilla*-Luziferase). Diese steht unter der Kontrolle des Promotors des *Herpes-simplex*-Virus-Thymidinkinasegens (HSV-TK). Die HSV-TK führt dazu, dass die *Renilla*-Luziferase konstitutiv auf niedrigem Niveau exprimiert wird. Somit stellt die Aktivität der *Renilla*-Luziferase ein Maß für die Transfektionseffizienz dar anhand derer die für die *firefly*-Luziferase-Aktivität ermittelten Werte korrigiert werden. Die Bestimmung der Reportergenaktivität erfolgte nach den vom Hersteller des Assaysystems gemachten Angaben, durch Messung der Luziferase-Aktivitäten mit dem

Luminometer Mithras LB 940 (Berthold Technologies). Zunächst wurden COS-7-Zellen (4 x 10^4 pro well) mit jeweils 0,03 µg DNA der Reporterplasmide pSRE.L und pRL-TK sowie mit 0,1 µg des Expressionsplasmids Flag-CCR2b-pcDNA3.1(+) oder mit entsprechenden Mengen des Leerplasmids transfiziert. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen entweder mit CCL2 oder dem entsprechenden Lösungsmittel für 6 h bei 37 °C und 10 % CO_2 inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 40 µl pro *well* 1x *passive lysis buffer* des *Dual Luciferase® Reporter Assay Systems* (Promega, Madison) nach Herstellerangaben aufgeschlossen. Anschließend konnte die Aktivität der f*irefly*-Luziferase durch Zugabe des Luziferase Assay Reagent II mit dem Luminometer Mithras LB 940 bestimmt werden. Durch Zugabe des *Renilla*-Luziferase-Substrat-enthaltenden *Stop&Glow*-Reagenz wurde diese Reaktion gestoppt. Anschließend konnte die *Renilla*-Luziferase-Aktivität bestimmt und die ermittelten Werte für die *firefly*-Luziferase-Aktivität korrigiert werden.

3.5 Aufreinigung von Proteinen - Chromatografische Methoden

Chromatografische Methoden werden eingesetzt, um Stoffgemische – bspw. Proteinlösungen – in einzelne Komponenten aufzutrennen und sind deshalb wichtige Methoden zur Gewinnung gereinigter Proteine. Das Prinzip der chromatografischen Trennung beruht auf einer unterschiedlichen Verteilung von einzelnen Molekülgruppen zwischen einer stationären und einer mobilen Phase. Chromatografische Methoden werden anhand ihrer verschiedenartigen Wechselwirkungen zwischen Probe, mobiler und stationärer Phase eingeteilt. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit eingesetzte Affinitätschromatografie stellt eine hoch selektive Trennmethode dar, bei der spezifische, hoch-affine, nicht-kovalente Bindungen zwischen dem Analyt und der stationären Phase die Abtrennung des gewünschten Proteins aus dem Proteingemisch ermöglichen. Die ebenfalls verwendete Gelfiltration hingegen – oder auch Größenausschlusschromatografie – ist eine Methode, die bei der chromatografischen Separation von DNA, Polysacchariden und Proteinen Anwendung findet. Die stationäre Phase wird hierbei aus Partikeln gebildet, bei denen es sich um hydrophile natürliche oder synthetische Polymere handelt. Die Gelpartikel weisen Poren mit definiertem Durchmesser auf, sind inert, ungeladen und gleich groß. Die unterschiedlich großen Moleküle eines Proteingemisches diffundieren unterschiedlich stark in diese Poren ein und werden größenabhängig eluiert. Dabei werden größere Moleküle schneller als kleinere eluiert, da sie nicht oder weniger in die Poren

gelangen. Die Porengröße bestimmt demnach den Bereich, in dem ein Protein mit bekannter Größe optimal aufgetrennt werden kann.

3.5.1 Aufreinigung von Strep-tag®-Fusionsproteinen mittels Affinitätschromatografie

Um TPD52-Proteine in größeren Mengen rein darzustellen, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Affinitätschromatografie unter Verwendung des Streptavidin-Biotin-Systems eingesetzt. Hierbei erfolgt die Auftrennung und Anreicherung der Proteine durch eine hochselektive, nicht kovalente Bindung zwischen dem Strep-tag®-tragenden Protein und der Strep-Tactin®-Matrix (IBA GmbH). Streptavidin setzt sich aus vier identischen Untereinheiten zusammen und ist ein Produkt des Bakteriums *Streptomyces avidinii*. Jede Untereinheit des Homotetramers kann mit hoher Affinität je ein freies Molekül Biotin binden. Diese Art der Bindung ist als eine der stärksten nicht kovalenten biologischen Bindungen bekannt. Biotin selbst ist ein Vitamin und gehört dem Vitamin-B-Komplex an. Die zur Aufreinigung zu verwendende Matrix enthält Strep-Tactin®, ein modifiziertes Streptavidin, welches mit dem aus acht Aminosäuren aufgebauten Biotinimitat, dem Strep-tag®, interagiert. Für die Reinigung wurde der aus den Strep-TPD52-exprimierenden Bakterien gewonnenen, löslichen Proteinfraktion 2,04 µg/ml Avidin zugesetzt. Avidin bindet freies Biotin, welches ebenfalls an der Strep-Tactin®-Matrix bindet und so das Aufreinigungsergebnis beeinträchtigen würde. Zur chromatografischen Auftrennung der in der löslichen Fraktion enthaltenen Strep-TPD52-Fusionsproteine wurde eine Strep-Tactin®-Macroprep-Matrix (HR 5/10 Chromatografiesäule; GE Healthcare) und eine ÄKTA™ Explorer 100 (Amersham Pharmacia Biotech) verwendet. Nach dem Aufladen der Probe wurde die Matrix mit 5 Säulenvolumen Puffer 1 (Flussrate von 1 ml/min) gewaschen und im Anschluss die Strep-TPD52-Fusionsproteine durch Desthiobiotin-haltigen Elutionspuffer (3 Säulenvolumina) eluiert (Flussrate von 1 ml/min) Die Eluate wurden in 1 ml Fraktionen gesammelt. Desthiobiotin hat eine noch höhere Affinität zur Strep-Tactin®-Matrix (IBA GmbH) als der Strep-*tag*® und verdrängt diesen dadurch kompetetiv. Die Proteinkonzentrationen der einzelnen Fraktionen wurden bei der Fraktionierung photometrisch bei einer Wellenlänge von 280 nm bestimmt. Ein Aliquot der in den einzelnen Fraktionen enthaltenen Proteine wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt und entweder mit Coomassie-Brillant-Blau angefärbt oder mittels *western blot* und anschließendem immunochemischen Nachweis analysiert.

Puffer 1:	100 mM	Tris-HCl; pH 8,0
	150 mM	NaCl
	1 mM	EDTA
	steril filtriert und entgast	
	Lagerung bei 4 °C	
Elutionspuffer:	2,5 mM	Desthiobiotin in Puffer 1
	steril filtriert und entgast	
	Lagerung bei 4 °C	
Regenerationspuffer:	1 mM 2-(4-Hydroxyphenylazo) benzoesäure (HABA) in Puffer1	
	steril filtriert und entgast	
	Lagerung bei 4 °C	

3.5.2 Aufreinigung von Proteinen mittels Größenausschlusschromatografie

In der vorliegenden Arbeit wurden die zuvor über eine Affinitätschromatografie angereinigten Strep-TPD52-Fusionsproteine einer Gelfiltration an einer Superdex Matrix (Superdex 200 HR 10/30) unterzogen. Nach dem Aufladen der Probe wurde die Matrix mit Puffer 1 (Flussrate von 0,5 ml/min) gewaschen und die Eluate in 0,5 ml Fraktionen gesammelt. Die Proteinkonzentrationen der einzelnen Fraktionen wurden bei der Fraktionierung photometrisch bei einer Wellenlänge von 280 nm bestimmt. Ein Aliquot der in den einzelnen Fraktionen enthaltenen Proteine wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt und entweder mit Coomassie-Brillant-Blau angefärbt oder mittels *western blot* und anschließendem immunochemischen Nachweis analysiert.

Puffer 1:	100 mM	Tris-HCl; pH 8,0
	150 mM	NaCl
	1 mM	EDTA
	steril filtriert und entgast	
	Lagerung bei 4 °C	

3.6 Proteintransduktion von Säugetierzellen

Für die Proteintransduktion von Säugetierzellen mit dem Strep-TPD52-Fusionsprotein wurde das BioPORTER® Reagent-Kit (Gene Therapy Systems, Inc.) nach Herstellerangaben verwendet. Die Proteintransduktion beruht auf einem lipidbasierten

Transportmechanismus (veranschaulicht in Abbildung 2). Das BioPORTER-Reagenz bildet Komplexe mit dem zu transduzierenden Protein, ohne es dabei kovalent zu binden. Die dabei entstandenen Komplexe binden ihrerseits an die negativ geladene Zelloberfläche. Daraufhin können die BioPORTER-Protein-Komplexe mit der Zellmembran fusionieren. Das zu transduzierende Protein wird entweder in das Zellzytoplasma abgegeben, oder aber endozytotisch aufgenommen. Letztere Komplexe fusionieren jeweils mit den Endosomen und geben das nicht kovalent gebundene Protein ebenfalls in das Zytoplasma der Säugetierzellen ab.

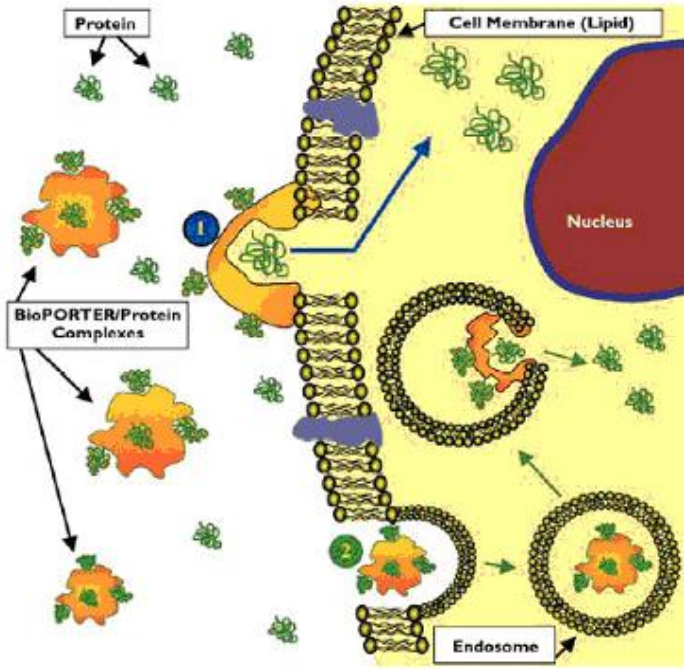


Abb. 2: Mechanismus der Proteintransduktion bei Verwendung des BioPORTER-Reagenz (BioPORTER® Reagent-Kit-*product manual* Seite 6 - Gene Therapy Systems, Inc.).

3.6.1 Transduktion der Säugetierzellen

Um das chromatografisch gereinigte Strep-TPD52 mittels BioPORTER Reagent-Kit in Säugetierzellen zu transduzieren, wurden 2 x 10^5 COS-7-Zellen/Vertiefung, 2 x 10^6 HEK293-Zellen bzw. 1 x 10^6 THP-1-Zellen in einer 12-Loch-Zellkultur-Testplatte ausgesät. Das BioPORTER-Reagenz wurde nach Herstellerangaben vorbereitet. Die Strep-TPD52-Fusionsproteine wurden mit steril filtriertem Transduktionspuffer auf eine Proteinkonzentration von 0,1 µg/µl und 0,5 µg/µl verdünnt. Anschließend wurden die Proteine mit dem BioPORTER-Reagenz gemischt und durch Auf- und Abpipettieren homogenisiert. Nach 5 min Inkubationszeit wurde die Lösung kurz durch Vortexen

gemischt. Daraufhin wurden die BioPORTER-Reagenz-Strep-TPD52-Komplexe mit serumfreiem Medium auf 500 µl Volumen aufgefüllt. Das alte Zellkulturmedium wurde von den Zellen abgesaugt und die Zellen mit sterilem vom Hersteller empfohlenen Puffer 2 gewaschen. Im Anschluss wurden die Zellen mit den BioPORTER-Reagenz-Strep-TPD52-Komplexen versetzt und für 4 h bei 37 °C mit den Zellen inkubiert.

Transduktionspuffer:	10 mM	Tris; pH 7,0
	100 mM	NaCl
	in dd H_2O	
Puffer 2:	20mM	Natriumphosphat
	150 mM	NaCl; pH7,4
	in dd H_2O	

3.6.2 Analyse der Proteintransduktion

Zur Analyse der Transduktionseffizienz des Strep-TPD52-Proteins in die Säugetierzellen wurden aus den Zellen entweder unter Verwendung eines Detergenz-haltigen Puffers und/oder durch mechanischen Aufschluss Zelllysate hergestellt und die darin enthaltenen Strep-TPD52-Proteine immunochemisch nachgewiesen. Die zur Proteintransduktion eingesetzten Zellkulturüberstände wurden ebenfalls auf Strep-TPD52-Proteine überprüft. Hierzu wurde das alte Medium in ein Eppendorfgefäß überführt und bis zur immunchemischen Analyse des verbliebenen Strep-TPD52-Proteingehaltes auf Eis aufbewahrt. Die Zellen wurden mit sterilem 1 x CMF-PBS-Puffer gewaschen und die Zellen unter Verwendung der verschiedenen Extraktionspuffer (A und B) durch mehrmaliges Auf- und Abziehen durch eine 0,5 x 23 mm (*18 gauge*) Kanüle homogenisiert. Die Zelllysate wurden im Falle des Detergenz-haltigen Puffer durch eine Zentrifugation bei 26 000 *g* für 30 min bei 4 °C im Falle des Detergenz-freien Puffer bei 24 000 *g* für 30 min bei 4 °C in eine partikuläre und eine lösliche Fraktion separiert. Es wurden entweder nur die lösliche oder sowohl die lösliche als auch partikuläre Fraktion einer immunochemischen Analyse – unter Verwendung TPD52-spezifischer Antikörper – unterzogen.

Extraktionspuffer A:	50 mM	Tris/HCl, pH 7,
	5 mM	EDTA, pH 7.5
	300 mM	NaCl
	0,1 % (V/V)	Triton X-100

	100 µM	PMSF
	1 mM	DTT
	1 µM	Pepstatin
	1 µM	Leupeptin
	1 µg/ml	Aprotinin
	2 µg/ml	Sojabohnen-Trypsininhibitor
	3 mM	Benzamidine
Extraktionspuffer B:	20 mM	Tris/HCl, pH 7,5
	1 mM	EDTA, pH 7.5
	100 µM	PMSF
	1 µM	Pepstatin
	1 µM	Leupeptin
	1 µg/ml	Aprotinin
	2 µg/ml	Sojabohnen-Trypsininhibitor
	3 mM	Benzamidine

4. Ergebnisse

In vorausgegangenen Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe war unter Verwendung des *Yeast-two-hybrid*-Systems das *tumor protein D52* (TPD52) als Bindungspartner der beiden humanen CCR2-Rezeptorvarianten identifiziert worden. Des Weiteren war gezeigt worden, dass die transiente Koexpression von TPD52 in kultivierten Säugetierzellen die von den CCR2-Rezeptoren vermittelten zellulären Funktionen inhibiert. Unklar blieb bisher, welchen Einfluss TPD52 auf die CCR2-vermittelte Signaltransduktion in Zellen nimmt, die diese Rezeptoren endogen exprimieren. Um dieser Frage nachzugehen, war in weiteren vorausgegangenen Untersuchungen bereits der Versuch unternommen worden, – unter Verwendung der Komponenten des binären bakteriellen C2-Toxins – TPD52 in kultivierte HEK293 und CCR2-endogen-exprimierende Zellen wie z.B. monozytäre THP-1 Zellen einzubringen. Da in diesen Untersuchungen keine adäquaten Mengen an TPD52 in die Zielzellen eingeschleust werden konnten, sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit der Versuch unternommen werden, Zellen mit zuvor gereinigtem TPD52-Protein unter Verwendung des BioPORTER® Reagenz (Gene Therapy Systems, Inc.) zu transduzieren. Dazu sollte (i) die cDNA von TPD52 mit einer Step-kodierenden Sequenz versehen, (ii) die Funktionalität des von dieser cDNA kodierten Proteins mit einem Myc-Epitop-versehenen TPD52 in transient transfizierten COS-7-Zellen verglichen, (iii) das Strep-TPD52-Protein gereinigt und (iv) das gereinigte Protein durch Transduktion in kultivierte Säugetierzellen eingebracht werden. Des Weiteren sollte das Strep-TPD52-Fusionsprotein auf seine Lokalisation und Funktionalität im zellulären System überprüft werden. Die methodische Herangehensweise der vorliegenden Arbeit ist in Abbildung 3 dagestellt.

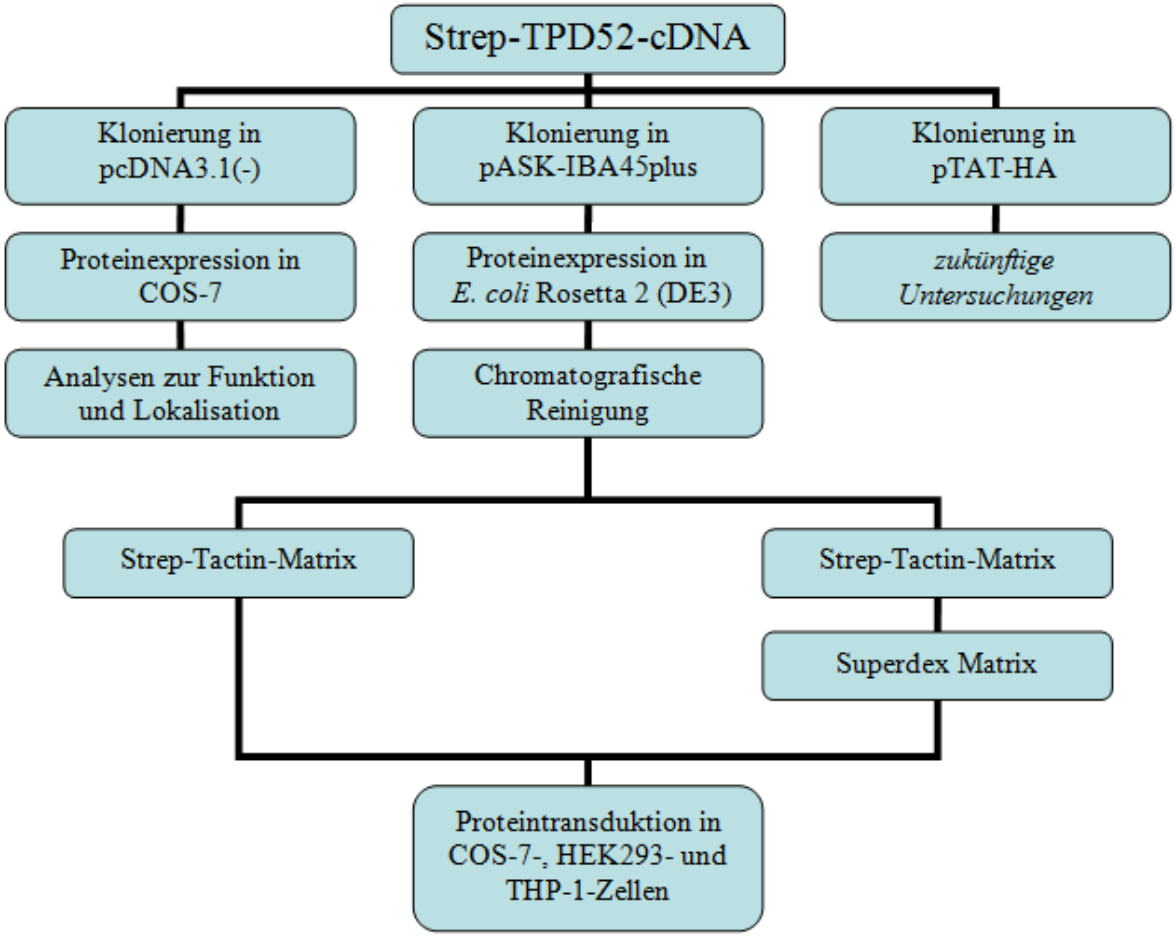


Abb. 3: Schematische Darstellung der in der vorliegenden Arbeit vollzogenen Arbeitsschritte.

4.1 Herstellung von Strep-TPD52-kodierenden cDNAs

4.1.1 Herstellung einer Strep-TPD52-kodierenden cDNA für die bakterielle Expression

Für die bakterielle Proteinexpression wurde ein für das Strep-TPD52-Fusionsprotein kodierendes rekombinantes Plasmid hergestellt. Dazu wurde die TPD52-cDNA zum einen mit Restriktionsenzymschnittstellen für BsaI versehen, die eine Klonierung in den bakteriellen Expressionsvektor pASK-IBA45plus (IBA GmbH) ermöglichte; zum anderen wurde eine Strep-kodierende Aminosäuresequenz (WSHPQFEK) eingebracht. Über diesen Strep-*tag*® kann das generierte Fusionsprotein spezifisch an eine Strep-Tactin®-Matrix binden und das Strep-TPD52-Protein affinitätschromatisch aufgereinigt werden.

4.1.2 Herstellung einer Strep-TPD52-kodierenden cDNA für die Expression in Säugetierzellen

Um zu überprüfen, ob das mit der Strep-*epitope-tag*-kodierenden Sequenz versehene TPD52-cDNA-kodierte Protein sich bei Expression in kultivierten Säugetierzellen nicht

von dem mit Myc-*epitope-tag* versehenen TPD52-Protein unterscheidet, wurde die Strep-TPD52-cDNA in den Expressionsvektor pcDNA3.1(+) transferiert. Dazu wurde die cDNA einschließlich der Strep-kodierenden Sequenz mit den Restriktionsendonukleasen XbaI und HindIII aus dem Expressionsvektor pASK-IBA45plus extrahiert und unter Verwendung der gleichen Restriktionsendonukleasen in pcDNA3.1(+) eingefügt. Die korrekte Orientierung der cDNA wurde durch Sequenzierung überprüft. Anschließend wurde Strep-TPD52 in kultivierten HEK293-Zellen exprimiert, woraufhin die zelluläre Verteilung des Strep-TPD52-Proteins und sein Einfluss auf CCR2-regulierte Funktionen mit denen des Myc-TPD52-Proteins verglichen werden konnte. Für das Myc-TPD52 ist bereits bekannt, dass es sich in seiner Funktionalität nicht vom wildtypischen TPD52 unterscheidet.

4.2. Untersuchungen zur Lokalisation und Funktionalität des Strep-TPD52-Proteins in HEK293-Zellen

4.2.1 Analyse der subzellulären Lokalisation von Strep-TPD52 im Vergleich zu Myc-TPD52 in HEK293-Zellen

Um zu untersuchen, ob sich Strep-TPD52 und Myc-TPD52 in ihrer subzellulären Lokalisation bei Expression in kultivierten HEK293-Zellen unterscheiden, wurden HEK293-Zellen mit Strep-TPD52 und Myc-TPD52-kodierender cDNA transfiziert, die Zellen vierundzwanzig Stunden nach der Transfektion aufgeschlossen und die Zelllysate nach Abtrennung der Kernfraktion in eine lösliche und eine partikuläre Fraktion separiert. Die in Abbildung 4 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass sich Strep-TPD52 und Myc-TPD52 in ihrer Verteilung in der löslichen und partikulären Fraktion nicht unterschieden. So findet sich in beiden Fällen der Hauptanteil des Proteins in der löslichen Fraktion.

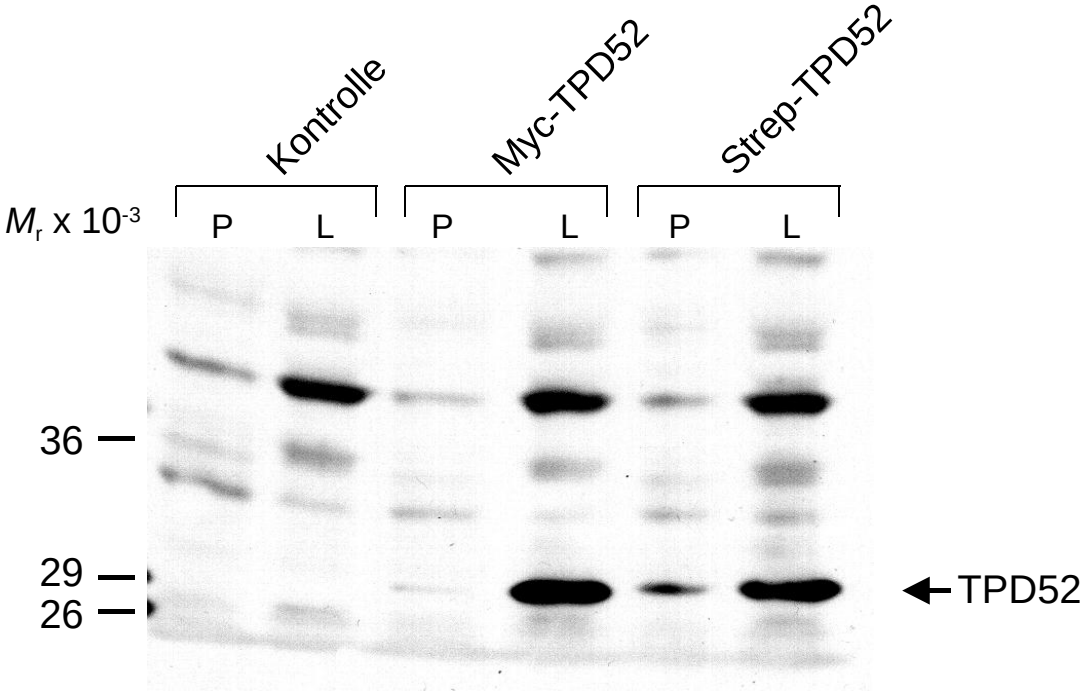


Abb. 4: Expression von *Epitope-tag*-versehenen TPD52-Proteinen in HEK293-Zellen. HEK293-Zellen (2 x 10^6) wurden mit TPD52 (*Myc-TPD52*)- oder Strep-TPD52 (*Strep-TPD52*)-kodierender cDNA (8 µg DNA/Platte) oder entsprechenden Mengen des Leerplasmids pcDNA3.1(+) (**Kontrolle**) transfiziert. Nach 48 Stunden wurden die Zellen geerntet, aufgeschlossen und die Zelllysate in eine partikuläre (**P**) und lösliche (**L**) Fraktion durch differentielle Zentrifugation getrennt. Die in Aliquots dieser Fraktionen enthaltenen Proteine wurden in einem 10 % (m/V) SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulose transferiert und die Proteine immunochemisch unter Verwendung eines TPD52-Antikörpers nachgewiesen. Das nachgewiesene TPD52-Protein ist mit einem Pfeil (←) gekennzeichnet und die Lage der zum Vergleich aufgetrennten Molekulargewichtsstandards ist auf der linken Seite markiert.

4.2.2 Analyse der Funktionalität von Strep-TPD52 im Vergleich zu Myc-TPD52 in HEK293-Zellen

Um auszuschließen, dass das Einbringen des Strep-*tags* am aminoterminalen Ende von TPD52 Auswirkungen auf die Funktionen des Proteins, insbesondere auf die Regulation der CCR2-stimulierten Funktionen durch TPD52 hat, wurde Strep-TPD52 zusammen mit den CCR2-Rezeptoren in HEK293 Zellen exprimiert und die durch CCL2/MCP-1-stimulierte Rezeptor-vermittelte Aktivierung des Transkriptionsfaktors *serum response factor* (SRF) gemessen. Die SRF-abhängige Gentranskription wurde mit Hilfe des *Dual Luciferase® Reporter Assay Systems* untersucht. Dazu wurden die Zellen zusätzlich mit zwei Reporterplasmiden kotransfiziert. Ein Reporterplasmid – pSRE.L (*firefly*) – trägt die cDNA der Luziferase des amerikanischen Glühwürmchens *Photinus pyralis* (*firefly*-Luziferase) unter der Kontrolle des transkriptionellen Regulatorelements SRE.L. SRE.L ist ein Derivat des *serum response element* (SRE) von c-fos, das so verändert wurde, dass es

zwar den Transkriptionsfaktor SRF, aber nicht mehr den *tertiary complex factor* (TCF) binden kann. Somit führt die Bindung von SRF an den Promotor des Reporterplasmids zur Transkription des *firefly*-Luziferase-Gens. Die Expression der *firefly*-Luziferase stellt damit ein Maß für die Aktivität des Transkriptionsfaktors SRF dar. Das zweite Reporterplasmid – pRL-TK – trägt die cDNA der Luziferase der Koralle *Renilla reniformis* (*Renilla*-Luziferase) unter der Kontrolle des Promotors des *Herpes-simplex*-Virus-Thymidinkinasegens (HSV-TK). HSV-TK führt dazu, dass die *Renilla*-Luziferase konstitutiv auf niedrigem Niveau exprimiert wird. Somit stellt die Aktivität der *Renilla*-Luziferase ein Maß für die Transfektionseffizienz dar, anhand derer die für die *firefly*-Luziferase-Aktivität ermittelten Werte korrigiert werden. Die Bestimmung der Reportergenaktivität erfolgte nach den vom Hersteller des Assaysystems gemachten Angaben, durch Messung der Luziferase-Aktivitäten mit dem Luminometer Mithras LB 940 (Berthold Technologies).

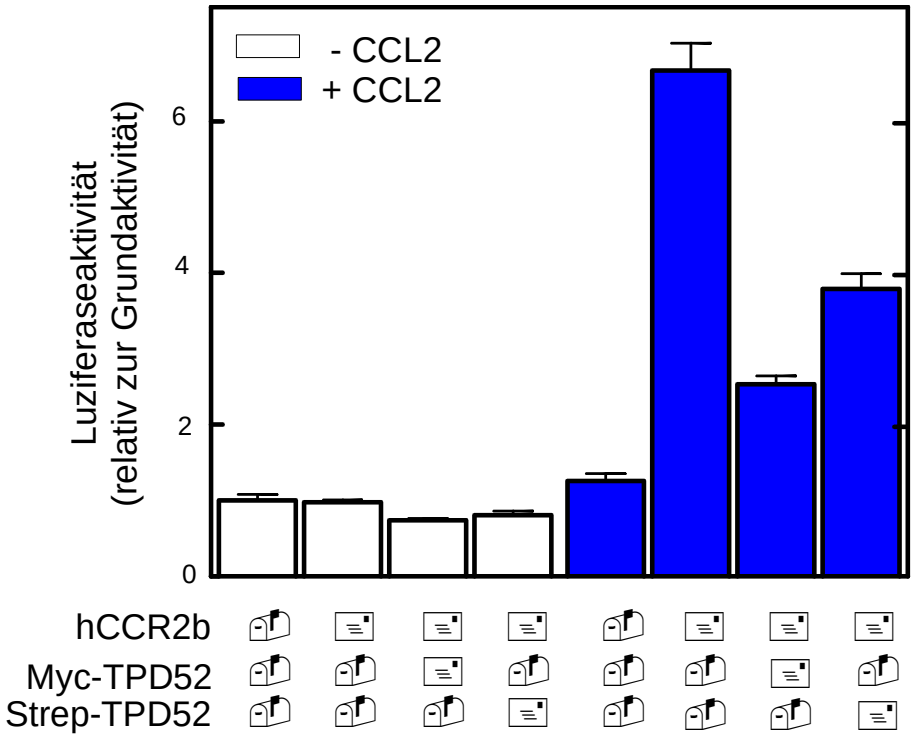


Abb. 5: Einfluss von Strep-TPD52 und Myc-TPD52 auf die CCR2b-induzierte *serum response factor*-abhängige Gentranskription. COS-7-Zellen (4 x 10^4 pro well) wurden mit jeweils 0,03 µg DNA der Reporterplasmide pSRE.L und pRL-TK sowie mit 0,1 µg des Expressionsplasmids Flag-CCR2b-pcDNA3.1(+) oder mit entsprechenden Mengen des Leerplasmids transfiziert. Vierundzwanzig Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen entweder mit CCL2 oder dem entsprechenden Lösungsmittel für 6 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 40 µl pro *well* 1x *passive lysis buffer* aufgeschlossen und in den Lysaten die SRF-abhängige Gentranskription durch Messung der Luziferaseaktivitäten bestimmt. Die in der Abbildung gezeigten Werte entsprechen den Mittelwerten ± Standardabweichungen von Dreifachbestimmungen.

Die in Abbildung 5 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass die Stimulation der hCCR2b-exprimierenden COS-7-Zellen mit CCL2 (50 nM) in einem 6,5-fachen Anstieg der SRF-abhängigen Gentranskription gegenüber jener von Kontrollzellen resultierte. Die Koexpression sowohl von Myc-TPD52 als auch von Strep-TPD52 führte zu einer Inhibition der CCL2-stimulierten CCR2-Rezeptor-vermittelten SRF Aktivität. So wurde bei Expression von Myc-TPD52 eine 52 %-Inhibition und bei Koexpression von Strep-TPD52 eine 76 %-Inhibition der Rezeptorfunktion ermittelt. Diese Ergebnisse zeigen, dass sich Myc-TPD52 und Strep-TPD52 – wenn überhaupt – nur geringfügig in ihrer Eigenschaft unterscheiden, die CCR2-induzierte SRF-Aktivität zu regulieren.

4.3 Optimierung der Proteinexpression von den Strep-TPD52-Fusionsproteinen im bakteriellen Expressionssystem

Nachdem sicher gestellt worden war, dass der Strep-*tag* die Funktionen von TPD52 nicht beeinflusst, sollten die Proteine unter Verwendung des bakteriellen Expressionsvektors (pASK-IBA45plus, Abschnitt 3.2.6) in Bakterien exprimiert und aus den Lysaten gereinigt werden. Zunächst wurden die Expressionsparameter Temperatur und Zeit variiert, um die Bedingungen für eine optimale Produktion von löslichem Strep-TPD52-Protein zu ermitteln. Zahlreiche Untersuchungen zur Expression von heterologen Proteinen im bakteriellen Expressionssystemen haben gezeigt, dass Expressionstemperatur und -dauer einen erheblichen Einfluss auf die Qualität und Quantität der exprimierten Proteine ausüben. Die Expression erfolgte in *E. coli* Rosetta 2 (DE3)-Zellen, da für diese Zellen gezeigt wurde, dass sie auch eine Expression von Proteinen ermöglichen, die keine für die Expression in Bakterien optimierte *codon-usage* aufweisen (Novagen®). Nach Induktion der Proteinexpression mit Anhydrotetrazyklin wurden die Strep-TPD52-Proteine bei verschiedenen Expressionstemperaturen und -zeiten exprimiert (siehe Abb. 6). Die Bakterienzellen wurden durch Sonifizierung aufgeschlossen und das Zelllysat durch Zentrifugation (90 000 *g*) in eine lösliche und partikuläre Fraktion separiert. Ein Aliquot der in den löslichen Fraktionen enthaltenen Proteine wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt und die Proteine entweder mit Coomassie-Brillant-Blau angefärbt oder mittels Immunblotting, unter Verwendung eines Anti-Strep-*tag*® II-Antikörpers, immunchemisch dargestellt (siehe Abb. 6 A und B). Die in Abbildung 6 A dargestellten Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigen, dass ein Protein mit einer dem Strep-TPD52 entsprechenden molekularen Masse (28 kDa) in den Lysaten der mit Anhydrotetrazyklin induzierten Bakterien mit Coomassie-Brillant-Blau angefärbt werden konnte. Entsprechende Proteinbanden wurden unter Verwendung eines Anti-Strep-*tag*®II-Antikörpers in *western blot*-Analysen immunochemisch dargestellt (Abb. 6 B). Als Kontrolle für die *western blot*-Analysen wurde ein mit einem Strep-Epitop-*tag* versehenes Merlin-Proteinfragment eingesetzt. Des Weiteren zeigen die Untersuchungen, dass die mit Anhydrotetrazyklin induzierten Bakterienzellen bei Kultivierung mit 24 °C mehr Strep-haltige Proteine exprimierten als diejenigen, welche bei 16 °C kultiviert worden waren. Die größte Menge an Strep-TPD52-Protein war in den Lysaten der Bakterien nachzuweisen, die nach Induktion für 18 h bei 24 °C kultiviert worden waren. Entsprechend wurden zur Gewinnung größerer Mengen an Strep-TPD52-Protein die Bakterien nach Induktion forthin für 18 h bei 24 °C kultiviert.

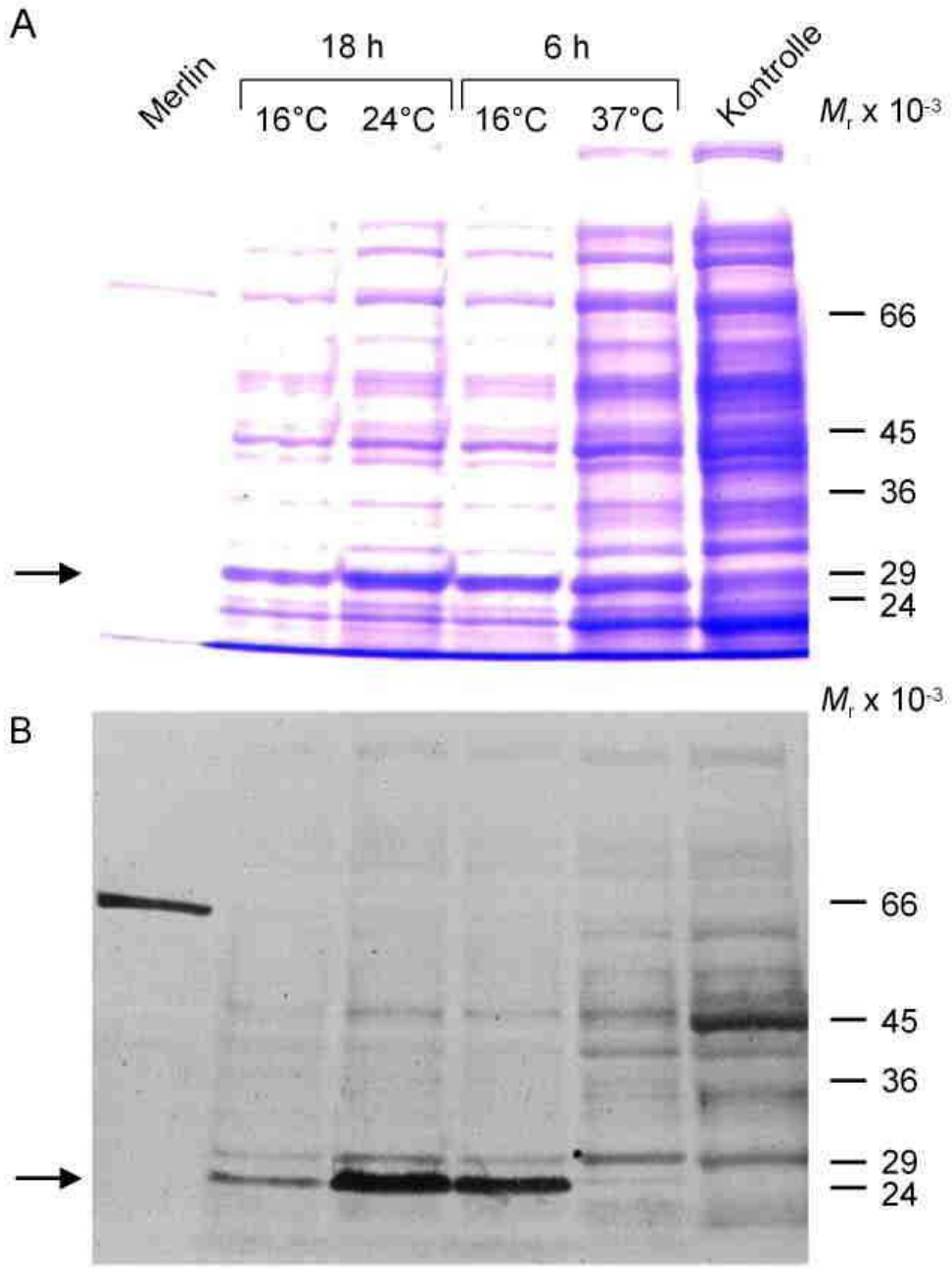


Abb. 6: Temperatur- und zeitabhängiger Verlauf der Strep-TPD52-Expression in *E. coli*. *E. coli* Rosetta 2 (DE3)-Bakterienzellen wurden mit der StrepTPD52-pASK-IBA45plus-cDNA transformiert und nach Erreichen einer OD_{550} von etwa 0,5 mit 0,2 µg/ml Anhydrotetrazyklin zur Induktion der Proteinexpression inkubiert. Die Proteine wurden anschließend für jeweils 6 h bei 24 °C und 37 °C bzw. für jeweils 18 h bei 16 °C und 24 °C exprimiert. Die Bakterien wurden mit Lysispuffer A aufgeschlossen und die Bakterienzelllsysate durch Zentrifugation (90 000 *g*, 1 h, bei 4 °C) in jeweils eine lösliche und partikuläre Fraktion getrennt. Anschließend wurden die in den Aliquots der löslichen Fraktionen enthaltenen Proteine gelelektrophoretisch aufgetrennt und entweder mit Coomassie-Brillant-Blau angefärbt **(A)** oder mittels Immunoblotting – unter Verwendung des Anti-Strep-*tag*® II-Antikörpers – immunochemisch dargestellt **(B).** Ein aus nicht-induzierten Bakterienzellen gewonnenes Proteinlysat diente als Kontrolle (**Kontrolle**). Die spezifische Antikörperreaktion wurde durch Verwendung eines gereinigten Strep-Merlin-Proteins

(**Merlin**) überprüft. Das nachgewiesene TPD52-Protein ist jeweils mit einem Pfeil (→) gekennzeichnet und die Lage der Molekulargewichtsstandards markiert.

4.4 Chromatografische Reinigung des Strep-TPD52-Proteins an einer Strep-Tactin®-Matrix

Als nächstes sollte das Strep-TPD52-Protein unter Verwendung affinitätschromatografischer Methoden aufgereinigt werden. Dabei macht man sich zu Nutze, dass das Strep-*tag*®-tragende Protein hochspezifisch mit der Strep-Tactin®-Matrix (IBA GmbH) interagiert. Für die chromatografische Reinigung und die anschließende Transduktion wurde zunächst ein größerer Ansatz (500 ml) Bakterienkultur zur Produktion des Strep-TPD52-Proteins induziert, die Bakterien aufgeschlossen und die Expression von Strep-TPD52 in der löslichen Fraktion durch *western blot*-Analyse überprüft (Abb. 7).

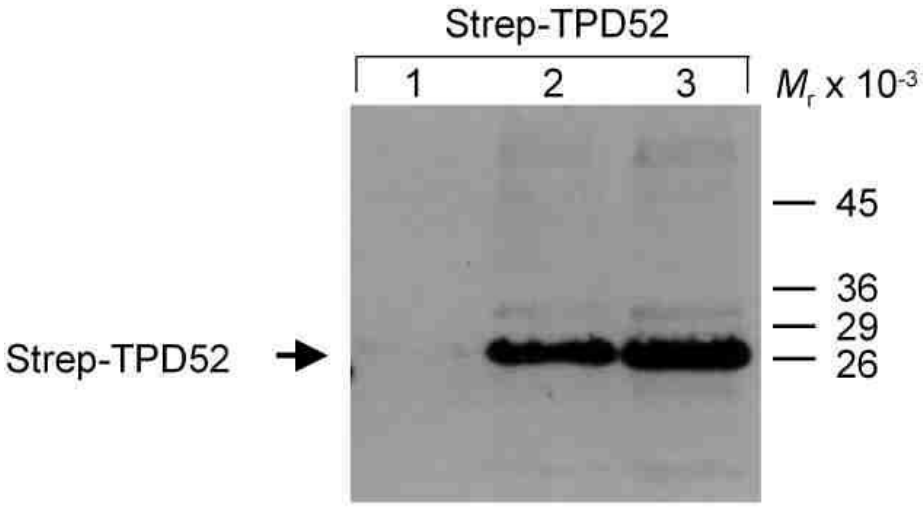
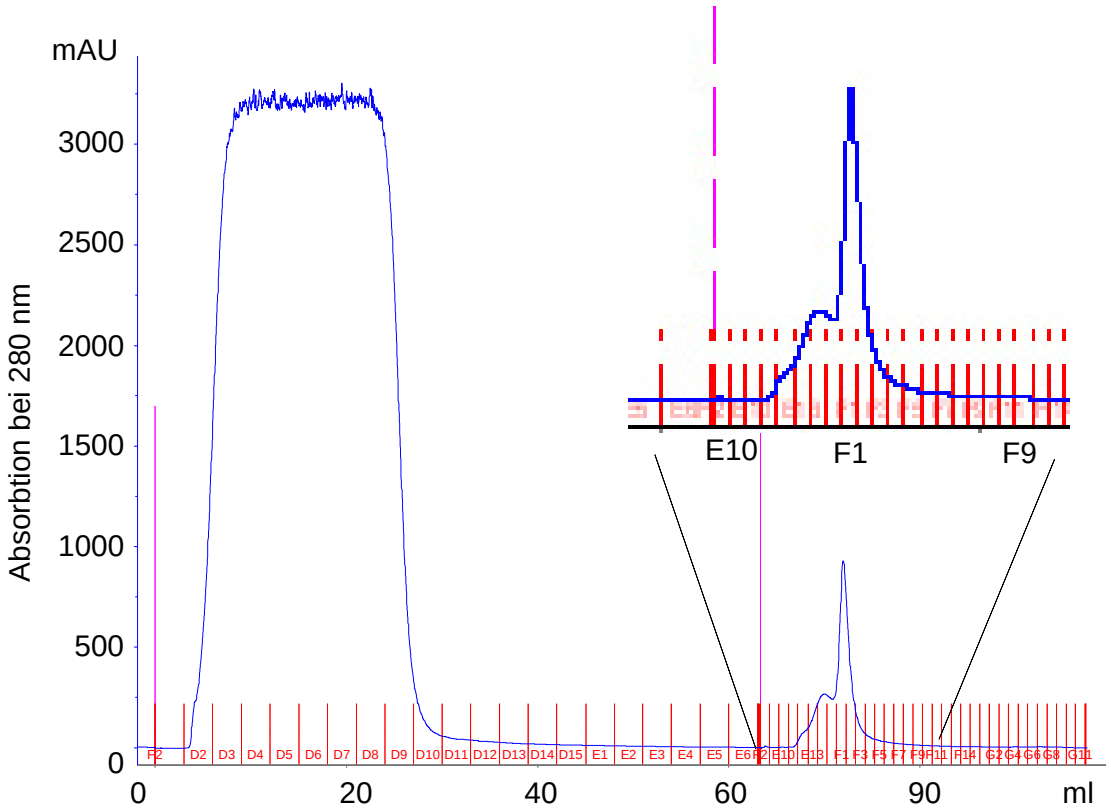


Abb. 7: Expression von Strep-TPD52 in *E. coli*. Das Strep-TPD52-Fusionsprotein wurde für 18 h bei 24 °C wie unter Abschnitt 3.4. beschrieben in *E. coli* exprimiert. Die Bakterien wurden mit dem Lysozym-haltigen Lysispuffer A aufgeschlossen und das Bakterienzelllsysat durch Zentrifugation (90 000 *g*, 1 h, bei 4 °C) in eine lösliche und eine partikuläre Fraktion getrennt. Die in der löslichen Fraktion enthaltenen Proteine wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und mittels Immunoblotting, unter Verwendung des Anti-Strep-*tag*-Antikörpers, immunochemisch dargestellt. Für die proteinbiochemische Analyse wurden unterschiedliche Mengen (0,1 µl [**1**], 0,5 µl [**2**], 1 µl [**3**]) der in der löslichen Fraktion enthaltenen Proteine aufgetrennt. Das nachgewiesene TPD52-Protein ist mit einem Pfeil (→) gekennzeichnet und die Lage der Molekulargewichtsstandards auf der rechten Seite markiert.

Das lösliche Zelllysat wurde mit Avidin (2,04 µg/ml Zelllysat) versetzt und das Strep-TPD52-Protein chromatografisch an einer Strep-Tactin®-Macroprep-Matrix unter Verwendung des ÄKTA™ Explorer 100 (Amersham Pharmacia Biotech) aufgetrennt. Avidin bindet im Zelllysat vorhandenes freies Biotin, welches ebenfalls an der Strep-Tactin®-Macroprep-Matrix binden kann und so das Aufreinigungsergebnis beeinträchtigen könnte. Nach vollständigem Auftrag der Proteinlösung wurde die Säule mit fünf Säulenvolumen Puffer 1 gewaschen, um unspezifisch gebundene Proteine zu entfernen. Spezifisch gebundene Proteine wurden im Anschluss mit drei Säulenvolumen Desthiobiotin-haltigem Elutionspuffer eluiert. Desthiobiotin verdrängt dabei das Strep-haltige Zielprotein aus seiner Bindung an der Matrix. Das Chromatogramm dieser chromatografischen Reinigung ist in Abbildung 8 A dargestellt. Die in den Aliquots der Elutionsgipfel-Fraktionen enthaltenen Proteine wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und entweder mit Coomassie-Brillant-Blau **(**siehe Abb. 8 B**)** angefärbt oder mittels Immunoblotting, unter Verwendung eines Anti-Strep-*tag*-Antikörpers, immunochemisch dargestellt (siehe Abb. 8 C).

A



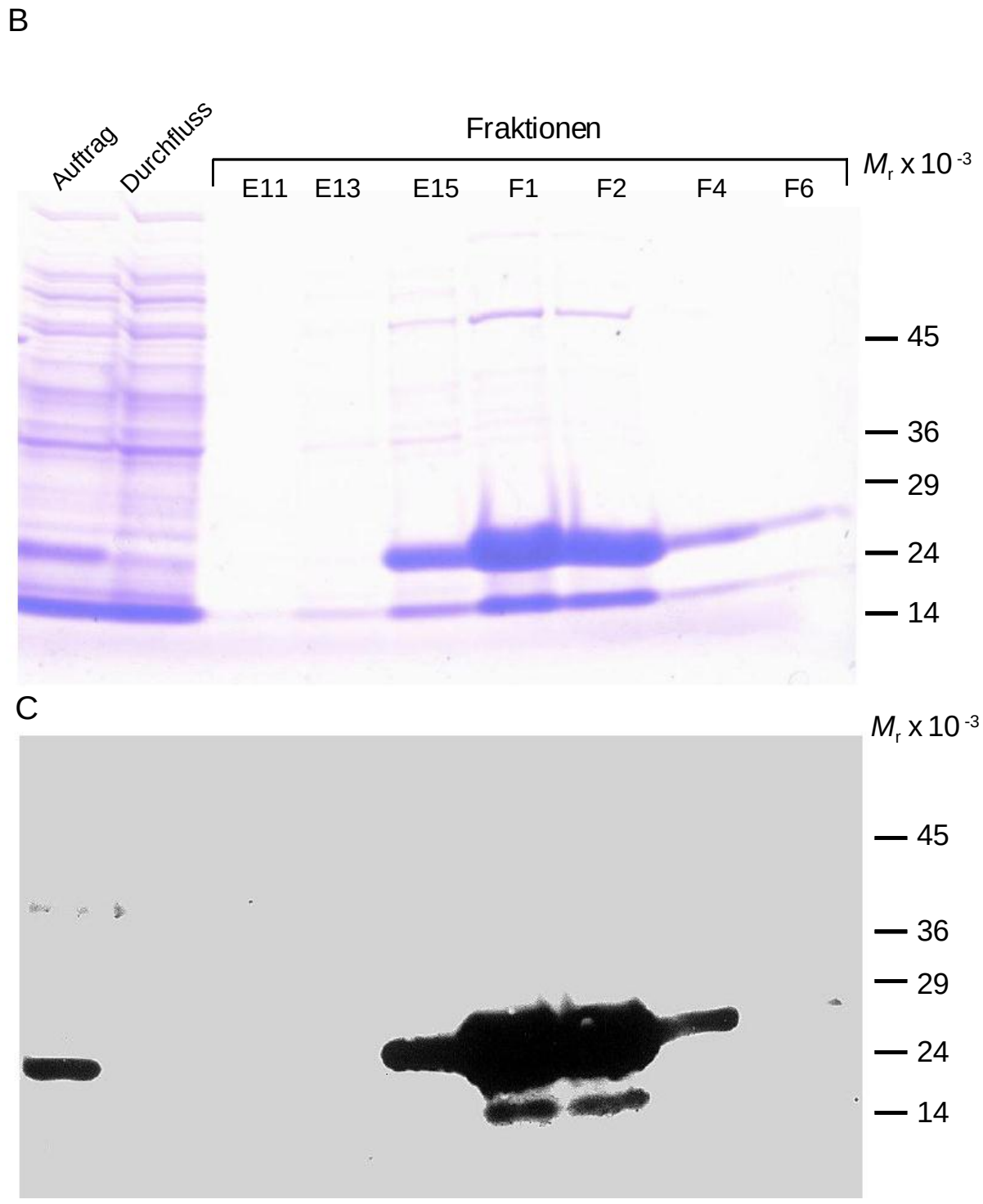


Abb. 8: Isolierung von Strep-TPD52 mittels Affinitätschromatografie an einer Strep-Tactin®-Macroprep-Matrix. Das Strep-TPD52-Fusionsprotein wurde für 18 h bei 24 °C in *E. coli* exprimiert, die Zellen durch Sonifizieren aufgeschlossen und das Bakterienzelllsysat durch Zentrifugation (90 000 *g*, 1 h, bei 4 °C) in eine lösliche und eine partikuläre Fraktion separiert. Dem löslichen Zelllysat wurde 2,04 µg/ml Avidin zugesetzt und die im Zelllysat enthaltenen Strep-TPD52-Proteine an einer Strep-Tactin®-Macroprep-Matrix chromatografisch aufgereinigt (Probenauftrag bei 0 min, Waschen mit 5 Säulenvolumen Puffer 1, Elution mit 3 Säulenvolumen

Desthiobiotin-haltigem Puffer 1, Flussrate von 1 ml/min, Fraktionierung des Durchflusses und der Waschschritte: 3 ml, Fraktionsgröße der Eluate: 1 ml). **(A)** Chromatogramm. Die in einem Aliquot der einzelnen Fraktionen enthaltenen Proteine wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und entweder mit Coomassie-Brillant-Blau angefärbt **(B)** oder mittels Immunoblotting, unter Verwendung eines Anti-Strep-*tag*-Antikörpers, immunochemisch dargestellt **(C).** Ein Aliquot des auf die Säule aufgetragenen Proteins (**Auftrag**) bzw. des nicht an die Säule gebundenen Proteins (**Durchfluss**) wurden zum Vergleich aufgetrennt. Die analysierten Fraktionen sowie die Lage der Molekulargewichtsstandards sind markiert.

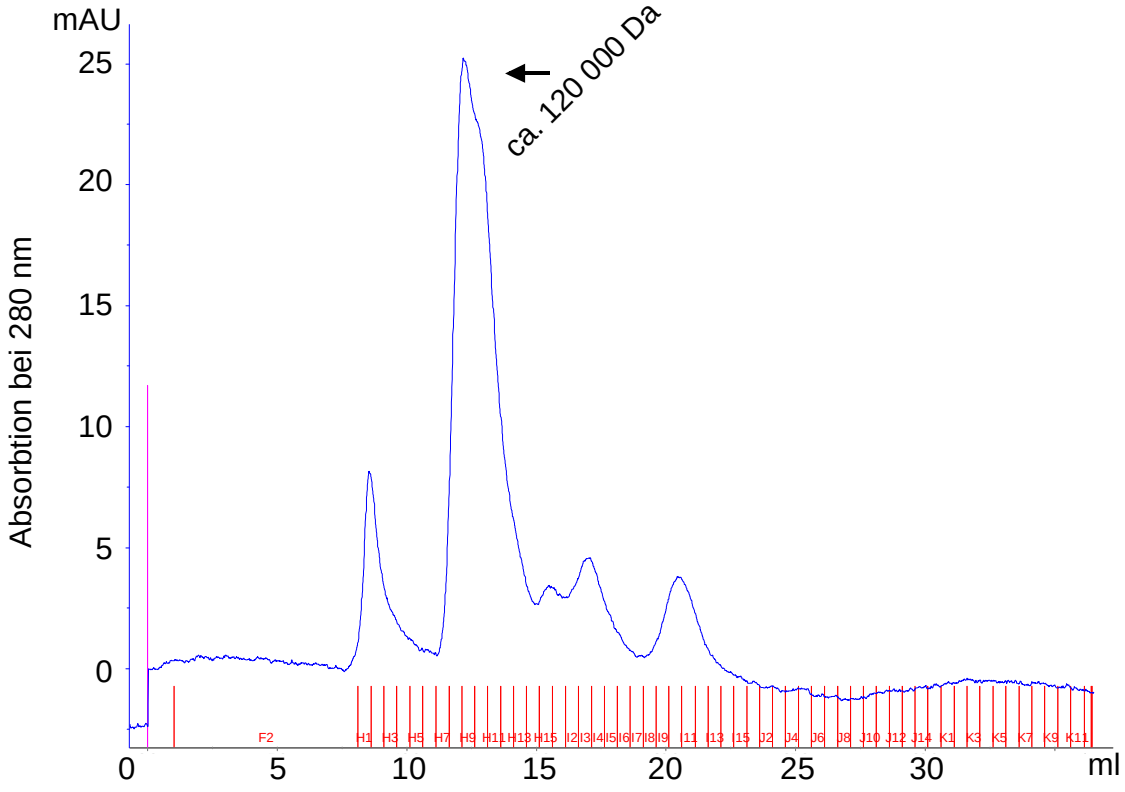
Die in Abbildung 8 A dargestellten Ergebnisse zeigen, dass Strep-TPD52-Proteine unter Verwendung chromatografischer Methoden aus den Bakterienzelllysaten angereinigt werden konnten. Bei Elution der Strep-TPD52-Proteine mit Desthiobiotin-haltigem Puffer 1 von der Strep-Tactin-Matrix wurde ein zweischultriges Elutionsprofil (E10-E14 und E15-F2) beobachtet (Abb. 8 A, vergrößerter Ausschnitt). Die Analyse der Proteine der entsprechenden Fraktionen mittels Coomassie-Brilliant-Blau Färbung (Abb. 8, B) bzw. mittels immunochemischem Nachweis (Abb. 8, C) ergab, dass Strep-TPD52-Proteine mit einer molekularen Masse von *ca.* 28 kDa hauptsächlich in dem zweiten Elutionspeak (Fraktionen E15-F2) nachzuweisen waren. Wie der Vergleich mit dem auf die Säule applizierten Zelllysaten zeigt, konnten Strep-TPD52-Proteine mit hohem Reinheitsgard angereichert werden. So lassen sich neben Strep-TPD52-Proteinen nur wenige hoch- und niedermolekulare Proteine in dem Coomassie-Brilliant-Blau gefärbtem Gel nachweisen. Die Hauptmengen an Strep-TPD52-Proteinen und die geringsten Verunreinigungen mit anderen Proteinen wurden in den Fraktionen F1 und F2 detektiert, daher wurden Aliquots dieser Fraktionen für die weiteren Untersuchungen eingesetzt.

4.5 Chromatografische Reinigung der in der Fraktion F1 enthaltenen Strep-TPD52-Fusionsproteine an einer Superdex 200-Matrix

Um einen noch höheren Reinheitsgrad einer Strep-TPD52-haltigen Proteinlösung für die geplanten Proteintransduktions-Experimente zu erzielen, insbesondere um Proteine mit höheren molekularen Massen zu entfernen, wurden die in Fraktionen F1 und F2 enthaltenen Proteine durch Größenausschlusschromatografie unter Verwendung einer Supedex 200-Matrix (Superdex 200 HR 10/30) weiter säulenchromatografisch aufgereinigt. Das Prinzip der Größenausschlusschromatografie beruht darauf, dass größere Moleküle auf Grund der Beschaffenheit des Matrixmaterials die Säule schneller passieren als kleine Moleküle. Auf diese Weise können Proteine auf Grund ihrer molekularen Massen voneinander getrennt werden. Das in Abbildung 9 dargestellte Chromatogramm zeigt, dass sich mindestens fünf photometrisch unterscheidbare, proteinhaltige Fraktionen

nachweisen ließen. Dabei imponiert die zweite proteinhaltige Fraktion am meisten, was vermuten lässt, dass es sich bei dem angereicherten Protein um das gesuchte Strep-TPD52-Protein handelt. Jedoch war unklar, ob die Strep-TPD52-Proteine als Multimere vorliegen. Für Proteine der TPD52-Familie ist bekannt, dass sie Homo- und Heterodimere bilden können. Die in den Aliquots der Fraktionen H1, H7, H8, H9, H10, H15 und I3 enthaltenen Proteine wurden entweder mit Coomassie-Brillant-Blau **(**siehe Abb. 9 B**)** angefärbt oder gelelektrophoretisch aufgetrennt und mittels Immunoblotting, unter Verwendung eines Anti-Strep-*tag*-Antikörpers immunochemisch dargestellt (siehe Abb. 9 C). Ein Eichlauf zur Größenbestimmung der aufgetrennten Proteine an der Superdex 200-Matrix ist in Abbildung 10 wiedergegeben.

A



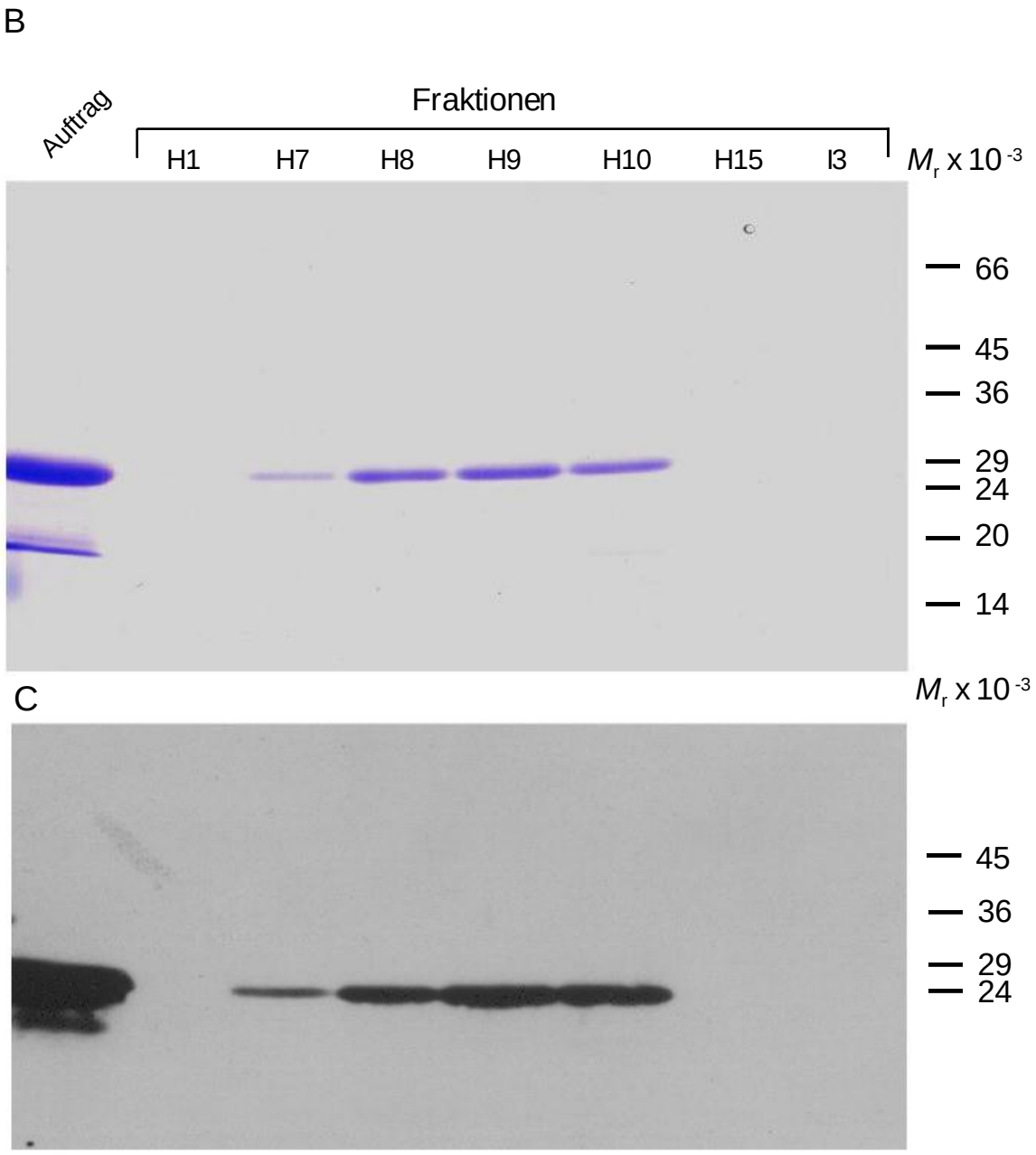


Abb. 9: Aufreinigung von Strep-TPD52-Proteinen mittels Größenausschlusschromatografie an einer Superdex-200 Matrix. Ein Aliquot der an einer Strep-Tactin®-Macroprep-Matrix chromatografisch erhaltenen Fraktion mit dem höchsten Reinheitsgrad an Strep-TPD52-Proteinen (Abb. 8, Fraktion F1) wurde mittels Größenausschlusschromatografie an einer Superdex-200 HR 10/30 Matrix chromatografiert (Probenauftrag bei 0 min, Flussrate von 1 ml/min, Fraktionierung: 1 ml). (100 mM Tris/HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 1mM EDTA, Flussgeschwindigkeit: 0,5 ml/min). **(A)** Chromatogramm. Die mit Hilfe des Eichlaufes (Abb. 10) bestimmte molekulare Masse der Moleküle des größten Elutionspeaks von 120 000 Da wurde mit einem Pfeil markiert (←). Die in Aliquots der verschiedenen Fraktionen enthaltenen Proteine wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und entweder mit Coomassie-Brillant-Blau angefärbt **(B)** oder mittels Imunoblotting, unter Verwendung eines Anti-Strep-*tag*-Antikörpers, immunochemisch dargestellt **(C).** Ein Aliquot des auf die Säule aufgetragenen Proteins (**Auftrag**) wurde zum Vergleich aufgetrennt. Die analysierten Fraktionen sowie die Lage der Molekulargewichtsstandards sind markiert.

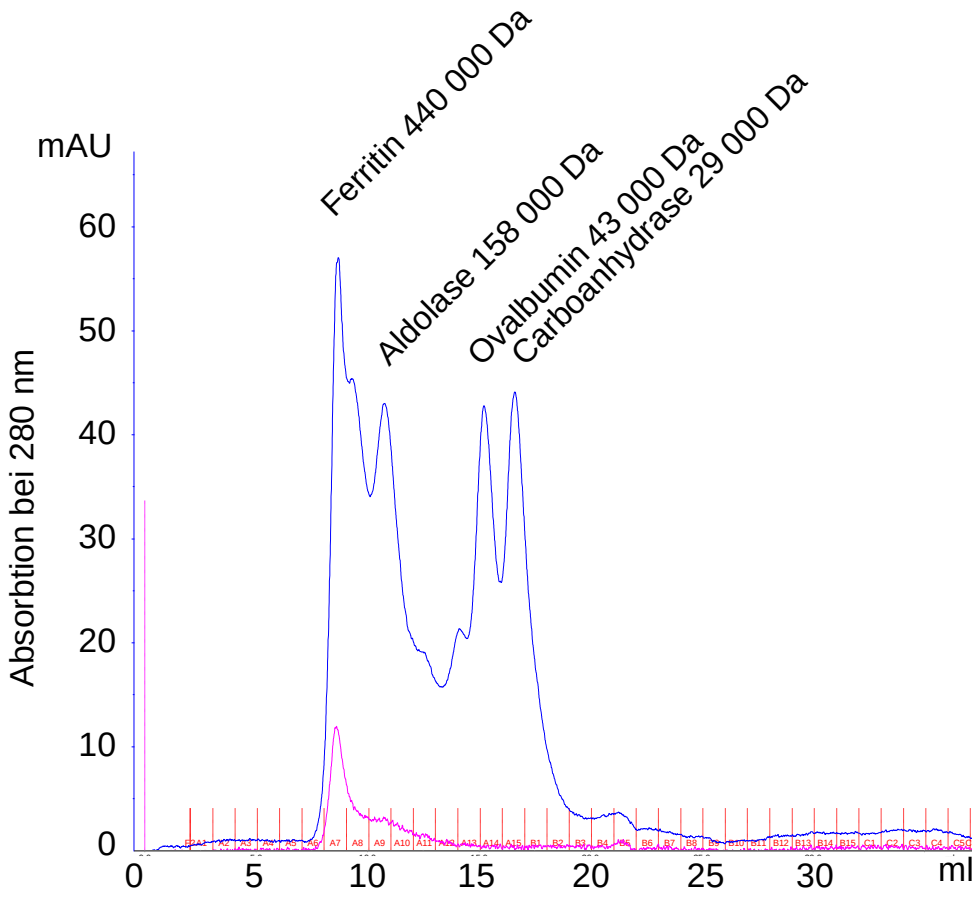


Abb. 10: Eichlauf zur Größenbestimmung von Proteinen nach Auftrennung an einer Superdex-200 Matrix. Ein Gemisch aus Proteinen unterschiedlicher, aber bekannter Größen (Ferritin 440 000 Da, Aldolase 158 000 Da, Ovalbumin 43 000 Da und Carboanhydrase 29 000 Da) wurde mittels Größenausschlusschromatografie an einer Superdex-200 HR 10/30 Matrix chromatografiert (10 mM Tris/HCl pH 7.3, 150 mM NaCl, Flussgeschwindigkeit: 0,5 ml/min). Die Lage und Größe der verwendeten Eichproteine ist eingezeichnet.

Die in Abbildung 9 dargestellten Ergebnisse sowohl der Coomassie-Brillantblau-Färbung (Abb. 9 B) als auch die des immunchemischen Nachweises mit Strep-*tag*-Antikörpern (Abb. 9 C) zeigen, dass sich Strep-TPD52-Proteine mit einer molekularen Masse von *ca.* 28 kDa in den Fraktionen H7-H10 nicht jedoch in den Fraktionen H1, H15 und I3 nachweisen ließen. Ermittelt man die molekulare Masse der eluierten Proteine im Vergleich zu den im Eichlauf aufgetrennten Proteinen (Abb. 10), so ergeben sich Massen von *ca.* 100 000-120 000 Da (Abb. 9 A, siehe Pfeil: ←). Diese Masse würde mit einer Bildung von Homotetrameren übereinstimmen. Die Ergebnisse zeigen somit, dass die Strep-TPD52-Proteine sehr wahrscheinlich als Multimere vorliegen. Proteine mit anderen

molekularen Massen ließen sich in der durch Größenausschlusschromatografie gewonnenen Hauptfraktionen nicht nachweisen. Diese Ergebnisse belegen, dass die in der vorausgegangenen Chromatografie beobachteten Proteinverunreinigungen im nieder- und hochmolekularen Bereich durch diesen zweiten Chromatografieschritt entfernt werden konnten. Die Hauptmenge des gereinigten Strep-TPD52-Proteins wurde in den Fraktionen H8 und H9 detektiert. Aus diesem Grund wurden Aliquots dieser Fraktionen in den Versuchen zur Proteintransduktion von Zellen mit Strep-TPD52-Proteinen eingesetzt.

4.6 Proteintransduktion verschiedener Säugetierzellen mit Strep-TPD52

Da die Proteintransduktion von Strep-TPD52 in kultivierte monozytäre THP-1-Zellen eine besondere Herausforderung darstellt, wurde zunächst der Versuch unternommen, die gewonnenen Strep-TPD52-Proteine in COS-7- bzw. HEK293-Zellen unter Verwendung des BioPORTER® Reagent-Kit (Gene Therapy Systems, Inc.) einzuschleusen. Hierfür wurden die zuvor in Abschnitt 4.4 und 4.5 beschriebenen chromatografisch an der Strep-Tactin®-Matrix bzw. zusätzlich an der Superdex-200 HR 10/30 Matrix gereinigten Proteine verwendet. Die Transduktionseffizienz der unterschiedlich reinen Proteinlösungen sollte auf diese Weise miteinander verglichen werden. Zunächst wurden die Proteinkonzentrationen der in den Chromatografien gewonnen Fraktionen F1 und F2 (Affinitätschromatografie an einer Strep-Tactin®-Matrix, Abb. 8) bzw. H8 und H9 (Affinitäts-chromatografie an einer Strep-Tactin®-Matrix, Abb. 8 + anschließende Größenfraktionierung an der Superdex-200 HR 10/30 Matrix, Abb. 9) ermittelt. Die Gesamtprotein-Konzentrationen der in den Fraktionen enthaltenen Proteine können der Tabelle 12 entnommen werden.

Tab. 12: Gesamtprotein-Konzentrationen der in den Fraktionen F1, F2, H8 und H9 enthaltenen Proteine.

Fraktion	Gesamtprotein-Konzentration [µg/µl]
F1	8,1
F2	5,1
H8	0,41
H9	0,445

Das Prinzip dieser Proteintransduktionsmethode beruht auf einem lipidbasierten Transportmechanismus, bei welchem die BioPORTER®-Reagenz Komplexe mit dem zu transduzierenden Protein bildet, ohne dabei kovalent zu binden. Diese Komplexe, welche in der Lage sind, mit der negativ geladenen Zelloberfläche zu interagieren, können entweder mit der Zellmembran fusionieren und das an ihnen gebundene Ziel-Protein in das Zellzytoplasma abgeben, oder aber endozytotisch aufgenommen werden. Wobei letztere Komplexe jeweils mit den Endosomen fusionieren und das nicht kovalent gebundene Protein ebenfalls in das Zytoplasma der Zellen abgeben können.

4.6.1 Proteintransduktion von COS-7-Zellen mit Strep-TPD52

Um COS-7-Zellen mit Strep-TPD52-Proteinen mittels BioPORTER® Reagenz zu transduzieren, wurden 2 x 10^5 COS-7-Zellen/Vertiefung in einer 12-Loch-Zellkultur-Testplatte ausgesät und nach Angaben des BioPORTER® Reagent-Kit-Herstellers mit gereinigtem Strep-TPD52-Proteinen transduziert. Dazu wurden die COS-7-Zellen der einzelnen Vertiefungen mit jeweils unterschiedlichen Proteinmengen von Strep-TPD52 (a=200 ng Strep-TPD52 oder b=1 µg Strep-TPD52) der Fraktionen F1, F2 bzw. H8 oder H9 transduziert. Die COS-7-Zellen wurden darauf folgend mit Detergenz-haltigem Lysispuffer aufgeschlossen und zentrifugiert. Um zu kontrollieren, ob die Proteintransduktion erfolgreich war, wurden die in den löslichen Fraktionen enthaltenen Proteine gelelektrophoretisch aufgetrennt und mittels Immunoblotting, unter Verwendung eines TPD-Antikörpers, immunochemisch dargestellt (siehe Abb. 11 A). Außerdem wurde überprüft, ob im Überstand der transduzierten Zellen weiterhin Strep-TPD52-Fusionsproteine nachzuweisen waren. Hierfür wurden die in den Überständen der Transduktionsansätze enthaltenen Proteine ebenfalls gelelektrophoretisch aufgetrennt und mittels Immunoblotting und unter Verwendung eines TPD-Antikörpers immunochemisch analysiert (siehe Abb. 11 B). Als Kontrolle der Transduktionseffizienz des BioPORTER® Reagent-Kits wurden COS-7-Zellen unter Verwendung des Kits mit FITC-Protein versetzt. Das gewonnene COS-7-Zelllysat wurde ebenfalls zentrifugiert und aufgeschlossen. Die Überstände wurden mit auf die SDS-Gele aufgetragen (Kontrolle).

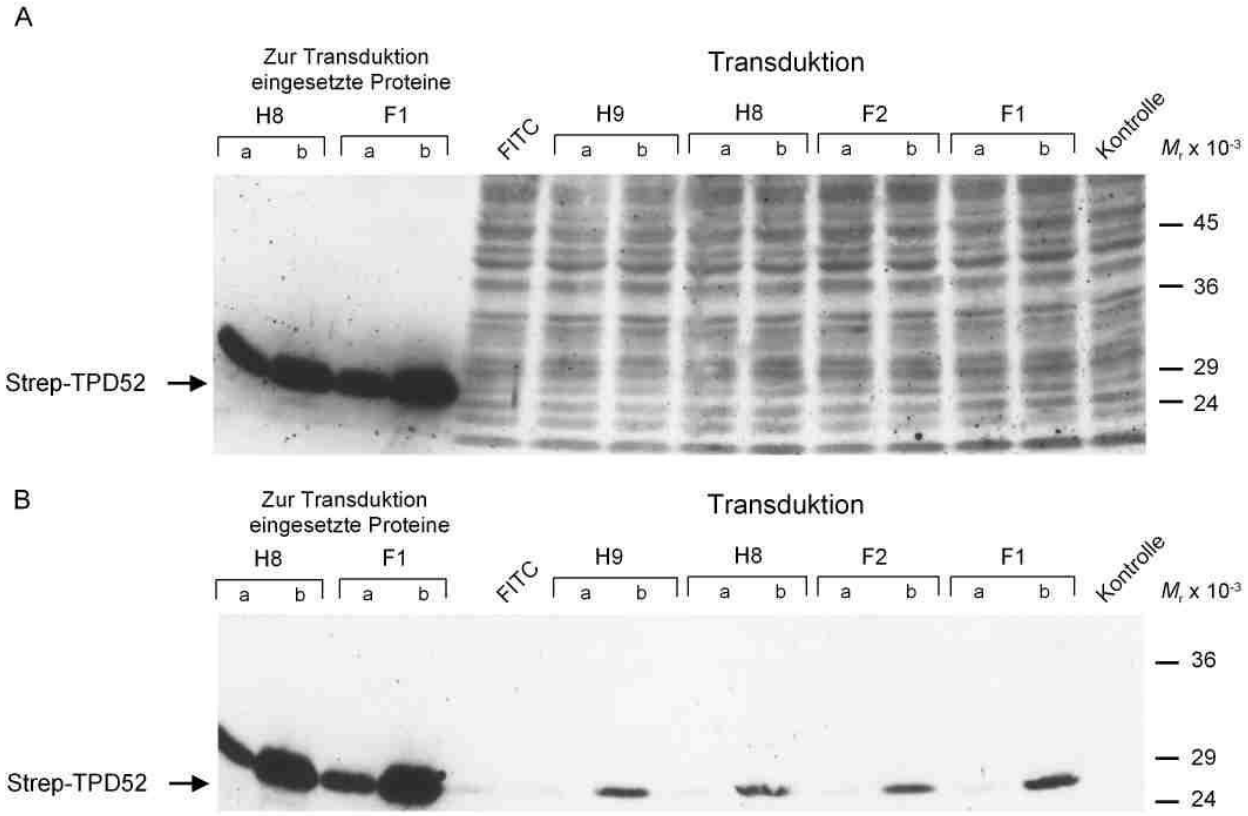


Abb. 11: Proteintransduktion von COS-7-Zellen mit gereinigten Strep-TPD52-Proteinen. COS-7-Zellen (2 x 10^5 pro 12-well) wurden am Vortag ausgesät und 12 h später nach Angaben des BioPORTER® Reagent-Kit-Herstellers mit Strep-TPD52-Protein transduziert. Dazu wurden die COS-7-Zellen der einzelnen Vertiefungen mit jeweils unterschiedlichen Proteinmengen von Strep-TPD52 - 200 ng Strep-TPD52 (a) oder 1 µg Strep-TPD52 (b) der Fraktionen F1, F2 bzw. H8 oder H9 der chromatografischen Läufe 1 und 2 (siehe Abb. 8 und 9) transduziert. Zum Nachweis der Aufnahme des Strep-TPD52-Proteins in die COS-7-Zellen wurden diese mit Detergenz-haltigem Lysispuffer aufgeschlossen und durch Zentrifugation in eine lösliche und partikuläre Fraktion separiert (26 000 *g*, 30 min, 4 °C) (siehe 3.6.2). Die in den löslichen Fraktionen (Abb. 11 A) bzw. in den zur Transduktion verwendeten Überständen (Abb. 11 B) enthaltenen Proteine wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und mittels Immunoblotting, unter Verwendung eines TPD-Antikörpers, immunochemisch dargestellt. Zelllysate von nicht transduzierten COS-7-Zellen dienten als Kontrolle (**Kontrolle**). Des Weiteren wurden entsprechende Aliquots der zur Proteintransduktion eingesetzten gereinigten proteinhaltigen Fraktionen H8 und F1 ebenfalls gelelektrophoretisch aufgetrennt (linke Seite der Abbildung). Als Transduktionseffizienzkontrolle wurden COS-7-Zellen unter Verwendung des BioPORTER® Reagent -Kits mit FITC-Protein versetzt. Die Lage der Molekulargewichtstandards ist jeweils markiert.

Die in Abbildung 11 A dargestellten Ergebnisse der *western blot*-Analysen zeigen, dass sich in den aus den transduzierten COS-7-Zellen gewonnen Zelllysaten keine Strep-TPD52-Proteine nachweisen ließen. Im Gegensatz dazu war in den zur Transduktion eingesetzten Zellkulturüberständen Strep-TPD52-Protein nachzuweisen (siehe Pfeil: ←). Abbauprodukte des Proteins wurden nicht detektiert. In der vom Hersteller empfohlenen

Transduktionseffizienzkontrolle konnten COS-7-Zellen, die das FITC-Protein aufgenommen hatten, mikroskopisch nachgewiesen werden – wenn auch in geringerer Anzahl als erwartet (Daten nicht gezeigt).

4.6.2 Proteintransduktion von HEK293-Zellen mit Strep-TPD52-Proteinen

Nachdem es nicht gelungen war, COS-7-Zellen mit Strep-TPD52-Proteinen zu transduzieren, wurde als nächstes der Versuch unternommen, Strep-TPD52-Proteine in HEK293-Zellen einzubringen. Dazu wurden 2 x 10^6 HEK293 Zellen/Vertiefung in einer 12-Loch-Zellkultur-Testplatte ausgesät und nach Angaben des BioPORTER® Reagent-Kit-Herstellers mit gereinigtem Strep-TPD52-Proteinen transduziert. Die Zellen wurden unter Verwendung des Extraktionspuffers B mechanisch aufgeschlossen und die Zelllysate durch differentielle Zentrifugation in eine lösliche und eine partikuläre Fraktion getrennt. Wie die in Abbildung 12 dargestellten Ergebnisse zeigen, ließen sich keine TPD52-Proteine in der partikulären oder löslichen Fraktion der HEK293-Zelllysate nachweisen. Ein Großteil des zur Proteintransduktion eingesetzten Proteins fand sich jedoch im von den Zellen entfernten Überstand.

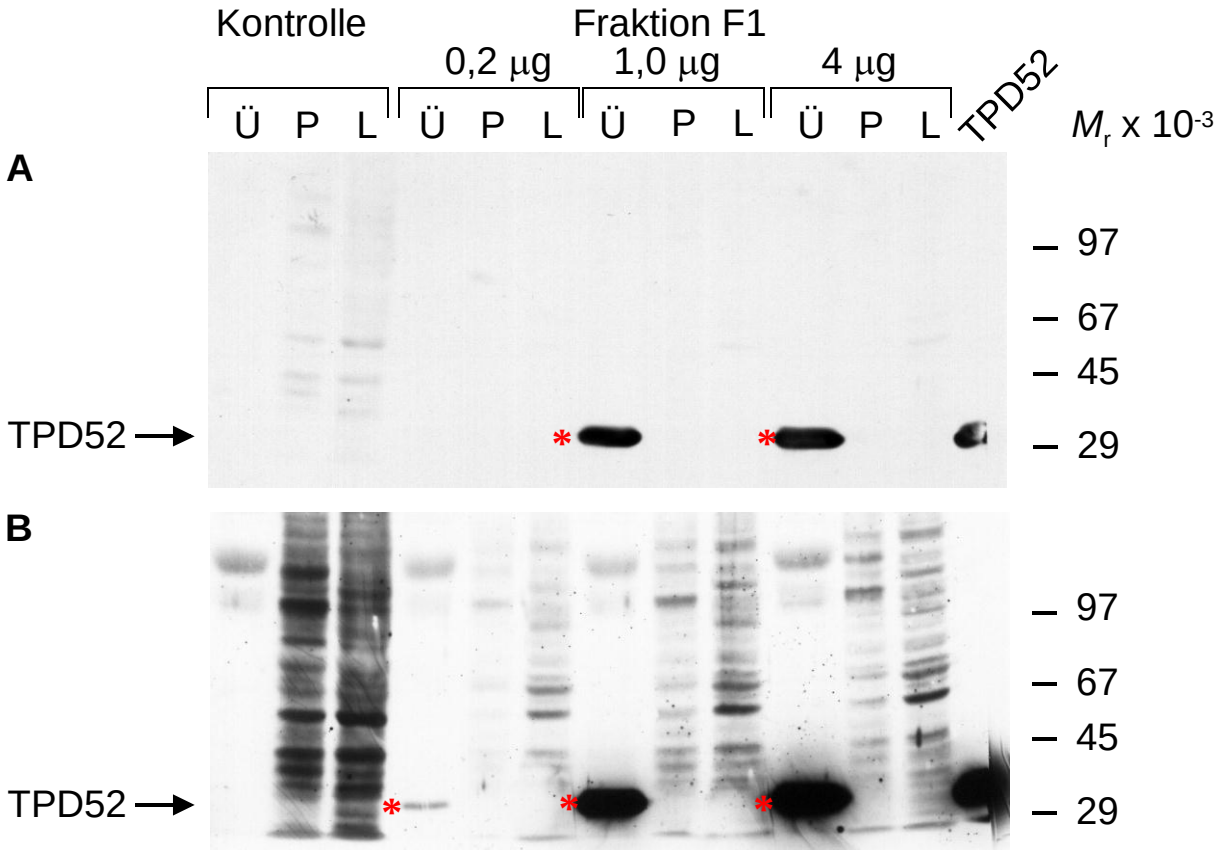


Abb. 12: Proteintransduktion von HEK293-Zellen mit gereinigtem Strep-TPD52-Protein. HEK293-Zellen (2 x 10^6 Zellen per *well* einer 12-Loch-Zellkulturplatte) wurden ausgesät und nach Angaben des BioPORTER® Reagent-Kit-Herstellers mit Strep-TPD52-Protein transduziert. Für die Transduktion wurden 0.2 µg, 1 µg oder 4 µg der Strep-TPD52-Proteine aus der Fraktion F1 der Affinitätschromatografie (Abb. 8) eingesetzt. Zum Nachweis der Aufnahme des Strep-TPD52-Proteins in die HEK293-Zellen wurden letztere mechanisch aufgeschlossen und die so gewonnenen Zelllysate durch Zentrifugation in eine lösliche und partikuläre Fraktion separiert (24 000 *g*, 20 min, 4 °C). Die in den löslichen Fraktionen (L) und partikulären Fraktionen (P) bzw. in den zur Transduktion verwendeten Überständen enthaltenen Proteine (Ü) wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und die Präsenz von TPD52 mittels Immunoblotting, unter Verwendung eines TPD52-Antikörpers, immunochemisch analysiert. Ein Röntgenfilm wurde entweder für 2 min (**A**) oder für 10 min (**B**) exponiert. Des Weiteren wurden Proteine einer zur Proteintransduktion eingesetzten gereinigten proteinhaltigen Fraktion (TPD52) ebenfalls gelelektrophoretisch aufgetrennt (**Kontrolle**). Das nachgewiesene TPD52-Protein ist jeweils mit einem Pfeil (→) gekennzeichnet und die Lage der Molekulargewichtsstandards auf der rechten Seite markiert.

4.6.3 Proteintransduktion von THP-1-Zellen mit Strep-TPD52-Proteinen

Obwohl es nicht gelungen war, COS-7-Zellen oder HEK293-Zellen mit Strep-TPD52-Proteinen zu transduzieren, wurde dennoch der Versuch unternommen, Strep-TPD52-Proteine in monozytäre kultivierte THP-1-Zellen einzuschleusen. Dazu wurden 1 x 10^6 THP-1 Zellen/Vertiefung in einer 12-Loch-Zellkultur-Testplatte ausgesät und nach Angaben des BioPORTER® Reagent-Kit-Herstellers mit gereinigten Strep-TPD52-Proteinen transduziert. Die Zellen wurden unter Verwendung des Extraktionspuffers B mechanisch aufgeschlossen und die Zelllysate durch differentielle Zentrifugation in eine lösliche und eine partikuläre Fraktion getrennt. Wie die in Abb. 13 dargestellten Ergebnisse zeigen, war es auch in diesem Fall nicht möglich, TPD52-Proteine in der partikulären oder löslichen Fraktion der THP-1-Zelllysate nachzuweisen. Im Gegensatz dazu befand sich ein Großteil des zur Proteintransduktion eingesetzten Proteins noch im von den Zellen entfernten Überstand.

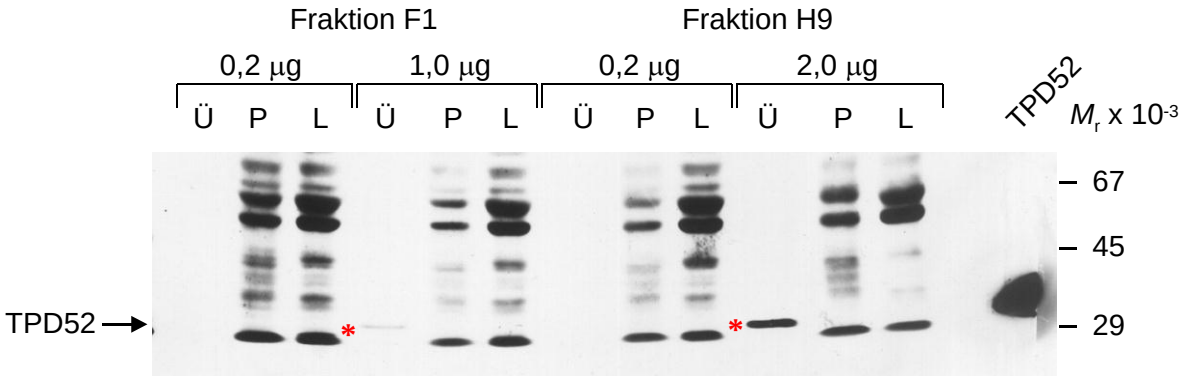


Abb. 13: Proteintransduktion von THP-1-Zellen mit gereinigtem Strep-TPD52-Protein. THP-1-Zellen (1x 10^6 per *well* einer 12-Loch-Zellkulturplatte) wurden ausgesät und nach Angaben des BioPORTER® Reagent-Kit-Herstellers mit Strep-TPD52-Protein transduziert. Für die Transduktion wurden 0.2 µg, 1 µg oder 2 µg der Strep-TPD52-Proteine aus den Fraktionen F1 und H9 der Affinitätschromatografie bzw. der Größenfraktionierung (Abb. 8 und 9) eingesetzt. Zum Nachweis der Aufnahme des Strep-TPD52-Proteins in die THP-1-Zellen wurden letztere mechanisch aufgeschlossen und die so gewonnenen Zelllysate durch Zentrifugation in eine lösliche und partikuläre Fraktion separiert (40 000 *g*, 20 min, 4 °C). Die in den löslichen Fraktionen (L) und partikulären Fraktionen (P) bzw. in den zur Transduktion verwendeten Überständen enthaltenen Proteine (Ü) wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und die Präsenz von TPD52 mittels Immunoblotting, unter Verwendung eines TPD52-Antikörpers, immunochemisch analysiert. Des Weiteren wurden Proteine einer zur Proteintransduktion eingesetzten gereinigten proteinhaltigen Fraktion (TPD52) ebenfalls gelelektrophoretisch aufgetrennt (rechte Seite der Abbildung). Die Lage der Molekulargewichtstandards ist markiert.

4.7 Herstellung einer TAT-HA-TPD52-kodierenden cDNA für die Expression in Säugetierzellen

Um eine weitere Möglichkeit zu haben, gereinigte Proteine durch Proteintransduktion in Zellen einzubringen, wurde TPD52 in den Vektor pTAT-HA kloniert, der die Expression von TPD52 als TAT-Fusionsprotein gestattet. Das von dieser cDNA kodierte Protein trägt darüber hinaus einen His-*tag*, der die Reinigung des Proteins an einer Nickelmatrix ermöglicht und einen HA-*tag* zum späteren Nachweis des gereinigten Proteins. Dazu wurde die cDNA von TPD52 aus dem Vektor pCR2.1 unter Verwendung der Restriktionsendonukleasen KpnI und XhoI extrahiert und in die entsprechenden Stellen in pTAT-HA eingefügt. Die Identifizierung von pTAT-HA Plasmiden mit TPD52-DNA-Insertion mittels Restriktionsanalyse ist in Abbildung 14 dargestellt. Die korrekte Orientierung der DNA wurde durch Sequenzierung überprüft. Die so hergestellte Plasmid-DNA kann nun zur Expression und Reinigung des TAT-HA-TPD52-Proteins herangezogen werden. Eine schematische Darstellung der cDNA dieses Fusionsproteins ist

in Abbildung 15 wiedergegeben. Ob sich THP-1-Zellen mit diesem Fusionsprotein transduzieren lassen, müssen weitere Untersuchungen zeigen.

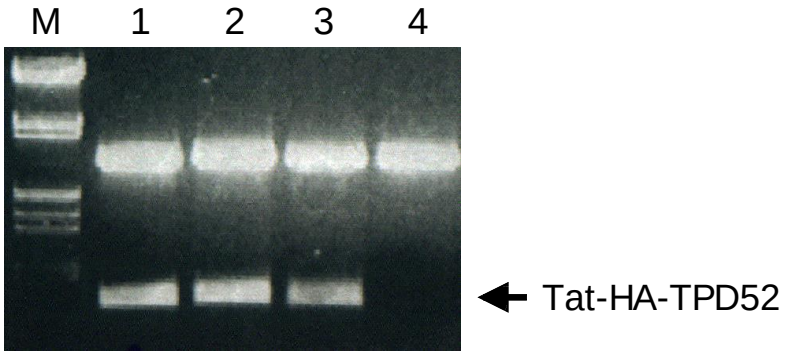


Abb. 14: Restriktionsanalyse von TAT-HA-TPD52-kodierenden Plasmiden. Die Klonierung der TPD52-DNA in das TAT-HA-Plasmid wurde durch Restriktionsanalyse mit KpnI und XhoI überprüft. Die Klone 1-3 wurden als positiv identifiziert (Pfeil: ←).

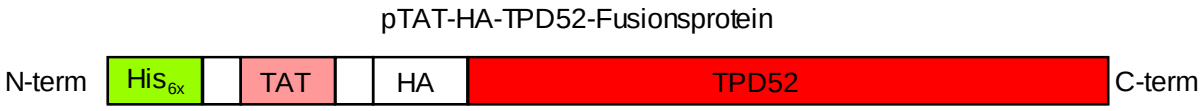


Abb. 15: Schematische Darstellung der cDNA des TAT-HA-TPD52-Fusionsproteins.

5. Diskussion

Das CC-Chemokin MCP-1/CCL2 und seine Rezeptoren CCR2a und CCR2b wurden als zentrale Regulatoren von Leukozyten und deren Funktionen insbesondere von Monozyten/Makrophagen identifiziert. Indem sie die Adhäsion und transendotheliale Migration von Leukozyten kontrollieren, sind sie an der Ausbildung zahlreicher, mit entzündlichen Filtraten-assoziierten Erkrankungen beteiligt wie Atherosklerose, Multipler Sklerose, Rheumatoider Arthritis und Insulin-restistentem Diabetes (Deshmane *et al*., 2009; Niu u. Kolattukudy, 2009). Darüber hinaus liegen zahlreiche Hinweise darauf vor, dass sie auch für die Proliferation und Metastasierung verschiedener Tumore wie Prostata- und Brustkrebskarzinomen von Bedeutung sind (van Golen *et al*., 2008; Lu u. Kang, 2009; Zhang *et al*., 2010a, Zhang *et al*., 2010b). Die Stimulation der Chemokinrezeptoren CCR2a und CCR2b durch MCP-1/CCL2 führt zur Aktivierung zahlreicher intrazellulärer Effektoren, darunter zur Aktivierung von Phospholipase Cβ-Isoenzymen, zur Stimulation von Phosphatidylinositol-3-Kinasen und zu Änderungen der intrazellulären Ca^{2+}-Konzentration (Charo u. Taubman, 2004). Auch auf eine Regulation von RhoGTPasen wie RhoA und Rac durch diese CC-Chemokinrezeptoren liegen Hinweise vor (Hiraoka *et al*., 2004; Terashima *et al*., 2005; van Golen *et al*., 2008; Tanaka *et al*., 2010). Auf diese Weise kann die Stimulation von CCR2a und CCR2b z.B. zu Änderungen in der Organisation des Aktinzytoskeletts und somit zu Zellformänderungen und zur Zellfortbewegung führen (Hiraoka *et al*., 2004; Terashima *et al*., 2005; van Golen *et al*., 2008; Tanaka *et al*., 2010).

Verschiedene Untersuchungen haben Hinweise darauf geliefert, dass CCR2a und CCR2b nicht nur an Pertussistoxin-sensitive G_i-Proteine sondern auch an Pertussistoxin-insensitive G-Proteine der $G\alpha_q$-Familie koppeln (Arai u. Charo, 1996; Kuang *et al*., 1996; Shi *et al.*, 2007, Tian *et al*., 2008). So wurde eine MCP-1/CCL2-abhängige Pertussistoxin-insensitive Aktivierung von PLCβ-Isoenzymen nachgewiesen (Arai u. Charo, 1996; Shi *et al.*, 2007). Zudem konnten die CCL2-vermittelte Aktivierung der p38-MAPK und die CCL-8-induzierte Chemotaxis von primären humanen Monozyten nicht durch Pertussistoxin inhibiert werden (Sozzani *et al.*, 1994; Arai u. Charo, 1996; Cambien *et al.*, 2001). Neuere Untersuchungen der Arbeitsgruppe haben darüberhinaus gezeigt, dass die Stimulation von CCR2a- und CCR2b-heterolog-exprimierenden COS-7-Zellen mit MCP1/CCL2 zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors *serum response factor* (SRF) führt (Dissertation: Julia Schuhholz, 2010). Dabei wurde ermittelt, dass die CCR2 Rezeptoren über Kopplung

an Pertussistoxin-insensitive $G\alpha_q$-Proteine und Aktivierung von Rho-Guaninnukleotid-Austauschfaktoren (RhoGEFs) und RhoAGTPasen die Aktivität des Transkriptionsfaktors SRF regulieren (Dissertation: Julia Schuhholz, 2010). Neben den Analysen zur Kopplung der CCR2 Rezeptoren an heterotrimere G-Proteine, war in den vorausgegangenen Untersuchungen auch nach möglichen Nicht-G-Protein-Interaktionspartnern der CCR2 Rezeptoren gesucht worden. Unter Anwendung des Hefe-*two hybrid*-Systems war mit dem Regulatorprotein Tumorprotein D52 (TPD52) ein neuer Nicht-G-Protein-Interaktionspartner von CCR2a und CCR2b identifiziert worden (Dissertation: Julia Schuhholz, 2010). Bei TPD52 handelt es sich um ein Protein, das auf Grund seiner mRNA-Überexpression in humanen Mamma- und Basalzellkarzinomzellen entdeckt und entsprechend als Tumorprotein D52 bezeichnet wurde (Byrne *et al*., 1995). Das TPD52-Gen liegt auf dem Chromosom 8q21 und kodiert für ein kleines hydrophiles Polypeptid, mit einer Länge von 184 Aminosäuren. Eine abundante mRNA-Expression von TPD52 wurde nicht nur in verschiedensten Tumorzellen, sondern auch in B-Zellen verschiedener Differenzierungsstadien (Chen *et al*., 1996; Tiacci *et al*., 2005) sowie in primären menschlichen Monozyten und in kultivierten monozytären und lymphozytären Zellen nachgewiesen (unveröffentlichte Ergebnisse der Arbeitsgruppe). Für TPD52 und andere Vertreter der TPD52-Proteinfamilie wurde eine Beteiligung an der Ca^{2+}/Calmodulin vermittelten Signalübertragung und der Kontrolle der Organisation des Zytoskeletts sowie eine Funktion bei der Regulation des Vesikeltransports und der Zellproliferation nachgewiesen (Thomas *et al*., 2002; Boutros *et al*., 2003; Wilson *et al*., 2003; Tiacci *et al*., 2005). Dabei interagieren die Mitglieder der TPD52-Proteinfamilie mit Proteinen wie Annexin VI, Syntaxin 1, MAL2 und 14-3-3-Proteinen (Thomas *et al*., 2002; Boutros *et al*., 2003; Wilson *et al*., 2003; Tiacci *et al*., 2005). Weitergehende Untersuchungen der Arbeitsgruppe hatten gezeigt, dass die Koexpression von TPD52 mit den Chemokinrezeptoren CCR2a und CCR2b, zu einer Inhibition der CCL2-induzierten, CCR2a/b-vermittelten Aktivierung von SRF führt (Dissertation: Julia Schuhholz, 2010). Unklar blieb, welchen Einfluss TPD52 auf MCP-1/CCL2-induzierte Rezeptorfunktionen in Rezeptor-endogen-exprimierenden Zellen, wie monozytäre kultivierte THP-1-Zellen hat. Um letzterer Frage nachzugehen, sollte (i) TPD52 in Bakterien exprimiert und aus den bakteriellen Lysaten gereinigt werden und (ii) der Versuch unternommen werden, das gereinigte Protein durch Proteintransduktion unter Verwendung von kationischen Lipiden in monozytäre Zellen einzubringen. Parallel sollte die Funktionalität des zur

Proteinexpression eingesetzten Konstrukts unter Verwendung eines Säugetierexpressionsvektors in intakten Zellen untersucht werden.

Wie die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit gezeigt haben, konnte das humane, mit einem Strep-*tag* versehene TPD52-Protein in Bakterien exprimiert und aus den bakteriellen Lysaten durch Reinigung an einer Strep-Tactin-Matrix® fast homogen chromatografisch dargestellt werden. So wurde in SDS-PAGE- und *western blot*-Analysen fast ausschließlich ein Protein mit einer molekularen Masse von *ca.* 28 kDa nachgewiesen. Der Vorteil der Reinigung von Proteinen mittels Strep-*tag* – einem aus acht Aminosäuren aufgebauten Biotinimitat – liegt nicht nur in der hocheffizienten affinitätschromatografischen Anreicherung des mit dem Strep-*tag*-versehenen Proteins sondern auch darin, dass die Isolierung bei physiologischem pH-Wert und einer Temperatur von 4 °C durchgeführt werden kann (Schmidt u. Skerra, 2007). Dies ist umso wichtiger, da auch schon geringe Abweichungen des pH-Wertes bei der Reinigung die native Struktur des Proteins beeinflussen können. Das Hinzufügen des Strep-*tags* an TPD52 modifiziert zwar die Länge des Proteins, sollte aber auf Grund der geringen Größe kaum Einfluss auf Struktur und Interaktionen mit anderen Proteinen hervorrufen. Von Schmidt und Skerra wurde 2007 gezeigt, dass der Strep-*tag* biologisch innert und stabil gegenüber der Verdauung durch Proteasen ist.

Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen haben charakteristische strukturelle Merkmale des TPD52-Proteins identifiziert; darunter eine aus circa 50 Aminosäuren bestehende *coiled-coil*-Domäne, die eine Homo- und Heterodimerisierung mit anderen Mitgliedern der TPD52-Familie ermöglicht, sowie eine amino-terminal gelegene *polypeptide sequences enriched in proline (P), glutamic acid (G), serine (S) and threonine (T)* (PEST)-Sequenz, die Einfluss auf die Stabilität des Proteins haben könnte (Byrne *et al*., 1996). So gibt es Hinweise darauf, dass Proteine, welche eine PEST-Sequenz enthalten, viel anfälliger gegenüber proteolytischen Prozessen sind (Belizario *et al*., 2008). Obwohl in der vorliegenden Arbeit dem TPD52-Protein amino-terminal ein Strep-*tag* angefügt worden war, erwiesen sich beide – das aus den bakteriellen Lysaten gereinigte Protein und das in Säugetierzellen exprimierte entsprechende Konstrukt – als relativ stabil. So wurden sowohl nach der Aufreinigung an einer Strep-Tactin-Matrix® und Nachweis der gereinigten Proteine in SDS-PAGE mit Coomassie-Brilliantblau-Färbung als auch in *western-blot*-Analysen mit Strep-TPD52-enthaltenden Säugetierzellextrakten nur wenige Abbauprodukte nachgewiesen. Die durchgeführten Größenfraktionierungs-Experimente

haben gezeigt, dass die gereinigten Strep-TPD52-Moleküle nicht als Monomere, sondern sehr wahrscheinlich als Di- bzw. Multimere in der Proteinlösung vorliegen. Bereits 1997 konnte Chen *et al.* zeigen, dass TPD52 *in vitro* auch Di- und Multimere ausbildet. Weitere Untersuchungen ergaben Hinweise darauf, dass die Leucin-Zipper-Domäne (*coiled-coil*-Domäne) und ein nachgeschalteter Abschnitt für eine Multimerisierung von Bedeutung sind (Chen *et al*., 1997, Byrne *et al*., 1998).

Im Rahmen einer vorausgegangenen Masterarbeit war der Versuch unternommen worden, TPD52 als Bestandteil eines C2I-Komponenten-enthaltenden Fusionsproteins unter Verwendung der C2II-Komponente und des Aufnahmemechanismus des binären C2-Toxins von *Clostridium botulinum* (Ohishi *et al.*, 1980; Barth *et al.*, 2000) in Zellen einzuschleusen (Masterarbeit: Sonja Schick, 2008). In Analysen zur Funktionalität des in diesen Untersuchungen eingesetzten Konstrukts wurde in Säugetierzellen beobachtet, dass nur geringe Mengen des Fusionsproteins in den Zellen nachzuweisen waren (Masterarbeit: Sonja Schick, 2008). Es blieb jedoch unklar, ob die gemachte Beobachtung auf eine fehlende Expression oder auf einen erhöhten Abbau des Fusionsproteins, das einen bakteriellen Proteinanteil enthielt, zurückzuführen war (Masterarbeit: Sonja Schick, 2008). Um ähnliches in der vorliegenden Arbeit ausschließen zu können, wurde die in einen Expressionsvektor klonierte Strep-TPD52-cDNA zur Transfektion von Säugetierzellen herangezogen und die Funktionalität des kodierten Proteins überprüft. Wie die an intakten Zellen durchgeführten Untersuchungen der vorliegenden Arbeit gezeigt haben, führte die Koexpression des Strep-TPD52-Proteins zu einer Inhibition der CCL2-induzierten, von den CC-Chemokinrezeptoren CCR2a/b-vermittelten Aktivierung des Transkriptionsfaktors SRF. Ähnliche Ergebnisse wurden bei Koexpression eines Myc-*tag*-versehenen TPD52-Proteins in einem parallel durchgeführten Kontrollversuch erzielt und lagen aus vorausgegangenen Untersuchungen vor (Dissertation: Julia Schuhholz, 2010).

Da die Ergebnisse der vorausgegangenen Untersuchungen der Arbeitsgruppe auf eine Bedeutung von TPD52 für Regulation der CCR2a und CCR2b-Rezeptorfunktionen hindeuten und darüber hinaus bekannt ist, dass diese Rezeptoren eine wichtige Rolle für Funktionen monozytärer Zellen spielen, war das Hauptziel der Arbeit, die Funktionen von TPD52 in der kultivierten monozytären humanen Zelllinie THP-1, z.B. durch Überexpression, zu analysieren. Da sich monozytäre THP-1-Zellen gegenüber der Transfektion mit herkömmlichen Transfektionsmethoden wie Elektroporation und Lipofektion sehr resistent gezeigt hatten (unveröffentliche Ergebnisse der Arbeitsgruppe),

sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit der Versuch unternommen werden, das gereinigte Strep-TPD52-Protein durch Proteintransduktion in die Zellen einzubringen. Für die Proteintransduktion sollte das BioPORTER® Reagenz (Gene Therapy Systems, Inc.) eingesetzt werden.

In den vorausgegangenen Jahren sind verschiedene Verfahren etabliert worden, um Proteine durch Proteintransduktion in Zellen einzuschleusen. Neben der Elektroporation, der Mikroinjektion oder Verfahren, die mit viralen Fusionsproteinen arbeiten, gibt es Methoden, bei denen kationische Lipide zum Einsatz kommen (Schwarze *et al*., 2000; Wadia u. Dowdy, 2002; Kabouridis 2003). Die Proteintransduktion mittels Elektroporation, ein Verfahren bei dem die Proteine durch Permeabilisierung der Zellmembran in die Zelle eingeschleust werden, hat den großen Nachteil, dass sie zu einer hohen Sterblichkeit der Zellen führt, welche dem elektrischen Feld ausgesetzt wurden. Außerdem wird bei Anwendung dieses Verfahrens nur eine relativ geringe Transduktionseffizienz beobachtet (Marrero *et al*., 1995; Fenton *et al*., 1998; Nolkrantz *et al*., 2002; Rui *et al*., 2002). Das Prinzip der Mikroinjektion beruht – wie der Name schon vermuten lässt – auf einer Injektion von Proteinen oder DNA direkt ins Zytosol oder sogar den Zellkern der Zelle. Eine Mikroinjektion rekombinanter Proteine hat also den Vorteil, dass das gewünschte Protein direkt an die gewünschte Position gebracht werden kann. Allerdings ist das Verfahren apparativ relativ aufwendig und nur wenige Zellen können transduziert werden (Abarzúa *et al*., 1995; Zelphati *et al*., 2001; Theiss u. Meller, 2002; Narayanan *et al*., 2003). Für verschiedene virale Proteine wurde gezeigt, dass sie Protein-Transduktions-Domänen (PTD) enthalten, die eine Membranpassage der Proteine ermöglichen (Frankel u. Pabo, 1988; Mann u. Frankel, 1991; Elliot u. O´Hare, 1997, Becker-Hapak *et al*., 2001). Zu den Bekanntesten zählen das Tat-Protein des humanen Retrovirus 1 (HIV-1) sowie der vom humanen Herpes simplex 1 Virus kodierte Transkriptionsfaktor VP22 (Elliot und O´Hare, 1997; Schwarze u. Dowdy, 2000; Brooks *et al*., 2005). Auch der in Drosophila identifizierte Transkriptionsfaktor ANTP trägt eine PTD. Fusionsproteine bestehend aus den PTD-Abschnitten und Zielproteinen konnten erfolgreich in Zellen eingebracht werden (Joliot *et al*., 1993; Fawell *et al*., 1994; Derossi *et al*., 1996; Schwarze u. Dowdy, 2000). Das Einbringen von gereinigten Proteinen in Zielzellen durch Proteintransduktion ist nicht nur für die Grundlagenforschung von Interesse, sondern hat auch für die Entwicklung von neuen therapeutischen Ansätzen als Alternative zur Gentherapie eine Bedeutung (Noguchi u. Matsumoto, 2006; Sawant u. Torchilin, 2010). So konnte ein TAT-Neuroglobulin-Fusionsprotein nicht nur erfolgreich

in das Gehirn von Mäusen eingebracht werden, sondern diese Mäuse zeigten sich durch das Neuroglobulin weniger anfällig gegenüber einer fokalen zerebralen Ischämie (Cai *et al*., 2011).

Kationischen Lipide können mit DNA, aber auch mit Proteinen Komplexe bilden, welche über die Plasmamembran der Zelle aufgenommen werden. Inzwischen gibt es eine enorme Anzahl kationischer Lipide, die Anwendung in der Transfektion und Transduktion von Zellen mit DNA und Proteinen finden (Zelphati *et al*., 2001). Um Proteine auf diese Weise in Zellen einzuschleusen, wird in der Regel eine möglichst reine Proteinlösung benötigt. Um eine einfache chromatografische Reinigung des gewünschten Proteins z.B. mittels Affinitätschromatografie zu ermöglichen, werden die Proteine häufig mit Epitop-*tags* wie Strep- oder His-*tags* versehen. Jedoch ist zu berücksichtigen, dass die *tags* auch Auswirkungen auf die Proteineigenschaften und Interaktionen des Proteins mit gleichen oder anderen Molekülen haben können (Skerra u. Schmidt, 1999; Skerra u. Schmidt, 2000; Terpe, 2003; Junttila *et al*., 2005; Zhao *et al*., 2010). Ob ein Protein mittels kationischer Lipide in eine Zelle transduziert werden kann, hängt insbesondere von dessen physikalischen Eigenschaften, wie Ladung und Hydrophobizität, ab. Demzufolge ist diese Methode nicht für alle Proteine geeignet.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde eine auf kationischen Lipiden basierende Proteintransduktions-Methode ausgewählt, um das Strep-TPD52-Protein zunächst in COS-7-Zellen einzuschleusen. Das Prinzip der Proteintransduktion mit kationischen Lipiden beruht darauf, dass das gereinigte Protein mit der Mixtur aus kationischen Lipiden Protein-Lipid-Komplexe ausbildet, die dann bei Zusatz zu den Zellen mit der Zellmembran fusionieren. Auf diese Weise wird das Protein dann ins Zytoplasma entlassen, oder aber endozytotisch aufgenommen. Die endozytotisch aufgenommen Membranvesikel fusionieren mit Endosomen und geben das nicht kovalent gebundene Protein später ebenfalls in das Zytoplasma der Zellen ab. In der vorliegenden Arbeit wurde das BioPORTER® Reagent-Kit (Gene Therapy Systems, Inc.) verwendet. Nach Angaben der BioPORTER®-Reagenz-Hersteller konnten mit dieser Reagenz bereits verschiedene Zellen mit ß-Galaktosidase, FITC-gekoppelte Antikörper, Caspase-3, Granzyme B und diversen anderen Proteinen transduziert werden (Anantharam *et al*., 2002; Cheng *et al*., 2005; Zassler *et al*., 2005; Fernando *et al*., 2006; Casciola-Rosen *et al*., 2007; Murakami *et al*., 2007; sowie Angaben des Herstellers, Gene Therapy Systems, Inc.). Laut Herstellerangaben konnte selbst das Fusionsprotein Phycoerythrin-BSA mit einer

molekularen Masse von 240 kDa erfolgreich transduziert werden. Eine erfolgreiche Proteintransduktion wurde für kultivierte lymphoblastoide Jurkat T-Zellen (Zelpathi *et al*., 2001; Azuma *et al*., 2007), für NIH3T3 und CV-1 Fibroblasten (Zelpathi *et al*., 2001) und für Zellen mit epithelialem Charakter wie COS-1, COS-7, HEK293, HeLa, BHK-21, MDCK, CHO-K1, B16-F0, HepG2, P19 (Zelpathi *et al*., 2001; Zheng *et al*., 2003; Clarke *et al*., 2003; Collins u. Clegg, 2004; Braun *et al*., 2005; Fortugno *et al*., 2005) gezeigt. Über die Transduzierbarkeit von monozytären Zellen mit dem BioPORTER®-Reagenz lagen zu Beginn der Arbeit keine Hinweise vor.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Versuch unternommen, gereinigtes Strep-TPD52-Protein unter Verwendung des BioPORTER®-Reagenz in verschiedene Zelltypen (COS-7, HEK293 und THP-1) einzubringen. Jedoch konnte in allen durchgeführten Experimenten, nach Aufschluss der Zellen und Separierung der Zelllysate in partikuläre und lösliche Fraktionen, kein Strep-TPD52-Protein in den Zellfraktionen nachgewiesen werden. Vielmehr befand sich der Hauptanteil des Proteins weiterhin in den, zur Proteintransduktion auf die Zellen gegebenen, Lösungen. Auch die Variation der zur Transduktion eingesetzten Proteinmengen und Proteinreinheit konnte die Transduktionseffizienz nicht erhöhen. Die Ursache für das Fehlschlagen der Proteintransduktion mit dem gereinigten Strep-TPD52 ist unklar. Eine Erklärung könnte darin liegen, dass andere noch in der Proteinlösung befindliche Proteine die Proteintransduktion behinderten. Dagegen spricht, dass auch die in einem weiteren Reinigungsschritt (Größenausschlusschromatografie) gewonnene Strep-TPD52-Proteinlösung mit hohem Reinheitsgrad nicht zur Proteintransduktion der Zellen führte. Eine weitere Erklärung könnte darin zu suchen sein, dass das Strep-TD52 nicht als korrekt gefaltetes Protein vorlag. So könnten die für die Reinigung des Proteins gewählten Bedingungen (z.B. pH-Wert, Pufferbedingungen) zu missgefalteten Proteinen geführt haben. Dies wiederum könnte die Degradation der Proteine fördern. Für den Abbau des Proteins könnte auch die eingangs erwähnte PEST-Sequenz im Protein von Bedeutung sein (Rechsteiner, 1990; Rechsteiner u. Rogers, 1996; Sekhar u. Freeman, 1998, Belizario *et al*., 2008). Gegen eine Proteindegradation spricht, dass das zur Proteintransduktion eingesetzte TPD52-Protein auch nach der Inkubation mit Zellen noch immunochemisch nachgewiesen werden konnte. Die mittels Größenausschlusschromatografie erzielten Ergebnisse lassen darauf schließen, dass das Protein nicht aggregiert sondern als Multimer vorliegt. Jedoch könnte die Multimerisierung ihrerseits das Problem bei der Proteintransduktion darstellen, indem sie durch Maskierung von potentiellen Interaktionsstellen die Bindung von Strep-

TPD52 an die kationischen Lipide verhindert. Da das TPD52-Protein zahlreiche Aminosäuren enthält, die negative Ladung tragen, war vor Beginn der Arbeit davon ausgegangen worden, das TPD52 besonders gut mit den kationischen Lipiden des BioPORTER®-Reagenz interagieren müsste. Jedoch finden sich die genannten Aminosäuren insbesondere in der Region der *coiled-coil*-Domäne, die für die Dimersierung bzw. Multimerisierung von TPD52-Proteinen von Bedeutung ist (Chen *et al*., 1997; Byrne *et al*., 1998).

Eine Möglichkeit gereinigtes TPD52 dennoch in gewünschte Zielzellen, wie monozytäre THP-1 einzubringen, wäre der Einsatz eines weiteren Proteintransduktionsreagenz, wie das *Chariot Protein Delivery* -Reagenz, das auf einem Zell-penetrierenden Peptid basiert. Hierbei wird unter Verwendung des Chariot-Peptids das Zielprotein durch nicht-kovalente Bindung in die Zelle eingebracht und im Anschluss aus der Bindung entlassen (Morris *et al*., 2001; Deshayes *et al*., 2004; Gros *et al*., 2006; Morris *et al*., 2008). Verschiedene Proteine wurden auf diese Weise bereits erfolgreich in Zellen eingeschleust (Gros *et al*., 2006; Wang *et al*., 2008; Zhang *et al*., 2009; Henriques *et al*., 2010). Eine andere Alternative könnte die Herstellung von Tat-TPD52-Fusionsproteinen darstellen. Tat-Fusionsproteine wurden wie bereits ausgeführt zur erfogreichen Proteintransduktion *in vitro* und *in vivo* eingesetzt (Joliot *et al*., 1993; Fawell *et al*., 1994; Derossi *et al*., 1996; Schwarze u. Dowdy, 2000, Harada *et al*., 2002; Noguchi u. Matsumoto, 2006; Rapoport *et al.*, 2009; Cai *et al.*, 2011; Uchida *et al.*, 2011). Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführte Klonierung der Tat-TPD52-kodierenden cDNA hat dazu die nötige Voraussetzung geschaffen.

6. Zusammenfassung

Die zu der Gruppe der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren zählenden humanen CC-Chemokinrezeptoren CCR2a und CCR2b, sind als zentrale Regulatoren der Funktionen von Leukozyten, Endothel- und glatten Gefäßmuskelzellen maßgeblich an der Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen, insbesondere der Artherosklerose, beteiligt. Zahlreiche Untersuchungen zur Signalübertragung der CCR2-Rezeptoren weisen auf eine Kopplung der Rezeptoren sowohl an Pertussistoxin-sensitive G_i-Proteine als auch Pertussitoxin-insensitive G_q-Proteine hin. Darüber hinaus wurde in vorausgegangen Untersuchungen der Arbeitsgruppe mit Tumorprotein D52 (TPD52) ein Nicht-G-Protein-Interaktionspartner der CCR2 Rezeptoren identifiziert. TPD52 erhielt seinen Namen auf Grund der Überexpression seiner RNA in verschiedenen Tumoren. Obwohl die Bedeutung von TPD52 für zelluläre Funktionen noch nicht eindeutig geklärt ist, liegen verschiedene Hinweise darauf vor, dass TPD52 an der Ca^{2+}/Calmodulin-vermittelten Signaltransduktion, an der Regulation des Zellzyklus, der Apoptose und des zellulären Vesikeltransports beteiligt ist. Von der Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass TPD52 verschiedene CCR2/$G\alpha_q$-induzierte zelluläre Funktionen, darunter die Stimulation von Phospholipase Cβ-Isoenzymen und die Aktivierung des Transkriptionsfaktors *serum response factor* (SRF) in transient transfizierten Säugetierzellen, wie COS-7- und HEK293-Zellen inhibiert. Über eine mögliche regulatorische Funktion von TPD52 für die CCR2-Rezeptor-vermittelte Signaltransduktion in monozytären Säugetierzellen wie THP-1 ist nichts bekannt.

Da sich die Transfektion von THP-1-Zellen als schwierig und mit geringer Effizienz erwiesen hatte, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit der Versuch unternommen, gereinigtes TPD52-Protein in verschiedene Säugetierzellen, darunter COS-7-, HEK293- und THP-1-Zellen durch Proteintransduktion unter Verwendung von kationischen Lipiden (BioPORTER®-Reagenz) einzubringen. Dazu wurde eine Strep-Epitop-*tag*-TPD52-kodierende DNA generiert und die Funktionalität dieses Strep-TPD52-Konstrukts unter Verwendung eines Säugetierexpressionsvektors in intakten Zellen untersucht. Wie die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit gezeigt haben, konnte die Funktionalität des von dieser DNA kodierten Proteins in intakten Zellen bestätigt werden. So führte die Koexpression des Strep-TPD52-Proteins zu einer Inhibition der MCP-1/CCL2-induzierten, von CCR2a- bzw. CCR2b-vermittelten Aktivierung des Transkriptionsfaktors SRF. Analysen zur

subzellulären Lokalisation des Strep-TPD52-Proteins zeigten eine gleichmäßige Verteilung des Proteins in der zytosolischen und membranären Fraktion. Sowohl in Hinblick auf die Funktionalität als auch auf die Lokalisation war ein ähnliches Ergebnis für ein Myc-TPD52-Protein beobachtet worden. Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass der eingeführte Strep-*tag* keinen störenden Einfluss auf das TPD52-Protein hat.

Des Weiteren haben die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass das Strep-TPD52-Protein in Bakterien exprimiert und aus den bakteriellen Lysaten unter Verwendung des Strep-*tags* und chromatografischer Methoden nahezu rein dargestellt werden konnte. Bei diesen Untersuchungen wurde durch Verwendung der Größenausschlusschromatografie darüber hinaus ermittelt, dass das gereinigte Strep-TPD52-Protein als Multimer vorliegt. Mit diesen Untersuchungen konnte ausgeschlossen werden, dass das Protein aggregiert vorliegt. Obwohl alle Voraussetzungen für die Proteintransduktion von Zellen mit Strep-TPD52 gegeben sein sollten, waren die im Rahmen der Arbeit durchgeführten Proteintransduktionsversuche erfolglos. Auch die Variation der zur Transduktion eingesetzten Proteinmengen, der Proteinreinheit und der zu transduzierenden Zellen führte zu keinem positiven Ergebnis. Eine mögliche Erklärung könnte in der Multimerisierung des Strep-TPD52-Proteins liegen, die eine Interaktion des Proteins mit den kationischen Lipiden des BioPORTER®-Reagenz verhindert. Da das Interesse, TPD52-Proteine in Zellen durch Proteintransduktion einzubringen, weiterhin besteht, wurde eine TAT-TPD52-kodierende cDNA generiert. Ob das von dieser cDNA kodierte Protein, basierend auf den Zell-penetrierenden Eigenschaften des TAT-Peptids, erfolgreich in Säugetierzellen eingeschleust werden kann, werden zukünftige Untersuchungen zeigen.

7. Literaturverzeichnis

1. Abarzúa P, LoSardo JE, Gubler ML, Neri A (1995): Microinjection of monoclonal antibody PAb421 into human SW480 colorectal carcinoma cells restores the transcription activation function to mutant p53. Cancer Res 55, 3490-3494.
2. Ahram M, Best CJ, Flaig MJ, Gillespie JW, Leiva IM, Chuaqui RF, Zhou G, Shu H, Duray PH, Linehan WM, Raffeld M, Ornstein DK, Zhao Y, Petricoin EF 3rd, Emmert-Buck MR (2002): Proteomic analysis of human prostate cancer. Mol Carcinog 33, 9-15.
3. Aiello RJ, Bourassa PA, Lindsey S, Weng W, Natoli E, Rollins BJ, Milos PM (1999): Monocyte chemoattractant protein-1 accelerates atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. Arterioscler Thromb Vasc Biol 19, 1518-1525.
4. Anantharam V, Kitazawa M, Wagner J, Kaul S, Kanthasamy AG (2002): Caspase-3-dependent proteolytic cleavage of protein kinase Cdelta is essential for oxidative stress-mediated dopaminergic cell death after exposure to methylcyclopentadienyl manganese tricarbonyl. J Neurosci 22, 1738-1751.
5. Apostolakis S, Amanatidou V, Spandidos DA (2010): Therapeutic implications of chemokine-mediated pathways in atherosclerosis: realistic perspectives and utopias. Acta Pharmacol Sin 31, 1103-1110.
6. Arai H, Charo IF (1996): Differential regulation of G-protein-mediated signaling by chemokine receptors. J Biol Chem 271, 21814-21819.
7. Azuma Y, Kurusu Y, Sato H, Higai K, Matsumoto K (2007): Increased expression of Lewis X and Y antigens on the cell surface and FUT 4 mRNA during granzyme B-induced Jurkat cell apoptosis. Biol Pharm Bull 30, 655-660.
8. Baggiolini M, Dewald B, Moser B (1997): Human chemokines: an update. Annu Rev Immunol 15, 675-705.
9. Baggiolini M (2001): Chemokines in pathology and medicine. J Intern Med 250, 91-104.
10. Baldwin JM (1993): The probable arrangement of the helices in G protein-coupled receptors. EMBO J12, 1693-1703.
11. Baldwin JM (1994): Structure and function of receptors coupled to G proteins. Curr Opin Cell Biol 6, 180-190.
12. Balkwill F (2004): Cancer and the chemokine network. Nat Rev Cancer 4, 540-550.

13. Barlic J, Murphy PM (2007): Chemokine regulation of atherosclerosis. J Leukoc Biol 82, 226-236.
14. Barth H, Blocker D, Behlke J, Bergsma-Schutter W, Brisson A, Benz R, Aktories K (2000): Cellular uptake of Clostridium botulinum C2 toxin requires oligomerization and acidification. J Biol Chem 275, 18704-18711.
15. Bazan JF, Bacon KB, Hardiman G, Wang W, Soo K, Rossi D, Greaves DR, Zlotnik A, Schall TJ (1997): A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif. Nature 385, 640-644.
16. Becker-Hapak M, McAllister SS, Dowdy SF (2001): TAT-mediated protein transduction into mammalian cells. Methods 24, 247-256.
17. Belizario JE, Alves J, Garay-Malpartida M, Occhiucci JM (2008): Coupling caspase cleavage and proteasomal degradation of proteins carrying PEST motif. Curr Protein Pept Sci 9, 210-220.
18. Ben-Baruch A, Xu L, Young PR, Bengali K, Oppenheim JJ, Wang JM (1995): Monocyte chemotactic protein-3 (MCP3) interacts with multiple leukocyte receptors. C-C CKR1, a receptor for macrophage inflammatory protein-1 alpha/Rantes, is also a functional receptor for MCP3. J Biol Chem 270, 22123-22138.
19. Benkirane M, Jin DY, Chun RF, Koup RA, Jeang KT (1997): Mechanism of transdominant inhibition of CCR5-mediated HIV-1 infection by ccr5delta32. J Biol Chem 272, 30603-30606.
20. Bernardini G, Ribatti D, Spinetti G, Morbidelli L, Ziche M, Santoni A, Capogrossi MC, Napolitano M (2003): Analysis of the role of chemokines in angiogenesis. J Immunol Methods 273, 83-101.
21. Best CJ, Leiva IM, Chuaqui RF, Gillespie JW, Duray PH, Murgai M, Zhao Y, Simon R, Kang JJ, Green JE, Bostwick DG, Linehan WM, Emmert-Buck MR (2003): Molecular differentiation of high- and moderate-grade human prostate cancer by cDNA microarray analysis. Diagn Mol Pathol 12, 63-70.
22. Bhattacharjee A, Richards WG, Staunton J, Li C, Monti S, Vasa P, Ladd C, Beheshti J, Bueno R, Gillette M, Loda M, Weber G, Mark EJ, Lander ES, Wong W, Johnson BE, Golub TR, Sugarbaker DJ, Meyerson M (2001): Classification of human lung carcinomas by mRNA expression profiling reveals distinct adenocarcinoma subclasses. Proc Natl Acad Sci U S A 98, 13790-13795.

23. Bockaert J, Pin JP (1999): Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. EMBO J 18, 1723-1729.

24. Boring L, Gosling J, Monteclaro FS, Lusis AJ, Tsou CL, Charo IF (1996): Molecular cloning and functional expression of murine JE (monocyte chemoattractant protein 1) and murine macrophage inflammatory protein 1alpha receptors: evidence for two closely linked C-C chemokine receptors on chromosome 9. J Biol Chem 271, 7551-7558.

25. Boring L, Gosling J, Cleary M, Charo IF (1998): Decreased lesion formation in CCR2-/- mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis. Nature 394, 894-897.

26. Boutros R, Bailey AM, Wilson SH, Byrne JA (2003): Alternative splicing as a mechanism for regulating 14-3-3 binding: interactions between hD53 (TPD52L1) and 14-3-3 proteins. J Mol Biol 332, 675-687.

27. Boutros R, Fanayan S, Shehata M, Byrne JA (2004): The tumor protein D52 family: many pieces, many puzzles. Biochem Biophys Res Commun 325, 1115-1121.

28. Braun A, Pinyol R, Dahlhaus R, Koch D, Fonarev P, Grant BD, Kessels MM, Qualmann B (2005): EHD proteins associate with syndapin I and II and such interactions play a crucial role in endosomal recycling. Mol Biol Cell 16, 3642-3658.

29. Braunersreuther V, Mach F, Steffens S (2007): The specific role of chemokines in atherosclerosis. Thromb Haemost 97, 714-721.

30. Brooks H, Lebleu B, Vivès E (2005): Tat peptide-mediated cellular delivery: back to basics. Adv Drug Deliv Rev 57, 559-577.

31. Buschmann I, Heil M, Jost M, Schaper W (2003): Influence of inflammatory cytokines on arteriogenesis. Microcirculation 10, 371-379.

32. Byrne JA, Tomasetto C, Garnier JM, Rouyer N, Mattei MG, Bellocq JP, Rio MC, Basset P (1995): A screening method to identify genes commonly overexpressed in carcinomas and the identification of a novel complementary DNA sequence. Cancer Res 55, 2896-2903.

33. Byrne JA, Mattei MG, Basset P (1996): Definition of the tumor protein D52 (TPD52) gene family through cloning of D52 homologues in human (hD53) and mouse (mD52). Genomics 35, 523-532.

34. Byrne JA, Nourse CR, Basset P, Gunning P (1998): Identification of homo- and heteromeric interactions between members of the breast carcinoma-associated D52 protein family using the yeast two-hybrid system. Oncogene 16, 873-881.

35. Byrne JA, Balleine RL, Schoenberg Fejzo M, Mercieca J, Chiew YE, Livnat Y, St Heaps L, Peters GB, Byth K, Karlan BY, Slamon DJ, Harnett P, Defazio A (2005): Tumor protein D52 (TPD52) is overexpressed and a gene amplification target in ovarian cancer. Int J Cancer 117, 1049-1054.

36. Byrne JA, Maleki S, Hardy JR, Gloss BS, Murali R, Scurry JP, Fanayan S, Emmanuel C, Hacker NF, Sutherland RL, Defazio A, O'Brien PM (2010): MAL2 and tumor protein D52 (TPD52) are frequently overexpressed in ovarian carcinoma, but differentially associated with histological subtype and patient outcome. BMC Cancer 10, 497 (Abstract).

37. Cai B, Lin Y, Xue XH, Fang L, Wang N, Wu ZY (2011): TAT-mediated delivery of neuroglobin protects against focal cerebral ischemia in mice. Exp Neurol 227, 224-231.

38. Cambien B, Pomeranz M, Millet MA, Rossi B, Schmid-Alliana A (2001): Signal transduction involved in MCP-1-mediated monocytic transendothelial migration. Blood 97, 359-366.

39. Casciola-Rosen L, Garcia-Calvo M, Bull HG, Becker JW, Hines T, Thornberry NA, Rosen A (2006): Mouse and human granzyme B have distinct tetrapeptide specificities and abilities to recruit the bid pathway. J Biol Chem 282, 4545-4552.

40. Charo IF, Myers SJ, Herman A, Franci C, Connolly AJ, Coughlin SR (1994): Molecular cloning and functional expression of two monocyte chemoattractant protein 1 receptors reveals alternative splicing of the carboxyl-terminal tails. Proc Natl Acad Sci U S A 91, 2752-2756.

41. Charo IF, Taubman MB (2004): Chemokines in the pathogenesis of vascular disease. Circ Res 95, 858-866.

42. Charo IF, Ransohoff RM (2006): The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. N Engl J Med 354, 610-621.

43. Chen SL, Maroulakou IG, Green JE, Romano-Spica V, Modi W, Lautenberger J, Bhat NK (1996): Isolation and characterization of a novel gene expressed in multiple cancers. Oncogene 12, 741-751.

44. Chen SL, Zhang XK, Halverson DO, Byeon MK, Schweinfest CW, Ferris DK, Bhat NK (1997): Characterization of human N8 protein. Oncogene 15, 2577-2588.

45. Chen X, Cheung ST, So S, Fan ST, Barry C, Higgins J, Lai KM, Ji J, Dudoit S, Ng IO, Van De Rijn M, Botstein D, Brown PO (2002): Gene expression patterns in human liver cancers. Mol Biol Cell 13, 1929-1939.

46. Cheng H, Grodnitzky JA, Yibchok-anun S, Ding J, Hsu WH (2005): Somatostatin increases phospholipase D activity and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate synthesis in clonal beta cells HIT-T15. Mol Pharmacol 67, 2162-2172.

47. Cherezov V, Rosenbaum DM, Hanson MA, Rasmussen SG, Thian FS, Kobilka TS, Choi HJ, Kuhn P, Weis WI, Kobilka BK, Stevens RC (2007): High-resolution crystal structure of an engineered human beta2-adrenergic G protein-coupled receptor. Science 318, 1258-1265.

48. Chew CS, Chen X, Zhang H, Berg EA, Zhang H (2008): Calcium/calmodulin-dependent phosphorylation of tumor protein D52 on serine residue 136 may be mediated by CAMK2delta6. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 295, 1159-1172.

49. Chien EY, Liu W, Zhao Q, Katritch V, Han GW, Hanson MA, Shi L, Newman AH, Javitch JA, Cherezov V, Stevens RC (2010): Structure of the human dopamine D3 receptor in complex with a D2/D3 selective antagonist. Science 330, 1091-1095.

50. Clarke MC, Savill J, Jones DB, Noble BS, Brown SB (2003): Compartmentalized megakaryocyte death generates functional platelets committed to caspase-independent death. J Cell Biol 160, 577-587.

51. Collins CH, Clegg JS (2004): A small heat-shock protein, p26, from the crustacean Artemia protects mammalian cells (Cos-1) against oxidative damage. Cell Biol Int 28, 449-455.

52. Conductier G, Blondeau N, Guyon A, Nahon JL, Rovère C (2010): The role of monocyte chemoattractant protein MCP1/CCL2 in neuroinflammatory diseases. J Neuroimmunol 224, 93-100.

53. Connor SJ, Paraskevopoulos N, Newman R, Cuan N, Hampartzoumian T, Lloyd AR, Grimm MC (2004): CCR2 expressing CD4+ T lymphocytes are preferentially recruited to the ileum in Crohn's disease. Gut 53, 1287-1294.

54. Coussens LM, Werb Z (2002): Inflammation and cancer. Nature 420, 860-867.

55. Crown SE, Yu Y, Sweeney MD, Leary JA, Handel TM (2006): Heterodimerization of CCR2 chemokines and regulation by glycosaminoglycan binding. J Biol Chem 281, 25438-25446.

56. Cushing SD, Berliner JA, Valente AJ, Territo MC, Navab M, Parhami F, Gerrity R, Schwartz CJ, Fogelman AM (1990): Minimally modified low density lipoprotein induces monocyte chemotactic protein 1 in human endothelial cells and smooth muscle cells. Proc Natl Acad Sci U S A 87, 5134-5138.

57. Cyster JG (1999a): Chemokines and the homing of dendritic cells to the T cell areas of lymphoid organs. J Exp Med 189, 447-450.

58. Cyster JG (1999b): Chemokines and cell migration in secondary lymphoid organs. Science 286, 2098-2102.

59. Derossi D, Calvet S, Trembleau A, Brunissen A, Chassaing G, Prochiantz A (1996): Cell internalization of the third helix of the Antennapedia homeodomain is receptor-independent. J Biol Chem 271, 18188-18193.

60. Deshayes S, Heitz A, Morris MC, Charnet P, Divita G, Heitz F (2004): Insight into the mechanism of internalization of the cell-penetrating carrier peptide Pep-1 through conformational analysis. Biochemistry 43, 1449-1457.

61. Deshmane SL, Kremlev S, Amini S, Sawaya BE (2009): Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. J Interferon Cytokine Res 29, 313-326.

62. El Khoury J, Toft M, Hickman SE, Means TK, Terada K, Geula C, Luster AD (2007): Ccr2 deficiency impairs microglial accumulation and accelerates progression of Alzheimer-like disease. Nat Med 13, 432-438.

63. Elliott G, O'Hare P (1997): Intercellular trafficking and protein delivery by a herpesvirus structural protein. Cell 88, 223-233.

64. Fawell S, Seery J, Daikh Y, Moore C, Chen LL, Pepinsky B, Barsoum J (1994): Tat-mediated delivery of heterologous proteins into cells. Proc Natl Acad Sci U S A 91, 664-668.

65. Fenton M, Bone N, Sinclair AJ (1998): The efficient and rapid import of a peptide into primary B and T lymphocytes and a lymphoblastoid cell line. J Immunol Methods 212, 41-48.

66. Fernando MR, Lechner JM, Löfgren S, Gladyshev VN, Lou MF (2006): Mitochondrial thioltransferase (glutaredoxin 2) has GSH-dependent and thioredoxin reductase-dependent peroxidase activities in vitro and in lens epithelial cells. FASEB J 20, 2645-2647.

67. Fortugno P, Beltrami E, Plescia J, Fontana J, Pradhan D, Marchisio PC, Sessa WC, Altieri DC (2003): Regulation of survivin function by Hsp90. Proc Natl Acad Sci U S A 100, 13791-13796.

68. Frankel AD, Pabo CO (1988): Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus. Cell 55, 1189-1193.

69. Fredriksson R, Lagerström MC, Lundin LG, Schiöth HB (2003): The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. Mol Pharmacol 63, 1256-1272.

70. Furukawa Y, Matsumori A, Ohashi N, Shioi T, Ono K, Harada A, Matsushima K, Sasayama S (1999): Anti-monocyte chemoattractant protein-1/monocyte chemotactic and activating factor antibody inhibits neointimal hyperplasia in injured rat carotid arteries. Circ Res 84, 306-314.

71. Gálvez BG, Genís L, Matías-Román S, Oblander SA, Tryggvason K, Apte SS, Arroyo AG (2004): Membrane type 1-matrix metalloproteinase is regulated by chemokines monocyte-chemoattractant protein-1/ccl2 and interleukin-8/CXCL8 in endothelial cells during angiogenesis. J Biol Chem 280, 1292-1298.

72. Garber ME, Troyanskaya OG, Schluens K, Petersen S, Thaesler Z, Pacyna-Gengelbach M, van de Rijn M, Rosen GD, Perou CM, Whyte RI, Altman RB, Brown PO, Botstein D, Petersen I (2001): Diversity of gene expression in adenocarcinoma of the lung. Proc Natl Acad Sci U S A 98, 13784-13789.

73. Gautier EL, Jakubzick C, Randolph G (2009): Regulation of the migration and survival of monocyte subsets by chemokine receptors and its relevance to atherosclerosis. Arterioscler Thromb Vasc Biol 29, 1412-1418.

74. Gerard C, Rollins BJ (2001): Chemokines and disease. Nat Immunol 2, 108-115.

75. Gong X, Gong W, Kuhns DB, Ben-Baruch A, Howard OM, Wang JM (1997): Monocyte chemotactic protein-2 (MCP-2) uses CCR1 and CCR2B as its functional receptors. J Biol Chem 272, 11682-11685.

76. Graham GJ (2009): D6 and the atypical chemokine receptor family: novel regulators of immune and inflammatory processes. Eur J Immunol 39, 342-351.

77. Grewal IS, Rutledge BJ, Fiorillo JA, Gu L, Gladue RP, Flavell RA, Rollins BJ (1997): Transgenic monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in pancreatic islets produces monocyte-rich insulitis without diabetes: abrogation by a second transgene expressing systemic MCP-1. J Immunol 159, 401-408.

78. Gros E, Deshayes S, Morris MC, Aldrian-Herrada G, Depollier J, Heitz F, Divita G (2006): A non-covalent peptide-based strategy for protein and peptide nucleic acid transduction. Biochim Biophys Acta 1758, 384-393.

79. Harada H, Hiraoka M, Kizaka-Kondoh S (2002): Antitumor effect of TAT-oxygen-dependent degradation-caspase-3 fusion protein specifically stabilized and activated in hypoxic tumor cells. Cancer Res 62, 2013-2018.

80. Hébert TE (2008): Opioid and chemokine receptor heterodimers: arranged marriages or dangerous liaisons? Biochem J 412, 7-9.

81. Henriques ST, Castanho MA, Pattenden LK, Aguilar MI (2010): Fast membrane association is a crucial factor in the peptide pep-1 translocation mechanism: a kinetic study followed by surface plasmon resonance. Biopolymers 94, 314-322.

82. Hiraoka M, Nitta N, Nagai M, Shimokado K, Yoshida M (2004): MCP-1-induced enhancement of THP-1 adhesion to vascular endothelium was modulated by HMG-CoA reductase inhibitor through RhoA GTPase-, but not ERK1/2-dependent pathway. Life Sci 75, 1333-1341.

83. Horuk R (1994): The interleukin-8-receptor family: from chemokines to malaria. Immunol Today 15, 169-174.

84. Imai T, Hieshima K, Haskell C, Baba M, Nagira M, Nishimura M, Kakizaki M, Takagi S, Nomiyama H, Schall TJ, Yoshie O (1997): Identification and molecular characterization of fractalkine receptor CX3CR1, which mediates both leukocyte migration and adhesion. Cell 91, 521-530.

85. Jaakola VP, Griffith MT, Hanson MA, Cherezov V, Chien EY, Lane JR, Ijzerman AP, Stevens RC (2008): The 2.6 angstrom crystal structure of a human A2A adenosine receptor bound to an antagonist. Science 322, 1211-1217.

86. Joliot A, Le Roux I, Volovitch M, Bloch-Gallego E, Prochiantz A (1993): [Neurotrophic activity of homeopeptide]. C R Seances Soc Biol Fil 187, 24-27.

87. Junttila MR, Saarinen S, Schmidt T, Kast J, Westermarck J (2005): Single-step Strep-tag purification for the isolation and identification of protein complexes from mammalian cells. Proteomics 5, 1199-1203.

88. Kabouridis PS (2003): Biological applications of protein transduction technology. Trends Biotechnol 21, 498-503.

89. Kashiwazaki M, Tanaka T, Kanda H, Ebisuno Y, Izawa D, Fukuma N, Akimitsu N, Sekimizu K, Monden M, Miyasaka M (2003): A high endothelial venule-expressing promiscuous chemokine receptor DARC can bind inflammatory, but not lymphoid, chemokines and is dispensable for lymphocyte homing under physiological conditions. Int Immunol 15, 1219-1227.

90. Kaspar KM, Thomas DD, Taft WB, Takeshita E, Weng N, Groblewski GE (2003): CaM kinase II regulation of CRHSP-28 phosphorylation in cultured mucosal T84 cells. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 285, G1300-1309.

91. Kelner GS, Kennedy J, Bacon KB, Kleyensteuber S, Largaespada DA, Jenkins NA, Copeland NG, Bazan JF, Moore KW, Schall TJ, *et al*. (1994): Lymphotactin: a cytokine that represents a new class of chemokine. Science 266, 1395-1399.

92. Kramp BK, Sarabi A, Koenen RR, Weber C (2010): Heterophilic chemokine receptor interactions in chemokine signaling and biology. Exp Cell Res 317, 655-663.

93. Kuang Y, Wu Y, Jiang H, Wu D (1996): Selective G protein coupling by C-C chemokine receptors. J Biol Chem 271, 3975-3978.

94. Kurihara T, Bravo R (1996): Cloning and functional expression of mCCR2, a murine receptor for the C-C chemokines JE and FIC. J Biol Chem 271, 11603-11607.

95. Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227, 680-685

96. Lapham CK, Zaitseva MB, Lee S, Romanstseva T, Golding H (1999): Fusion of monocytes and macrophages with HIV-1 correlates with biochemical properties of CXCR4 and CCR5. Nat Med 5, 303-308.

97. Lazarini F, Tham TN, Casanova P, Arenzana-Seisdedos F, Dubois-Dalcq M (2003): Role of the alpha-chemokine stromal cell-derived factor (SDF-1) in the developing and mature central nervous system. Glia 42, 139-48.

98. Li D, Niu Z, Yu W, Qian Y, Wang Q, Li Q, Yi Z, Luo J, Wu X, Wang Y, Schwartz RJ, Liu M (2009): SMYD1, the myogenic activator, is a direct target of serum response factor and myogenin. Nucleic Acids Res 37, 7059-7071.

99. Libby P (2002): Inflammation in atherosclerosis. Nature 420, 868-874.

100. Libby P, Ridker PM (2004): Inflammation and atherosclerosis: Role of C-reactive protein in risk assessment. Am J Med 116, 9S–16S.

101. Lomize AL, Pogozheva ID, Mosberg HI (1999): Structural organization of G-protein-coupled receptors. J Comput Aided Mol Des 13, 325-353.

102. Lu X, Kang Y (2009): Chemokine (C-C motif) ligand 2 engages CCR2+ stromal cells of monocytic origin to promote breast cancer metastasis to lung and bone. J Biol Chem 284, 29087-29096.

103. Lusso P (2000): Chemokines and viruses: the dearest enemies. Virology 273, 228-240.

104. Lusso P (2002): HIV and chemokines: implications for therapy and vaccine. Vaccine 20, 1964-1967.

105. Mackay CR (2001): Chemokines: immunology's high impact factors. Nat Immunol 2, 95-101.

106. Mann DA, Frankel AD (1991): Endocytosis and targeting of exogenous HIV-1 Tat protein. EMBO J 10, 1733-1739.

107. Manzo A, Caporali R, Montecucco C, Pitzalis C (2003): Role of chemokines and chemokine receptors in regulating specific leukocyte trafficking in the immune/inflammatory response. In Exp Rheumatol 21, 501-508.

108. Marrero MB, Schieffer B, Paxton WG, Schieffer E, Bernstein KE (1995): Electroporation of pp60c-src antibodies inhibits the angiotensin II activation of phospholipase C-gamma 1 in rat aortic smooth muscle cells. J Biol Chem 270, 15734-15738.

109. McFarlane AA, Orriss GL, Stetefeld J (2009): The use of coiled-coil proteins in drug delivery systems. Eur J Pharmacol 625, 101-107.

110. Miano JM, Long X, Fujiwara K (2007): Serum response factor: master regulator of the actin cytoskeleton and contractile apparatus. Am J Physiol Cell Physiol 292, 70-81.

111. Miller DV, Leontovich AA, Lingle WL, Suman VJ, Mertens ML, Lillie J, Ingalls KA, Perez EA, Ingle JN, Couch FJ, Visscher DW (2004): Utilizing Nottingham Prognostic Index in microarray gene expression profiling of breast carcinomas. Mod Pathol 17, 756-764.

112. Milligan G, Kostenis E (2006): Heterotrimeric G-proteins: a short history. Br J Pharmacol 147, 46-55.

113. Mizutani K, Roca H, Varsos Z, Pienta KJ (2009): Possible mechanism of CCL2-induced Akt activation in prostate cancer cells. Anticancer Res 29, 3109-3113.

114. Molon B, Gri G, Bettella M, Gómez-Moutón C, Lanzavecchia A, Martínez-A C, Mañes S, Viola A (2005): T cell costimulation by chemokine receptors. Nat Immunol 6, 465-471.

115. Morris MC, Depollier J, Mery J, Heitz F, Divita G (2001): A peptide carrier for the delivery of biologically active proteins into mammalian cells. Nat Biotechnol 19, 1173-1176.

116. Morris MC, Deshayes S, Heitz F, Divita G (2008): Cell-penetrating peptides: from molecular mechanisms to therapeutics. Biol Cell 100, 201-217.

117. Moser B, Wolf M, Walz A, Loetscher P (2004): Chemokines: multiple levels of leukocyte migration control. Trends Immunol 25, 75-84.

118. Müller G, Höpken UE, Lipp M (2003): The impact of CCR7 and CXCR5 on lymphoid organ development and systemic immunity. Immunol Rev 195, 117-135.

119. Mullis KB, Faloona FA (1987): Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. Methods Enzymol 155, 335-350.

120. Murakami Y, Aizu-Yokota E, Sonoda Y, Ohta S, Kasahara T (2007): Suppression of endoplasmic reticulum stress-induced caspase activation and cell death by the overexpression of Bcl-xL or Bcl-2. J Biochem 141, 401-410.

121. Murphy PM, Baggiolini M, Charo IF, Hébert CA, Horuk R, Matsushima K, Miller LH, Oppenheim JJ, Power CA (2000): International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. Pharmacol Rev 52, 145-176.

122. Myers SJ, Wong LM, Charo IF (1995): Signal transduction and ligand specificity of the human monocyte chemoattractant protein-1 receptor in transfected embryonic kidney cells. J Biol Chem 270, 5786-5792.

123. Naghavi M, Libby P, Falk E, Casscells SW, Litovsky S, Rumberger J, Badimon JJ, Stefanadis C, Moreno P, Pasterkamp G, Fayad Z, Stone PH, Waxman S, Raggi P, Madjid M, Zarrabi A, Burke A, Yuan C, Fitzgerald PJ, Siscovick DS, de Korte CL, Aikawa M, Airaksinen KEJ, Assmann G, Becker CR, Chesebro JH, Farb A, Galis ZS, Jackson C, Jang I-K, Koenig W, Lodder RA, March K, Demirovic J, Navab M, Priori SG, Rekhter MD, Bahr R, Grundy SM, Mehran R, Colombo A, Boerwinkle E, Ballantyne C, Insull W, Jr., Schwartz RS, Vogel R, Serruys PW, Hansson GK, Faxon DP, Kaul S, Drexler H, Greenland P, Muller JE, Virmani R, Ridker PM, Zipes DP, Shah PK, Willerson JT (2003): From vulnerable plaque to vulnerable patient: A call for new definitions and risk assessment strategies: Part II. Circulation 108, 1772–1778.

124. Najakshin AM, Mechetina LV, Alabyev BY, Taranin AV (1999): Identification of an IL-8 homolog in lamprey (Lampetra fluviatilis): early evolutionary divergence of chemokines. Eur J Immunol 29, 375-382.

125. Nakamura T, Furukawa Y, Nakagawa H, Tsunoda T, Ohigashi H, Murata K, Ishikawa O, Ohgaki K, Kashimura N, Miyamoto M, Hirano S, Kondo S, Katoh H, Nakamura Y, Katagiri T (2004): Genome-wide cDNA microarray analysis of gene

expression profiles in pancreatic cancers using populations of tumor cells and normal ductal epithelial cells selected for purity by laser microdissection. Cogene 23, 2385-2400.

126. Narayanan A, Eifert J, Marfatia KA, Macara IG, Corbett AH, Terns RM, Terns MP (2003): Nuclear RanGTP is not required for targeting small nucleolar RNAs to the nucleolus. J Cell Sci 116, 177-186.

127. Navratilova Z (2006): Polymorphisms in CCL2&CCL5 chemokines/chemokine receptors genes and their association with diseases. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub 150, 191-204.

128. Nelken NA, Coughlin SR, Gordon D, Wilcox JN (1991): Monocyte chemoattractant protein-1 in human atheromatous plaques. J Clin Invest.88, 1121-1127.

129. Nelson T, Brutlag D (1979): Addition of homopolymers to the 3'-ends of duplex DNA with terminal transferase Methods. Enzymol 68, 41-50

130. Ni W, Egashira K, Kitamoto S, Kataoka C, Koyanagi M, Inoue S, Imaizumi K, Akiyama C, Nishida KI, Takeshita A (2001): New anti-monocyte chemoattractant protein-1 gene therapy attenuates atherosclerosis in apolipoprotein E-knockout mice. Circulation 103, 2096-2101.

131. Nibbs RJ, Wylie SM, Pragnell IB, Graham GJ (1997): Cloning and characterization of a novel murine beta chemokine receptor, D6. Comparison to three other related macrophage inflammatory protein-1alpha receptors, CCR-1, CCR-3, and CCR-5. J Biol Chem 272, 12495-12504.

132. Niu J, Kolattukudy PE (2009): Role of MCP-1 in cardiovascular disease: molecular mechanisms and clinical implications. Clin Sci (Lond) 117, 95-109.

133. Noguchi H, Matsumoto S (2006): Protein transduction technology offers a novel therapeutic approach for diabetes. J Hepatobiliary Pancreat Surg 13, 306-313.

134. Nolkrantz K, Farre C, Hurtig KJ, Rylander P, Orwar O (2002): Functional screening of intracellular proteins in single cells and in patterned cell arrays using electroporation. Anal Chem 74, 4300-4305.

135. Nourse CR, Mattei MG, Gunning P, Byrne JA (1998): Cloning of a third member of the D52 gene family indicates alternative coding sequence usage in D52-like transcripts. Biochim Biophys Acta 1443, 155-168.

136. Ohishi I, Iwasaki M, Sakaguchi G (1980): Purification and characterization of two components of botulinum C2 toxin. Infect Immun 30, 668-673.

137. Olson TS, Ley K (2002): Chemokines and chemokine receptors in leukocyte trafficking. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 283, R7-28.

138. Palczewski K, Kumasaka T, Hori T, Behnke CA, Motoshima H, Fox BA, Le Trong I, Teller DC, Okada T, Stenkamp RE, Yamamoto M, Miyano M (2000): Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. Science 289, 739-745.

139. Petrova DT, Asif AR, Armstrong VW, Dimova I, Toshev S, Yaramov N, Oellerich M, Toncheva D (2008): Expression of chloride intracellular channel protein 1 (CLIC1) and tumor protein D52 (TPD52) as potential biomarkers for colorectal cancer. Clin Biochem 41, 1224-1236.

140. Proudfoot AE, Power CA, Wells TN (2000): The strategy of blocking the chemokine system to combat disease. Immunol Rev 177, 246-256.

141. Proudfoot AE (2002): Chemokine receptors: multifaceted therapeutic targets. Nat Rev Immunol 2, 106-115.

142. Proudfoot AE, Handel TM, Johnson Z, Lau EK, LiWang P, Clark-Lewis I, Borlat F, Wells TN, Kosco-Vilbois MH (2003): Glycosaminoglycan binding and oligomerization are essential for the in vivo activity of certain chemokines. Proc Natl Acad Sci U S A 100, 1885-18890.

143. Proudfoot AE (2006): The biological relevance of chemokine-proteoglycan interactions. Biochem Soc Trans 34, 422-426.

144. Proux V, Provot S, Felder-Schmittbuhl MP, Laugier D, Calothy G, Marx M (1996): Characterization of a leucine zipper-containing protein identified by retroviral insertion in avian neuroretina cells. J Biol Chem 271, 30790-30797.

145. Proux-Gillardeaux V, Galli T, Callebaut I, Mikhailik A, Calothy G, Marx M (2003): D53 is a novel endosomal SNARE-binding protein that enhances interaction of syntaxin 1 with the synaptobrevin 2 complex in vitro. Biochem J 370, 213-221.

146. Rapoport M, Lorberboum-Galski H (2009): TAT-based drug delivery system--new directions in protein delivery for new hopes? Expert Opin Drug Deliv 6, 453-463.

147. Rasmussen SG, Choi HJ, Rosenbaum DM, Kobilka TS, Thian FS, Edwards PC, Burghammer M, Ratnala VR, Sanishvili R,Fischetti RF, Schertler GF, Weis WI, Kobilka BK (2007): Crystal structure of the human beta2 adrenergic G-protein-coupled receptor. Nature 450, 383-387.

148. Rechsteiner M (1990): PEST sequences are signals for rapid intracellular proteolysis. Semin Cell Biol 1, 433-440.

149. Rechsteiner M, Rogers SW (1996): PEST sequences and regulation by proteolysis. Trends Biochem Sci 21, 267-271.

150. Rhodes DR, Barrette TR, Rubin MA, Ghosh D, Chinnaiyan AM (2002): Meta-analysis of microarrays: interstudy validation of gene expression profiles reveals pathway dysregulation in prostate cancer. Cancer Res 62, 4427-4433.

151. Rhodes DR, Yu J, Shanker K, Deshpande N, Varambally R, Ghosh D, Barrette T, Pandey A, Chinnaiyan AM (2004): ONCOMINE: a cancer microarray database and integrated data-mining platform. Neoplasia 6, 1-6.

152. Risinger JI, Maxwell GL, Chandramouli GV, Jazaeri A, Aprelikova O, Patterson T, Berchuck A, Barrett JC (2003): Microarray analysis reveals distinct gene expression profiles among different histologic types of endometrial cancer. Cancer Res 63, 6-11.

153. Rodríguez-Frade JM, Vila-Coro AJ, de Ana AM, Albar JP, Martínez-A C, Mellado M (1999): The chemokine monocyte chemoattractant protein-1 induces functional responses through dimerization of its receptor CCR2. Proc Natl Acad Sci U S A 96, 3628-3633.

154. Rollins BJ (1996): Monocyte chemoattractant protein 1: a potential regulator of monocyte recruitment in inflammatory disease. Mol Med Today 2, 198-204.

155. Rot A, von Andrian UH (2004): Chemokines in innate and adaptive host defense: basic chemokinese grammar for immune cells. Annu Rev Immunol 22, 891-928.

156. Rot A (2010): Chemokine patterning by glycosaminoglycans and interceptors. Front Biosci 15, 645-660.

157. Rubin MA, Varambally S, Beroukhim R, Tomlins SA, Rhodes DR, Paris PL, Hofer MD, Storz-Schweizer M, Kuefer R, Fletcher JA, Hsi BL, Byrne JA, Pienta KJ, Collins C, Sellers WR, Chinnaiyan AM (2004): Overexpression, amplification, and androgen regulation of TPD52 in prostate cancer. Cancer Res 64, 3814-3822.

158. Rui M, Chen Y, Zhang Y, Ma D (2002): Transfer of anti-TFAR19 monoclonal antibody into HeLa cells by in situ electroporation can inhibit the apoptosis. Life Sci 71, 1771-1778.

159. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1988): Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science 239, 487-491.

160. Sanders SK, Crean SM, Boxer PA, Kellner D, LaRosa GJ, Hunt SW 3rd (2000): Functional differences between monocyte chemotactic protein-1 receptor A and

monocyte chemotactic protein-1 receptor B expressed in a Jurkat T cell. J Immunol 165, 4877-4883.

161. Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R. (1977): DNA sequencing with chain-termination inhibitors. Proc Natl Acad Sci U S A 74, 5463-5467.
162. Sathasivam P, Bailey AM, Crossley M, Byrne JA (2001): The role of the coiled-coil motif in interactions mediated by TPD52. Biochem Biophys Res Commun 288, 56-61.
163. Satoh M, Akatsu T, Ishkawa Y, Minami Y, Nakamura M (2007): A novel activator of C-C chemokine, FROUNT, is expressed with C-C chemokine receptor 2 and its ligand in failing human heart. J Card Fail 13, 114-119.
164. Savoia C, Schiffrin EL (2006): Inflammation in hypertension. Curr Opin Nephrol Hypertens 15, 152-158.
165. Sawant R, Torchilin V (2010): Intracellular transduction using cell-penetrating peptides. Mol Biosyst 6, 628-640.
166. Schepers A, Eefting D, Bonta PI, Grimbergen JM, de Vries MR, van Weel V, de Vries CJ, Egashira K, van Bockel JH, Quax PH (2006): Anti-MCP-1 gene therapy inhibits vascular smooth muscle cells proliferation and attenuates vein graft thickening both in vitro and in vivo. Arterioscler Thromb Vasc Biol 26, 2063-2069.
167. Schick S (2008): Proteintransduktion von Säugetierzellen mit C2I-TPD52-Fusionsproteinen unter Verwendung des binären C2-Toxins, Masterarbeit des Studiums der Biochemie in der Abteilung Phamrakologie und Toxikologie, Medizinische Fakultät, Universität Ulm
168. Schmidt TG, Skerra A (2007): The Strep-tag system for one-step purification and high-affinity detection or capturing of proteins. Nat Protoc 2, 1528-1535.
169. Schober A, Zernecke A, Liehn EA, von Hundelshausen P, Knarren S, Kuziel WA, Weber C (2004): Crucial role of the CCL2/CCR2 axis in neointimal hyperplasia after arterial injury in hyperlipidemic mice involves early monocyte recruitment and CCL2 presentation on platelets. Circ Res 95, 1125-1133.
170. Schober A, Weber C (2005): Mechanisms of monocyte recruitment in vascular repair after injury. Antioxid Redox Signal 7, 1249-1257.
171. Schober A, Zernecke A (2007): Chemokines in vascular remodeling. Thromb Haemost 97, 730-737.

172. Schoenhagen P, Ziada KM, Vince DG, Nissen SE, Tuzcu EM (2001): Arterial remodeling and coronary artery disease: the concept of "dilated" versus "obstructive" coronary atherosclerosis. J Am Coll Cardiol 38, 297-306.

173. Scholz J (2010): Analyse des Einflusses von heterotrimeren G-Proteinen und Nicht-G-Protein-Interaktionspartnern auf die hCCR2-vermittelte Signaltransduktion. Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Humanbiologie, Medizinische Fakultät, Universität Ulm.

174. Schwartz RS, Topol EJ, Serruys PW, Sangiorgi G, Holmes DR Jr (1998): Artery size, neointima, and remodeling: time for some standards. J Am Coll Cardiol 32, 2087-2094.

175. Schwarze SR, Ho A, Vocero-Akbani A, Dowdy SF (1999): In vivo protein transduction: delivery of a biologically active protein into the mouse. Science 285, 1569-1572.

176. Schwarze SR, Dowdy SF (2000): In vivo protein transduction: intracellular delivery of biologically active proteins, compounds and DNA. Trends Pharmacol Sci 21, 45-48.

177. Schwarze SR, Hruska KA, Dowdy SF (2000): Protein transduction: unrestricted delivery into all cells? Trends Cell Biol 10, 290-295.

178. Sekhar KR, Freeman ML (1998): PEST sequences in proteins involved in cyclic nucleotide signalling pathways. J Recept Signal Transduct Res 18, 113-132.

179. Sharman JL, Mpamhanga CP, Spedding M, Germain P, Staels B, Dacquet C, Laudet V, Harmar AJ; NC-IUPHAR (2011): IUPHAR-DB: new receptors and tools for easy searching and visualization of pharmacological data. Nucleic Acids Res (Database issue), D534-8.

180. Shehata M, Weidenhofer J, Thamotharampillai K, Hardy JR, Byrne JA (2008): Tumor protein D52 overexpression and gene amplification in cancers from a mosaic of microarrays. Crit Rev Oncog 14, 33-55.

181. Shi G, Partida-Sánchez S, Misra RS, Tighe M, Borchers MT, Lee JJ, Simon MI, Lund FE (2007): Identification of an alternative G{alpha}q-dependent chemokine receptor signal transduction pathway in dendritic cells and granulocytes. J Exp Med 204, 2705-2718.

182. Shridhar V, Lee J, Pandita A, Iturria S, Avula R, Staub J, Morrissey M, Calhoun E, Sen A, Kalli K, Keeney G, Roche P, Cliby W, Lu K, Schmandt R, Mills GB, Bast

RC Jr, James CD, Couch FJ, Hartmann LC, Lillie J, Smith DI (2001): Genetic analysis of early- versus late-stage ovarian tumors. Cancer Res 61, 5895-5904.

183. Skerra A, Schmidt TG (1999): Applications of a peptide ligand for streptavidin: the Strep-tag. Biomol Eng 16, 79-86.
184. Skerra A, Schmidt TG (2000): Use of the Strep-Tag and streptavidin for detection and purification of recombinant proteins. Methods Enzymol 326, 271-304.
185. Sohy D, Yano H, de Nadai P, Urizar E, Guillabert A, Javitch JA, Parmentier M, Springael JY (2009): Hetero-oligomerization of CCR2, CCR5, and CXCR4 and the protean effects of "selective" antagonists. J Biol Chem 284, 31270-31279.
186. Sozzani S, Agwu DE, Ellenburg MD, Locati M, Rieppi M, Rojas A, Mantovani A, McPhail LC (1994): Activation of phospholipase D by interleukin-8 in human neutrophils. Blood 84, 3895-3901.
187. Speyer CL, Ward PA (2011): Role of endothelial chemokines and their receptors during inflammation. J Invest Surg 24, 18-27.
188. Spinetti G, Wang M, Monticone R, Zhang J, Zhao D, Lakatta EG (2004): Rat aortic MCP-1 and its receptor CCR2 increase with age and alter vascular smooth muscle cell function. Arterioscler Thromb Vasc Biol 24, 1397-1402.
189. Springael JY, Urizar E, Parmentier M (2005): Dimerization of chemokine receptors and its functional consequences. Cytokine Growth Factor Rev 16, 611-623.
190. Stenmark KR, Davie NJ, Reeves JT, Frid MG (2005): Hypoxia, leukocytes, and the pulmonary circulation. J Appl Physiol 98, 715-721.
191. Stenmark KR, Fagan KA, Frid MG (2006): Hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling: cellular and molecular mechanisms. Circ Res 99, 675-691.
192. Strader CD, Fong TM, Tota MR, Underwood D, Dixon RA (1994): Structure and function of G protein-coupled receptors. Annu Rev Biochem 63, 101-132.
193. Strader CD, Fong TM, Graziano MP, Tota MR (1995): The family of G-protein-coupled receptors. FASEB J 9, 745-754.
194. Tanaka Y, Adams DH, Shaw S (1993): Proteoglycans on endothelial cells present adhesion-inducing cytokines to leukocytes. Immunol Today 14, 111-115.
195. Tanaka S, Green SR, Quehenberger O (2002): Differential expression of the isoforms for the monocyte chemoattractant protein-1 receptor, CCR2, in monocytes. Biochem Biophys Res Commun 290, 73-80.

196. Tanaka T, Terada M, Ariyoshi K, Morimoto K (2010): Monocyte chemoattractant protein-1/CC chemokine ligand 2 enhances apoptotic cell removal by macrophages through Rac1 activation. Biochem Biophys Res Commun 399, 677-682.

197. Taub DD, Oppenheim JJ (1993): Review of the chemokine meeting the Third International Symposium of Chemotactic Cytokines. Cytokine 5, 175-179.

198. Taubman MB, Rollins BJ, Poon M, Marmur J, Green RS, Berk BC, Nadal-Ginard B (1992): JE mRNA accumulates rapidly in aortic injury and in platelet-derived growth factor-stimulated vascular smooth muscle cells. Circ Res 70, 314-325.

199. Terashima Y, Onai N, Murai M, Enomoto M, Poonpiriya V, Hamada T, Motomura K, Suwa M, Ezaki T, Haga T, Kanegasaki S, Matsushima K (2005): Pivotal function for cytoplasmic protein FROUNT in CCR2-mediated monocyte chemotaxis. Nat Immunol 6, 827-835.

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

201. Tiacci E, Orvietani PL, Bigerna B, Pucciarini A, Corthals GL, Pettirossi V, Martelli MP, Liso A, Benedetti R, Pacini R, Bolli N, Pileri S, Pulford K, Gambacorta M, Carbone A, Pasquarello C, Scherl A, Robertson H, Sciurpi MT, Alunni-Bistocchi G, Binaglia L, Byrne JA, Falini B (2005): Tumor protein D52 (TPD52): a novel B-cell/plasma-cell molecule with unique expression pattern and Ca(2+)-dependent association with annexin VI. Blood 105, 2812-2820.

202. Tian Y, Lee MM, Yung LY, Allen RA, Slocombe PM, Twomey BM, Wong YH (2008): Differential involvement of Galpha16 in CC chemokine-induced stimulation of phospholipase Cbeta, ERK, and chemotaxis. Cell Signal 20, 1179-1189.

203. Thelen M (2001): Dancing to the tune of chemokines. Nat Immunol 2, 129-134.

204. Thelen M, Stein JV (2008): How chemokines invite leukocytes to dance. Nat Immunol 9, 953-959.

205. Thelen M, Muñoz LM, Rodríguez-Frade JM, Mellado M (2010): Chemokine receptor oligomerization: functional considerations. Curr Opin Pharmacol. 10, 38-43.

206. Theiss C, Meller K (2002): Microinjected anti-actin antibodies decrease gap junctional intercellular commmunication in cultured astrocytes. Exp Cell Res 281, 197-204.

207. Thomas DD, Kaspar KM, Taft WB, Weng N, Rodenkirch LA, Groblewski GE (2002): Identification of annexin VI as a Ca2+-sensitive CRHSP-28-binding protein in pancreatic acinar cells. J Biol Chem 277, 35496-35502.

208. Thomas DD, Frey CL, Messenger SW, August BK, Groblewski GE (2010): A role for tumor protein TPD52 phosphorylation in endo-membrane trafficking during cytokinesis. Biochem Biophys Res Commun 402, 583-587.

209. Uchida T, Kanazawa T, Takashima Y, Okada H (2011): Development of an efficient transdermal delivery system of small interfering RNA using functional peptides, Tat and AT-1002. Chem Pharm Bull (Tokyo) 59, 196-201.

210. Ummanni R, Teller S, Junker H, Zimmermann U, Venz S, Scharf C, Giebel J, Walther R (2008): Altered expression of tumor protein D52 regulates apoptosis and migration of prostate cancer cells. FEBS J 275, 5703-5713.

211. Unger VM, Hargrave PA, Baldwin JM, Schertler GF (1997): Arrangement of rhodopsin transmembrane alpha-helices. Nature 389, 203-206.

212. Usui M, Egashira K, Ohtani K, Kataoka C, Ishibashi M, Hiasa K, Katoh M, Zhao Q, Kitamoto S, Takeshita A (2002): Anti-monocyte chemoattractant protein-1 gene therapy inhibits restenotic changes (neointimal hyperplasia) after balloon injury in rats and monkeys. FASEB J 16, 1838-1840.

213. van Coillie E, Van Damme J, Opdenakker G (1999): The MCP/eotaxin subfamily of CC chemokines. Cytokine Growth Factor Rev 10, 61-86.

214. van Golen KL, Ying C, Sequeira L, Dubyk CW, Reisenberger T, Chinnaiyan AM, Pienta KJ, Loberg RD (2008): CCL2 induces prostate cancer transendothelial cell migration via activation of the small GTPase Rac. J Cell Biochem 104, 1587-1597.

215. von Hundelshausen P, Koenen RR, Sack M, Mause SF, Adriaens W, Proudfoot AE, Hackeng TM, Weber C (2005): Heterophilic interactions of platelet factor 4 and RANTES promote monocyte arrest on endothelium. Blood. 105, 924-930.

216. Wadia JS, Dowdy SF (2002): Protein transduction technology. Curr Opin Biotechnol 13, 52-56.

217. Wain JH, Kirby JA, Ali S (2002): Leucocyte chemotaxis: Examination of mitogen-activated protein kinase and phosphoinositide 3-kinase activation by Monocyte Chemoattractant Proteins-1, -2, -3 and -4. Clin Exp Immunol 127, 436-444.

218. Ward MR, Pasterkamp G, Yeung AC, Borst C (2000): Arterial Remodeling. Mechanisms and Clinical Implications. Circulation 102, 1186-1191.

219. Walz DA, Wu VY, de Lamo R, Dene H, McCoy LE (1977): Primary structure of human platelet factor 4. Thromb Res 11, 893-898.

220. Wang MH, Frishman LJ, Otteson DC (2008): Intracellular delivery of proteins into mouse Müller glia cells in vitro and in vivo using Pep-1 transfection reagent. J Neurosci Methods 177, 403-419.

221. Wang R, Xu J, Saramäki O, Visakorpi T, Sutherland WM, Zhou J, Sen B, Lim SD, Mabjeesh N, Amin M, Dong JT, Petros JA, Nelson PS, Marshall FF, Zhau HE, Chung LW (2004): PrLZ, a novel prostate-specific and androgen-responsive gene of the TPD52 family, amplified in chromosome 8q21.1 and overexpressed in human prostate cancer. Cancer Res 64, 1589-1594.

222. Warne T, Serrano-Vega MJ, Baker JG, Moukhametzianov R, Edwards PC, Henderson R, Leslie AG, Tate CG, Schertler GF (2008): Structure of a beta1-adrenergic G-protein-coupled receptor. Nature 454, 486-491.

223. Weber KS, Nelson PJ, Gröne HJ, Weber C (1999): Expression of CCR2 by endothelial cells: implications for MCP-1 mediated wound injury repair and In vivo inflammatory activation of endothelium. Arterioscler Thromb Vasc Biol 19, 2085-2093.

224. Wells TN, Power CA, Shaw JP, Proudfoot AE (2006): Chemokine blockers--therapeutics in the making? Trends Pharmacol Sci 27, 41-47.

225. Wilson SH, Bailey AM, Boutros R, Bailey AM, Wilson SH, Byrne JA (2003): Alternative splicing as a mechanism for regulating 14-3-3 binding: interactions between hD53 (TPD52L1) and 14-3-3 proteins. J Mol Biol 332, 675-687.

226. Wong LM, Myers SJ, Tsou CL, Gosling J, Arai H, Charo IF (1997): Organization and differential expression of the human monocyte chemoattractant protein 1 receptor gene. Evidence for the role of the carboxyl-terminal tail in receptor trafficking. J Biol Chem 272, 1038-1045.

227. Wong K, Van Keymeulen A, Bourne HR (2007): PDZRhoGEF and myosin II localize RhoA activity to the back of polarizing neutrophil-like cells. J Cell Biol 179, 1141-1148.

228. Wu B, Chien EY, Mol CD, Fenalti G, Liu W, Katritch V, Abagyan R, Brooun A, Wells P, Bi FC, Hamel DJ, Kuhn P, Handel TM, Cherezov V, Stevens RC (2010): Structures of the CXCR4 chemokine GPCR with small-molecule and cyclic peptide antagonists. Science 330, 1066-1071.

229. Yadav A, Saini V, Arora S (2010): MCP-1: chemoattractant with a role beyond immunity: a review. Clin Chim Acta 411, 1570-1579.

230. Yu X, Dluz S, Graves DT, Zhang L, Antoniades HN, Hollander W, Prusty S, Valente AJ, Schwartz CJ, Sonenshein GE (1992): Elevated expression of monocyte chemoattractant protein 1 by vascular smooth muscle cells in hypercholesterolemic primates. Proc Natl Acad Sci U S A 89, 6953-6957.

231. Zassler B, Blasig IE, Humpel C (2005): Protein delivery of caspase-3 induces cell death in malignant C6 glioma, primary astrocytes and immortalized and primary brain capillary endothelial cells. J Neurooncol 71, 127-134.

232. Zelphati O, Wang Y, Kitada S, Reed JC, Felgner PL, Corbeil J (2001): Intracellular delivery of proteins with a new lipid-mediated delivery system. J Biol Chem 276, 35103-35110.

233. Zhang J, Lu Y, Pienta KJ (2010): Multiple roles of chemokine (C-C motif) ligand 2 in promoting prostate cancer growth. J Natl Cancer Inst 102, 522-528.

234. Zhang J, Patel L, Pienta KJ (2010): Targeting Chemokine (C-C motif) Ligand 2 (CCL2) as an Example of Translation of Cancer Molecular Biology to the Clinic. Prog Mol Biol Transl Sci 95, 31-53.

235. Zhang YE, Wang JN, Tang JM, Guo LY, Yang JY, Huang YZ, Tan Y, Fu SZ, Kong X, Zheng F (2009): In vivo protein transduction: delivery of PEP-1-SOD1 fusion protein into myocardium efficiently protects against ischemic insult. Mol Cells 27, 159-166.

236. Zhao C, Hellman LM, Zhan X, Bowman WS, Whiteheart SW, Fried MG (2010): Hexahistidine-tag-specific optical probes for analyses of proteins and their interactions. Anal Biochem 399, 237-245.

237. Zheng X, Lundberg M, Karlsson A, Johansson M (2003): Lipid-mediated protein delivery of suicide nucleoside kinases. Cancer Res 63, 6909-6913.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich die Möglichkeit nutzen, mich bei allen zu bedanken, die mich in meiner mitunter sehr aufreibenden Doktorarbeit unterstützt haben.

Vielen Dank an Herrn Prof. Dr. P. Gierschik, dass ich in der Abteilung für Pharmakologie und Toxikologie promovieren durfte und er stets ein offenes Ohr und ein Lächeln für mich parat hatte.

Ohne meine Betreuerin Frau PD Barbara Möpps, hätte ich diese Danksagung sicherlich in einer weitaus neueren Word-Version – ich vermute Word 2020 – schreiben müssen. Die in besonderem Maße fordernde Schlussphase konnte ich nur mit ihrer ausdauernden Unterstützung bewältigen.

Mein Dank geht auch an Herrn PD Dr. Oliver Zimmermann – als Zweitgutachter hat man sicherlich die ein oder andere mühevolle Stunde zu bewältigen.

Alle Mitarbeiter der Abteilung haben mir stets geholfen und die eine oder andere Frage beantwortet – vielen Dank hierfür, es waren nicht wenige. Ein besonderer Dank geht an Angela und Torben, mit denen ich endlich mal wieder grillen muss.

Frau Dr. Petra Vatter hat meine Arbeit mit ihrem Wissen über chromatografische Methoden bereichert und so einen entscheidenden Beitrag zu diesem Werk geliefert.

Frau Susanne Gierschik hat freundlicherweise die DNA-Sequenzierung für mich durchgeführt.

Eine schöne Zeit im Labor hatte ich mit meinem Kommilitonen Peter Arndt. Wer hätte gedacht, dass Pipettenspitzen so weit fliegen können?

Der größte Dank geht an jene, die mir den nötigen Rückhalt gegeben haben, auch diese anspruchsvolle Aufgabe zu bewältigen. Meine Eltern, mein Bruder und meine Schwiegerfamilie in spe haben mir stets gut zugesprochen und mir gezeigt, dass es auch

noch andere Dinge im Leben gibt. Letztendlich möchte ich mich bei meiner Verlobten für all die Geduld und Hilfe bedanken, ohne sie hätte ich längst vorher aufgegeben.

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.