

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden, falls nicht anders ausgewiesen, von Roth, GE Healthcare und Sigma bezogen.

2.1.2 Enzyme

Restriktionsenzyme wurden von MBI Fermentas und New England Biolabs bezogen.

2.1.3 Antikörper

Antikörper	Spezies	Verdünnung IF	Verdünnung WB	Firma
α B-Crystallin	Mouse		1:500	Calbiochem
α -Tubulin	Mouse	1:100	1:1000	Oncogene
Aktin	Rabbit		1:1000	Sigma
Aktinin (EA53)	Mouse	1:500		Sigma
Alexa Fluor 488	Goat	1:1000		Invitrogen
Calmodulin I (FL-149)	Rabbit	1:100	1:500	Santa Cruz Biotech.
Calpain 3	Mouse		1:100	Novocastra
Calsarcin 1	Rabbit	1:100	1:1000	Alpha Diagnostic
Cy3	Goat	1:1000		Jackson Imm. Research
DAPI		1:2000		Roth
Desmin	Mouse	1:100	1:500	Biogenex
Enolase 1	Goat		1:500	Santa Cruz Biotech.
ERK (p42/44 MAP Kinase)	Rabbit		1:500	Cell Signaling Tech.
FHL2 (BL455)	Rabbit		1:1000	Bethyl
Foxo1 (FKHR)	Rabbit		1:1000	Santa Cruz
GAPDH	Mouse		1:1000	ABR
IgG mouse HRP gekoppelt			1:2000	Calbiochem
IgG rabbit HRP gekoppelt			1:5000	GE Healthcare

Antikörper	Spezies	Verdünnung IF	Verdünnung WB	Firma
Isotypic control IgG2a	Mouse		1 µg/ml	Dianova
LTCC (DHP-sensitive Ca channel alpha 1 subunit)	Mouse		1:500	Chemicon
mMaC-Myomesin B4	Mouse	unverdünnt		Perriard, ETH Zürich
Murf1	Rabbit	1:100	1:500	Labeit, Uni Mannheim
Myostatin (CDF8)	Rabbit		1:500	Abcam
N2B I16-I17	Rabbit	1:100		Labeit, Uni Mannheim
p62	Mouse	1:100	1:500	BD Bioscience
p-ERK (phospho-p42/44 MAP)	Rabbit		1:500	Cell Signaling Tech.
Phospholamban	Mouse		1:500	Abcam
p-Troponin	Rabbit	1:100	1:500	Cell Signaling Tech.
PKCε	Rabbit	1:100	1:500	Santa Cruz Biotech.
PKCδ	Mouse		1:500	BD Bioscience
pRaEH-myomesin	Rabbit		1:5000	Perriard, ETH Zürich
p-Troponin	Rabbit		1:500	Cell Signaling Tech.
RhoA	Mouse		1:500	Upstate
Serca2	Mouse	1:100	1:500	ABR
SRF (H-300)	Rabbit	1:100	1:500	Santa Cruz Biotech.
T7	Mouse	1:100	1:500	Novagen
Tcap	Rabbit	1:500	1:1000	Eurogentec
Titin A168-170	Rabbit	1:500		Labeit, Uni Mannheim
Titin M8/9	Rabbit	1:300	1:1000	Biogenes
Titin T3	Mouse	1:100		Fürst, Uni Potsdam
Troponin I (H-170)	Rabbit		1:500	Santa Cruz Biotech.

2.1.4 Oligonukleotide

Name	Sequenz	Verwendung
CMV	TAGGCGTGTACGGTGGGAGGTC	Sequenzierung
Cre800 fw	GCTGCCACGACCAAGTGACAGCAATG	Genotyp cre
Cre1200 rev	GTAGTTATTCGGATCATCAGCTACAC	Genotyp cre
KR_cd_pCGT7_fw	TCTAGAATAGCTGAAGATCTGGGGCGTG	Klonierung pCGT7-cd(mut)
KR_cd_pCGT7_rw	GGATCCCTTAGTGCTGGAGAGCCTCCGAT	Klonierung pCGT7-cd(mut)
KR_meg13t_fw	TCTAGAGGCTCCCTTTTGCCTGCT	Klonierung pCGT7-meg
KR-meg13t_rw2	GGATCCCTATACTTCAGAGTCTTCT	Klonierung pCGT7-meg
KR-cdm1-1	CTGCCCTGAATACGAGGCCCTGAAGTCCA CCAGC	Basenaustausch Y170->E170 cd->cdmut
KR-cdm1-2	GACGGGGACTTATGCTCCGGGGACTTCAGGT GGTCG	Basenaustausch Y170->E170 cd->cdmut
MG-Ti-SL2 rev	ACCGTCCCATGCCTTCGAGAGTCTTG	Genotyp lox
MG-Ti-SL1 fw	GTGTCTGGCACTGCTTCCTTGAAGTG	Genotyp lox
MG-ttn-78R	GGCATGGTTGGGATTGGAAC	Genotyp mdm
MG-ttn-58F	AGGACCAACAGAGCTGACTG	Genotyp mdm
MG-TiMex1kin rw	TTTGTGCGACTTAGTGCTGGAGAGCCTCCGATG CTG	Klonierung pGex-cdm1
NFκB H-2k Oligo	GATCCAGGGCTGGGGATTCCCCATCTCCAAC AGG	EMSA
Sp6	GGATCCCTATACTTCAGAGTCTTCT	Sequenzierung
SW-TiMex1kin fw	TTTGAATTCTACATGATAGCTGAAGATCTGGG	Klonierung pGex-cdm1
T7	TAATACGACTCACTATAGG	Sequenzierung
T3	AATTAACCCTCACTAAAGGG	Sequenzierung

2.1.5 Sonden

Die Sonden und Primer für die Real-Time-PCR Analyse wurden bei Applied Biosystem bestellt (PKCδ, PKCε, Rack1, FHL2, Foxo1, CSRP3, Presenilin 2, Calmodulin 1, RhoA, LTCC) oder von Biotex (Tabelle) synthetisiert.

Name	Sequenz
ANP fw	TTCTAGGCGCAGCCCT
ANP rev	GCAGAGCCCTCAGTTTGCTT
ANP Sonde	6-FAM-ACCCCTCCGATAGATCTGCCCTCTTGAA-TAMRA
BNP fw	AGCTGCTGGAGCTGATAAGAGAA
BNP rev	GTGAGGCCTTGGTCCTTCAA
BNP Sonde	6-FAM-AGTCAGAGGAAATGGCCCAGAGACAGCTA-TAMRA
Exon 357- 358 fw	CCGATGGACTCAAGTACAGGATT
Exon 357- 358 rev	CCCATGCCTTCGAGAGTCTT
Exon357-358 Sonde	FAM-TCCTTGGAAGTGGAAAGTTCCAGCTAAGATACAC-TAMRA
GAPDH mouse 154f	GGC AAA TTC AAC GGC ACA GT
GAPDH mouse 223r	AGA TGG TGA TGG GCT TCC C
GAPDH Sonde	6-FAM-AGGCCGAGAATGGGAAGCTTGTTCATC-TAMRA
GATA4 fw	GTAGGCCTCTCCTGTGCCAA
GATA4 rev	TCACCCTCGGCATTACGAC
GATA4 Sonde	6-FAM-TGCCAGACTACCACCACCACGCTGT-TAMRA
MAPKAPK2 fw	GTGTGGGTATCCCCCTTCT
MAPKAPK2 rev	TACGAGTCTTCATGCCCGG
MAPKAPK2 Sonde	6-FAM-TCCAATCACGGCCTTGCCATCTC-TAMRA
MEF2c fw	GGCTCTGTAAGTGGCTGGCA
MEF2c rev	TCCCAACTGACTGAGGGCAG
MEF2c Sonde	6-FAM-CAGCAGCACCTACATAACATGCCGCC-TAMRA
MEK5 fw	AGAGCCGCTGCAGAT
MEK5 rev	TCACCTTCAGGCCAT
MEK5 Sonde	6-FAM-ATTTCCAAGAGCCTGCAAGCCTCCC-TAMRA
Mex6 fw	GCCTTGTGTGGTAGTTCTAAATTCAA
Mex6 rev	TTTGCTGTGGCTCATTGCTT
Mex6 Sonde	6-FAM-TTTCACCGGGAAGTGGGCAA-TAMRA
Murf1 Sonde	FAM-AGCTGGAGGACTCGTGCAGAGTGACC-TAMRA
Murf1-fw	CCGAGTGCAGACGATCATCTC
Murf1-rev	CCTTCACCTGGTGGCTATTCTC
Murf2 fw	TGGAGAACGTATCCAAGTTGGT
Murf2 rev	CCTTTGATGCTTCCACGATCT
Murf2 Sonde	FAM-CATGGATGAGCCCGAAATGGCA-TAMRA
Myomesin fw	GCGTAGTCATCACTCCTG
Myomesin rev	GTGGCTGCACCCATTTTG
Myomesin Sonde	FAM-ATAGAAATGGAGCACCTGTTTCTCC-TAMRA
Nbr1 fw	TCGTACAAGGCCCTGTTT
Nbr1 rev	CAGGGCTGTGGTCTGATC
Nbr1 Sonde	FAM-ACTGCACAGCCCATCGTTTCTGAAG-TAMRA

Name	Sequenz
PLB fw	CGATCACCGAAGCCAAGGTCTC
PLB rev	GTGGCGGCAGCTCTTCACAGA
PLB Sonde	6-FAM-AGTGCAATACCTCACTCGCTCGGCTATCA-TAMRA
Serca2 fw	TCCATGAGCAAGATGTTTGTGAA
Serca2 rev	TCCCGAATGACAGACACATAATCTTCT
Serca2 Sonde	6-FAM-CATCCGAGTTGGAAGTACCAAGGTCCC-TAMRA
Sqstm1 fw	CCACCAGAAGATCCCAAT
Sqstm1 rev	CTTCTCTCCCTCCATGC
Sqstm1 Sonde	FAM-CCCTCAGCCCTCTAGGCATTGAGGT-TAMRA
SRF fw	TAAGAGGAAGACGGGCAT
SRF rev	GCACCTGTGTCCCTGTCAG
SRF Sonde	6-FAM-GAAGAAGGCCTATGAGCTGTCCACG-TAMRA
T-cap fw	GGTTCATGCCTCTGTGC
T-cap rev	GCTGAGTGAAAGACCTG
T-cap Sonde	FAM-CGTGCAAGGAGCATCCCTCTTCCGG-TAMRA
TGFb2 fw	CCCCTGCTACTGCAAGTCAG
TGFb2 rev	GTCCTCAGGTCCTGCCTCCT
TGFb2 Sonde	6-FAM-CTTCTTGACTGCGCTGTCTCGC-TAMRA
Z1, Z2 fw	CGATGGCCGCGCTAGA
Z1, Z2 rev	CTCAGGGAGTATCGTCCACTGTT
Z1, Z2 Sonde	6-FAM-TGATGATCCCCGCCGTGACTAAAGC-TAMRA

2.1.6 Bakterien und Hefestämme

Name	Sequenz	Referenz
<i>E. coli</i> Bl21 Star	F- ompT hsdSB (rB-mB-) gal dcm me131 (DE3)	(Studier und Moffatt, 1986), Invitrogen
<i>E. coli</i> DH5α	endA1, F ⁻ , gyrA96, hsdR17, (rk ⁻ , mk ⁺), lacZΔM15, recA1, supE44, λ ⁻ , deoR, thi ⁻¹ , φ80d, Δ(lacZYA-argF)U189	(Hanahan, 1983)
<i>E. coli</i> HB101	F ⁻ , thi-1, hsdS20 (rB ⁻ , mB ⁻), supE44, recA13, ara-14, leuB6, proA2, lacY1, galK2, rpsL20 (strr), xyl-5, mtl-1	(Bolivar und Backman, 1979; Boyer und
<i>S. cerevisiae</i> Y187	MATa, ura3-52, his3-200, ade2-101, trp1-901, leu2-3, 112, gal4D, met ⁻ , gal80D, URA3 : : GAL1 _{UAS} -GAL1 _{TATA} -lacZ	Roulland-Dussoix, 1969)
<i>S. cerevisiae</i> AH109	MATa, trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4Δ, gal80Δ, LYS2 : : GAL1 _{UAS} -GAL1 _{TATA} -HIS3, GAL2 _{UAS} -GAL2 _{TATA} -ADE2 URA3 : : MEL1 _{UAS} -MEL1 _{TATA} -lacZ MEL1	(Harper et al., 1993), Clontech Holtz, nicht publiziert, Clontech

2.1.7 Vektoren

pGemTeasy (Invitrogen), pGex4T1 (GE Healthcare), pCGT7 (Javier F. Caceres, Western General Hospital, Edinburgh), pGBK (BD Bioscience)

2.2 Methoden

2.2.1 Tierexperimentelle Praxis

Die verwendeten Tiere stammten aus eigener Zucht und wurden in der tierexperimentellen Einrichtung des Max-Delbrück-Centrums Berlin in IVC-Käfigen (individually ventilated cages) gehalten. Sie erhielten unbegrenzten Zugang zu Wasser und Futter und hatten ein 12 h Tag/Nacht Rhythmus. Die Versuche wurden gemäß der Richtlinien der europäischen Union durchgeführt und von der deutschen Tierschutzbehörde genehmigt.

2.2.2 Klonierungen

Bei Klonierungen wurde nach den Protokollen von (Sambrook und Russell, 2001) verfahren.

2.2.3 Genotypisierung der Titinkinaseregion- und Mdm-KO-Tiere

Für die Genotypisierung der Titinkinaseregion- und Mdm-KO-Tiere wurde ein kleines Stück vom Mausohr mit 48 µl Embryolysispuffer + 2 µl Proteinase K (10 µg/ml) ÜN bei 52°C verdaut. Es folgte eine Inkubation für 10 min bei 95°C und Zugabe von 200 µl ddH₂O. Für die PCR wurden die unter 2.1.4 aufgelisteten Oligonukleotide und die folgenden PCR-Programme und Pipettierschemata verwendet.

Embryolysispuffer

50 mM KCl

3 mM MgCl₂

10 mM Tris pH 8,9

0,01 % Gelatine

0,45 % NP-40

0,45 % Tween-20

PCR Cre (400 bp)

1 x PCR Puffer	1. 94°C	2min	
0,6 µM Primer Mix	2. 94°C	15 sec	
0,2 mM dNTPs	3. 49°C	15 sec	
1,5 mM MgCl ₂	4. 72°C	45 sec	Schritt 1-4 35x
0,04 U/µl Taq (Invitex)	5. 72°C	8 min	
	6. 4°C	∞	

PCR Lox (WT 200bp, KO 300 bp)

1 x PCR Puffer	1. 94°C	2min	
0,2 µM Primer Mix	2. 94°C	15 sec	
0,2 mM dNTPs	3. 55°C	15 sec	
1,5 mM MgCl ₂	4. 72°C	45 sec	Schritt 1-4 35x
0,04U/µl Taq	5. 72°C	8 min	
	6. 4°C	∞	

PCR Mdm (WT 939bp, KO 513bp)

1 x Glitschier Puffer	1. 93°C	3 min	
10 % DMSO	2. 60°C	5 min	
0,08 µM Primer Mix	3. 65°C	5 min	
0,5 mM dNTPs	4. 93°C	30 sec	
0,08 mg/ml BSA	5. 60°C	1 min	
0,025 U/µl Taq	6. 65°C	3 min	Schritt 4-6 40x
	7. 65°C	10 min	
	10°C	∞	

Glitschier Puffer

166 mM (NH ₄) ₂ SO ₄
670 mM Tris pH8,8
67 mM MgCl
50 mM β-Mercaptoethanol
67 mM EDTA

2.2.4 SDS-Gelelektrophorese

Für die Western-Blots wurden 2D-Gelproben (2.2.8.1), Titingelproben (2.2.7.1) oder Proben, die mit SDS-Puffer aufgeschlossen wurden, verwendet. Dazu wurde das Gewebe in flüssigen Stickstoff mit Mörser und Pistill zerkleinert und mit dem 10-fachen Volumen SDS-Puffer aufgenommen. Anschließend wurde das Lysat mit Ultraschall (50 % power und pulse, 2 min) aufgeschlossen und die Zelltrümmer bei 12 000 rpm und 4°C für 10 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde bei -80°C gelagert. Es wurden jeweils 50 µg Proteinlysate mit 4-fachen Laemmli-Puffer versetzt, 5 min bei 95°C inkubiert und auf ein 12 %iges SDS-Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte mit der Hoefer Small gel unit (GE-Healthcare) 30 min bei 80 V und 2 h bei 120 V. Als Laufpuffer wurde 1x SDS-Gelpuffer (s. 2.2.6.3) verwendet.

Anschließend wurden die Gele mit Coomassie Brilliant Blue (GE-Healthcare, nach Anleitung des Herstellers) gefärbt oder geblottet.

SDS-Puffer

1 % SDS
10 mM Tris-HCl, pH 7,5
2 mM EDTA, pH 8,0

Laemmlipuffer

50 mM Tris
1 % β -Mercaptoethanol
2 % SDS
10 % Glycerin
0,1 % Bromphenolblau

2.2.5 Proteinbestimmung

Die Proteinkonzentration wurde mit der Amidoschwarz-Methode von Schaffner und Weissmann (Schaffner und Weissmann, 1973) oder mit Bradfordlösung (Roth) anhand der Herstellerangaben bestimmt.

2.2.6 Western Blot

Nach der SDS-PAGE wurden die Gele 1 h bei 70 V und 2 h bei 30 V auf Hybond-C-Membranen (GE-Healthcare) geblottet (Mini Trans.Blot Cell, Biorad). Anschließend wurde die Transfereffizienz mit einer reversiblen Ponceau-S-Färbung überprüft und die Färbung mit PBS-Tween wieder entfernt. Unspezifische Bindungsstellen auf der Membran wurden mit PBS-Tween + 5 % Milchpulver ÜN bei 4°C blockiert. Anschließend wurde die Membran 2 h mit dem primären Antikörper in PBS + 5 % Milchpulver bei RT inkubiert und 3 x 15 min mit PBS-Tween gewaschen. Es folgte eine zweite Inkubation mit dem sekundären Antikörper für 1h bei RT. Anschließend wurde die Membran noch mal 2 x 15 min mit PBS-Tween und 1 x 15 min mit PBS gewaschen. Jeweils 0,75 ml Lösung A und B vom Supersignal Kit (Pierce) wurden zusammenpipettiert und 2 min auf der Membran inkubiert. Anschließend erfolgte die Detektion des Lichtsignals mit der LAS1000 Kamera von Fujifilm.

PBS

137 mM NaCl
2,7 mM KCl
4,3 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$
1,4 mM KH_2PO_4

PBS-Tween

PBS + 0,1 % Tween

2.2.7 Titin Agarose Gels

2.2.7.1 Probenaufbereitung

Die Mäuse wurden durch zervikale Dislokation getötet und das Herz entnommen. Das Gewebe wurde mit flüssigen Stickstoff zerkleinert und mit den 40-fachen Volumen Titin-Lysispuffer aufgenommen. Anschließend wurde die Proben bei 4°C und 12 000 rpm für 10 min abzentrifugiert und bei -80°C gelagert oder weiterverwendet.

Titin-Lysispuffer

8 M Harnstoff
 2 M Thioharnstoff
 3 % SDS
 1 % PMSF
 0,03 % Bromphenolblau
 75 mM DTT
 0,05 M Tris/HCl pH 6,8

2.2.7.2 Gelelektrophorese

Die Proben wurden 10 min bei 60°C erhitzt, 5 min bei RT und 12 000 rpm abzentrifugiert und anschließend auf ein 1 %iges Agarose-SDS-Gel aufgetragen. Zum Laufpuffer in der oberen Kammer wurden zusätzlich 10 mM Mercaptoethanol hinzugefügt. Die Elektrophorese erfolgte bei 15 mA und 8°C für 5 h mit der Hoefer SE 600 gel unit (GE-Healthcare).

Agarose-SDS-Gellösung

1 % Sea Kem Gold Agarose (Biowhittaker, Walkersville, MD)
 30 % Glycerin
 50 mM Tris-Base
 0,384 M Glycin
 0,1 % SDS

Laufpuffer

50 mM Tris-Base
 0,384 M Glycin
 0,1 % SDS

2.2.7.3 Färbung

Die Gele wurden nach der Elektrophorese für mindestens 1 h fixiert und dann bei 37°C ÜN getrocknet. Anschließend wurden die Gele mit Silber (Warren et al., 2003) oder mit Colloidal

Coomassie Blue (CBB, GE-Healthcare, nach Herstellerangaben) gefärbt und mit der Camilla Kamera (Raytest) gescannt.

Fixierer

50 % Methanol

12 % Essigsäure

5 % Glycerin

2.2.8 2D-Gelelektrophorese

2.2.8.1 Probenaufschluß

Die Mäuse wurden durch zervikale Dislokation getötet und Herz und Quadriceps entnommen. Das Gewebe wurde mit flüssigen Stickstoff zerkleinert und mit den 4-fachen Volumen 2D-Lysispuffer aufgenommen. Nach einem Ultraschallaufschluß (50 % power und pulse, 2 min) wurden die Zelltrümmer bei 50 000 rpm für 30 min bei 4°C abzentrifugiert. Anschließend wurden die Proben aliquotiert und bei -80°C gelagert oder rehydratisiert.

2D-Lysispuffer

8 M Harnstoff

2 M Thioharnstoff

4 % CHAPS

1 mM PMSF

10 mM DTT

100 nM Calyculin A

2.2.8.2 Rehydratisierung und 1. Dimension

Für die 2D-Gelelektrophorese wurden IPG Streifen mit einem pH-Gradienten von 3-10 (GE-Healthcare) verwendet. Die Streifen wurden ÜN bei RT in 340 µl Rehydratisierungslösung rehydratisiert. 125 µg Proteinlysate für Coomassie- und Sypro Ruby-Färbungen bzw. 25 µg Proteinlysate für Silberfärbungen wurden mit Rehydratisierungslösung auf ein Gesamtvolumen von 50 µl aufgefüllt und mittels Cuploading auf die IPG-Streifen aufgetragen. Die Streifen wurden dann mit DryStrip Cover Fluid (GE-Healthcare) bei 20°C auf der MultiphorII (GE-Healthcare) mit folgendem Profil isoelektrisch fokussiert: 1. Gradient 300 V, 30 min; 2.

konstant 300 V, 30 min; 3. Gradient 500 V, 1 h; 4. konstant 500 V, 1 h; 5. Gradient 3500 V, 1,5 h; 6. konstant 3500 V, 4,5 h-6,5 h. Nach der Fokussierung wurden die Streifen bei -20°C gelagert oder für die SDS-PAGE weiterverwendet.

Rehydratisierungslösung

8 M Harnstoff

2 M Thioharnstoff

2 % CHAPS

0,5 % Pharmalyte

10 mM DTT

12 µl/1 ml Puffer DeStreak-Reagent (GE-Healthcare)

0,03 % Bromphenolblau

vor Gebrauch DeStreak Reagent, Bromphenolblau und Pharmalyte zugeben

2.2.8.3 2. Dimension

Vor der SDS-PAGE wurden die Streifen in 10 ml Äquilibrationpuffer A für 15 min bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte eine zweite Äquilibration für 15 min bei RT in 10 ml Äquilibrationpuffer B. Die Streifen wurden dann auf die SDS-Gele (T=12,5 %; C=2,6 %) gelegt und mit 0,5 %iger Agarose überschichtet. Als Laufpuffer wurden 1 x SDS-Puffer für die untere Kammer und 2 x SDS-Puffer für die obere Kammer verwendet. Die Elektrophorese erfolgte bei 2 W/Gel für 30 min und 15 W/Gel für 5,5 h bei 16°C mit der Eltan Dalt Twelve Electrophoresis Unit von GE-Healthcare.

Äquilibrationpuffer A

6 M Harnstoff

2 % SDS

30 % Glycerin

22 mM DTT

50 mM Tris-HCl pH 8,8

Äquilibrationpuffer B

6 M Harnstoff

2 % SDS

30 % Glycerin

0,135 M Iodacetamid

50 mM Tris-HCl pH 8,8

10 x SDS-Laufpuffer

0,247 M Tris-Base

1,92 M Glycin

1 % SDS

Acrylamid-Lösung (500 ml=6 Gele)

133 ml ddH₂O

152 ml 40 % Acrylamid

85 ml 2 % Bisacrylamid

125 ml Tris-HCl, pH 8,8

0,5 % Agarose in 1x SDS-Laufpuffer

5 ml 10 % SDS

1,25 ml 10 % APS

0,25 ml TEMED

2.2.8.4 Färbungen

Die Gele wurden mit CBB (GE-Healthcare, nach Anleitung des Herstellers), Sypro Ruby (Biorad, nach Anleitung des Herstellers) oder Silber (Bloom und Goodpasture, 1976) gefärbt und mit der Camilla Kamera (Raytest) gescannt.

2.2.8.5 Analyse der Gele

Die Gele wurden mit Hilfe der Delta2D Software (Decodon) nach einem Protokoll von (Bernhardt et al., 1999) analysiert. Dabei wurden die % Vol Werte jedes Proteinspots in den Knockout- und Kontrollgelen gemittelt und der Quotient aus Mittelwert % Vol KO/Mittelwert % Vol Kontrolle für jeden Spot berechnet. Die daraus resultierenden Ratio-Werte wurden anschließend gefiltert, um nur die im KO vermindert synthetisierten Proteine (Ratio<0,5) und die im KO vermehrt synthetisierten Proteine (Ratio>1,5) zu erhalten. Zusätzlich wurden alle schwachen Proteinspots herausgefiltert, die einen % Vol-Mittelwert unter 0,03 in den KO- und Kontrollgelen hatten. Alle Proteinspots, die im Ttest einen P-Wert<0,1 aufwiesen, wurden als signifikant angesehen.

2.2.8.6 Massenspektrometrie

Die Proteinspots wurden aus CBB- und Sypro Ruby gefärbten Gelen ausgeschnitten und mit der Ettan Spot Handling Workstation (GE-Healthcare) nach einem modifizierten Standardprotokoll (Eymann et al., 2004) mit Trypsin verdaut. Für die Peptidmassenbestimmung wurde der Proteome Analyzer 4700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) verwendet. Die Peptidsequenzen wurden anschließend mit der „in house“-Mascot-Datenbank für Mus Musculus identifiziert (www.matrixscience.com).

2.2.9 Nachweis von modifizierten Thiolgruppen in Cysteinen

Herz- und Quadricepsgewebe von 34 Tage alten Titinkinaseregion-KO- und WT-Tieren wurde entnommen und in 4°C kaltem Waschpuffer gespült. Anschließend wurde das Gewebe in flüssigen Stickstoff mit Mörser und Pistill zerkleinert und in ein Eppendorfgefäß überführt. Das Gewebepulver wurde im Dunkeln mit 500 µl Lösung A + 100 mM Iodacetamid aufgenommen und mit Ultraschall für 2 min bei 50 % power und pulse aufgeschlossen. Anschließend wurde der pH überprüft (pH 8) und gegebenenfalls mit Tris (pH 8)

gegengitriert. Das Lysat wurde 30 min bei RT im Dunkeln inkubiert und dann bei 12 000 rpm und 4°C für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde mit dem 4-fachen Vol Aceton für 15 min bei RT inkubiert, bei RT und 12 000 rpm für 10 min zentrifugiert und das Peller 2 x mit Aceton gewaschen. Anschließend wurde das Pellet getrocknet und in 500 µl Lösung A resuspendiert. Nach einer Inkubation im Schüttler bei RT für 30 min wurde erneut zentrifugiert und der Überstand bei -80°C gelagert oder direkt weiterverwendet. Die Markierung mit dem Fluoreszenzfarbstoff und die Auftrennung der Proteine mittels 2D-Gelelektrophorese erfolgte nach dem Protokoll von Hochgraefe (Hochgraefe et al., 2005).

Waschlösung

Phosphat-Zitrat-Puffer nach Mc Iloaine (pH 2,2)
 98 ml Lösung B + 2 ml Lösung A
 Lösung A: 0,2 M Na₂HPO₄ x 2H₂O
 Lösung B: 0,1 M C₆H₈O₇ x H₂O

Lösung A

8 M Harnstoff
 1 % CHAPS
 1 mM EDTA
 200 mM Tris pH 8

2.2.10 EMSA

2.2.10.1 Herstellung von Kernextrakten

Herz- und Quadriceps von 20 Tage alten Titinkinaseregion -KO-Mäusen wurde entnommen und sofort in flüssigen Stickstoff überführt und mit Mörser und Pistill zerkleinert. Anschließend wurde das Gewebepulver in ein 2 ml Eppi überführt, mit 1,5 ml Puffer A versetzt und bei 4000 rpm und 4°C für 5 min abzentrifugiert. Das Pellet wurde mit dem 4-fachen Vol Puffer B resuspendiert und 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 1 µl 10 %iges NP-40 zu 100 µl Puffer A gegeben, 3 sec gevortext, 2 min auf Eis inkubiert und 5 min bei 4°C und 4000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 1,5 Vol Puffer C resuspendiert, 30 min bei 4°C geschüttelt, mit 1/10 Vol NP-40 versetzt und weitere 15 min bei 4°C inkubiert. Nach dem zentrifugieren bei 12 000 rpm und 4°C für 10 min wurde der Überstand 10 x mit einer 25 x G Kanüle aufgezogen und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde direkt weiterverwendet oder bei -80°C gelagert. Als Positivkontrolle wurden Kardiomyozyten verwendet, die 15 min bzw. 30 min lang mit 10 ng/ml TNF-alpha behandelt wurden und anschließend wie oben bereits beschrieben aufgeschlossen wurden.

Puffer A	Puffer B	Puffer C
in PBS	10 mM HEPES, pH 7,5	20 mM HEPES, pH 7,5
1 mM β -Glycerolphosphat	0,1 mM EDTA	1 mM EDTA
1mM Natriumpyrophosphat	0,1 mM EGTA	1 mM EGTA
1 mM Natrium-o-vanadat	10 mM KCl	400 mM NaCl
1 mM DTT	1 mM DTT	20 % Glycerin
5mM Natriumfluorid	1 mM β -Glycerolphosphat	1 mM DTT
	1mM Natriumpyrophosphat	1 mM β -Glycerolphosphat
	1 mM Natrium-o-vanadat	1mM Natriumpyrophosphat
	5mM Natriumfluorid	1 mM Natrium-o-vanadat
		5mM Natriumfluorid

vor Gebrauch wurde zu jedem Puffer 1 Tablette Protease-Inhibitor-Cocktail (Mini Complete, Roche) / 10 ml Puffer hinzugegeben

2.2.10.2 Präparation des Gels und der H-2k NF- κ B Sonde

Für 50 ml Gellösung wurden: 10 ml 30 % Acrylamid/Bisacrylamidlösung

44 ml ddH₂O

6 ml 10 x TBE

450 μ l APS

45 μ l TEMED

zusammen pipettiert, das Gel gegossen und bis zur Verwendung bei 4°C gelagert.

Für die Herstellung der NF- κ B-Sonde wurden:

- 250 ng ds H-2k-Oligo
- 2,5 μ l 10 x Klenow Puffer
- 3,5 μ l α -³²P dATP (9,25 MBq)
- 1,8 μ l 5 mM dNTPs (ohne dATP)
- 15,7 μ l ddH₂O
- 1 μ l Klenow (8 U)

zusammen pipettiert, bei 37°C für 30 min inkubiert und anschließend über eine Quiaquick Säule (Quiagen) nach Herstellerangaben aufgereinigt. Die Einbaurrate sollte ungefähr 100 000 cpm/ μ l Sonde betragen.

2.2.10.3 Electrophoretic Mobility Shift Assay

5 µg Kernlysat wurden mit:

- 10 µl 2 x Probenpuffer
- 1 ml poly-dIdC (2 mg/ml Roche)
- 1 µl BSA (10 mg/ml)
- 1 µl DTT (100 mM)
- 20 000 cpm der radioaktiven NF-κB-Sonde
- x ddH₂O (Endvolumen: 20 µl)

versetzt und 30 min bei RT inkubiert. In der Zwischenzeit wurde das Acrylamidgel in die Laufkammer überführt und diese mit 1 x TBE gefüllt. Es folgte ein Vorlauf des Gels bei 26 mA für 30 min ohne Proben. Anschließend wurden die Proben auf das Gel geladen. Als Laufmarker wurde in einer Geltasche 5 µl Bromphenolblaulösung pipettiert. Die Proben wurden dann bei 26 mA für 2 h elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel auf Whatmanpapier für 1 h bei 80°C getrocknet und 24 h bei RT in einem Phosphoimager-Screen exponiert. Die Detektion erfolgte mit dem Fujiscanner 3500 und der Basreader- bzw. Aida Software von Raytest.

2 x Probenpuffer

40 mM HEPES, pH 7,9-8,0
120 ml KCl
8 % Ficoll

TBE

90 mM Tris
90 mM Borsäure
2 mM EDTA

2.2.11 Immunfärbung von Kryoschnitten

Die Mäuse wurden durch zervikale Dislokation getötet und Herz und Quadriceps entnommen. Das Gewebe wurde ÜN mit 4 % PFA (für Antikörperfärbung) bei 4°C fixiert. Anschließend erfolgte eine Dehydratisierung mit 30 % Saccharose bei RT für 6 h. Das Gewebe wurde dann mit Tissue Tek O.C.T (Vogel) eingebettet und am Cryocut 3000 (Leica) bei -23°C 5 µm dick geschnitten und auf APES-beschichtete Objektträger übertragen. Die Kryoschnitte wurden anschließend bei -20°C gelagert.

Für die Immunfärbung wurden die Kryoschnitte 1 h bei 37°C getrocknet und dann für 15 min mit 2 % PFA in PBS-Azide (0,02 %) pH 7,4 fixiert. Nachdem die Schnitte zweimal für 5 min mit PBS-Azide gewaschen wurden, erfolgte die Permeabilisierung und Blockierung für 1 h bei RT. Anschließend erfolgten erneut zwei Waschschrte für 15 min mit PBS-Azide und Inkubation bei 4°C ÜN mit den primären Antikörpern. Die Schnitte wurden dann 6 x 10 min

bei RT mit PBS-Azide gewaschen und anschließend mit den sekundären Antikörpern für 2 h bei 4°C und 1 h bei RT inkubiert. Nicht gebundener sekundärer Antikörper wurde 6 x 10 min bei RT mit PBS-Azide gewaschen und die Kerne 30 min mit DAPI gefärbt. Anschließend wurden die Präparate 2 x 5 min mit PBS-Azide und 3 x 1 min mit ddH₂O gewaschen und mit Fluorescence Mounting Medium (DakoCytomation) eingedeckelt. Die Analyse der Schnitte erfolgte mit der Software LSM 5 Image Browser (Zeiss) und Photoshop (Adobe) am konfokalen Lasermikroskop (Zeiss, LSM 5 Pascal Version 3.0 SP2).

Permeabilisierung/Blockierung

10 % Goatserum

0,3 % Triton X-100

0,2 % BSA

in PBS

2.2.12 Elektronenmikroskopie

Die 5 bzw. 10 Tage alten Titinkinaseregion-KO-Mäuse wurden mit Ether getötet und anschließend mit 4 %iger PFA-Lösung perfundiert. Herz und Quadriceps wurden entnommen und in 2,5 % Glutardialdehyd in PBS bis zu 5 Tage bei 4°C fixiert. Das Gewebe wurde dann mit 1 % OsO₄ für 2 h nachfixiert, mit Ethanol und Propylenoxid dehydriert und in Poly/Bed^R 812 (Polysciences, Inc., Eppelheim) eingebettet. Die ultradünnen Schnitte (70 nm) wurden anschließend mit Uranylacetat und Bleicitrat kontrastiert. Die Analyse der Schnitte erfolgte mit dem Zeiss 910 Elektronenmikroskop und der CCD Kamera von Proscan.

PFA-Lösung

4 % Paraformaldehyd

1,25 % Glutardialdehyd (EM-grade)

0,08 % Phosphatpuffer

0,2 M Phosphatpuffer

0,2 M KH₂PO₄

0,2 M Na₂HPO₄ x 2 H₂O

2.2.13 Apoptosebestimmung

Für die Apoptosebestimmung wurde der „In Situ Cell death detection kit, Fluorescein“ von Roche verwendet und nach den Herstellerangaben verfahren.

2.2.14 Real Time PCR

2.2.14.1 RNA-Isolierung aus Mäuseherzen

100 mg Gewebe wurde in 1 ml Trizol überführt und 3 x 20 sec mit einem Ultra-Turrax T-8 (Ika-Werk) homogenisiert. Anschließend wurden 0,2 ml Chloroform zum Lysat gegeben, 5 min bei RT geschüttelt und 10 min bei 12 000 rpm und 4°C zentrifugiert. Die obere Phase wurde in ein neues Eppi überführt, mit 0,5 ml Isopropanol versetzt und 10 min bei RT inkubiert. Es erfolgte eine erneute Zentrifugation bei 4°C und 12 000 rpm für 10 min. Das Pellet wurde in 1 ml 75 % Ethanol gewaschen und 10 min bei 7500 rpm und 4°C zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet bei RT getrocknet und in nukleasefreiem Wasser gelöst. Die RNA-Konzentration wurde bei 260 und 280 nm in einem Spektrophotometer bestimmt.

2.2.14.2 RNA Aufreinigung

Die RNA wurde für 20 min bei 37°C mit DNase (2 U, Ambion) behandelt und anschließend mit dem RNA Easy Kit von Quiagen nach Herstellerangaben aufgereinigt. Es erfolgte erneut eine Konzentrationsbestimmung. Die Qualität der RNA wurde anschließend in einem 1,2 % Formamidgel überprüft. Dabei wurde nach den Angaben des RNA Easy Kits von Quiagen verfahren.

2.2.14.3 cDNA-Synthese

Für die Synthese von cDNA aus RNA wurde der Thermoscript first strand cDNA Synthese Kit von (Invitrogen) verwendet und nach Herstellerangaben verfahren.

2.2.14.4 RT-PCR

Für die Real Time PCR wurde der qPCR Master Mix Plus Kit (Eurogentec) verwendet und nach Herstellerangaben verfahren. Die PCR erfolgte bei:

Schritt	Temperatur	Zeit
1. Anlagerung	50°C	2 min
2. Denaturierung	95°C	10 min
3. Denaturierung	95°C	15 sec
4. Amplifizierung	60°C	1 min
5. 50 Zyklen Schritt 3 und 4		
6. Lagerung bei 4°C		

Die Daten wurden mit dem Sequence Detection System 1.2 von Applied Biosystem ausgewertet. Die dabei verwendete CT-Methode ist im Handbuch 2 des ABI PRISM 7700 Sequence Detection System beschrieben.

2.2.15 Tamoxifenbehandlung

Für die Tamoxifeninjektionen der induzierbaren Titinkinaseregion-KO-Mäuse wurden 100 mg Tamoxifen in 0,6 ml absolutem Ethanol aufgelöst, mit 9,4 ml Erdnußöl versetzt und gut durchmischt. Anschließend wurde die Lösung aliquotiert und bei -20°C gelagert (Kuhbandner et al., 2000). Für die Versuche wurden nur männliche 6-8 Wochen alte Tiere verwendet, wobei 30 mg Tamoxifen/kg Körpergewicht oder nur Lösungsmittel (Kontrolle) intraperitoneal einmal 5 Tage oder zweimal 5 Tage, mit zwei Tagen Pause dazwischen, injiziert wurden. 5, 10, 30, 65 oder 80 Tage nach der letzten Injektion wurde das Herz entnommen und für weitere Versuche aufgearbeitet.

2.2.16 Versuche an isolierten Herzen

Den Tamoxifen- und Lösungsmittel-behandelten Titinkinaseregion-KO-Tieren wurde 60 mg/kg Pentobarbiton zur Betäubung und 1000 IU/kg Heparin zur Blutverdünnung intraperitoneal injiziert. Anschließend wurde das Herz entnommen und über die Aorta mit Krebslösung (Tobias et al., 1995) bei konstantem Druck (80 mm Hg) und 37°C perfundiert. Dann erfolgte die Insertion eines mit entgastem Wasser gefüllten Latexballons in den linken Ventrikel (LV). Über ein Mikromanometer im Latexballon wurde der Druck gemessen. Das Herz wurde während des Versuchs in einem Intervall von 200 ms mit Elektroden stimuliert. Nach Veränderung des Füllvolumens von 17 bis 28 µl im Ballon, wurde der Druck im linken Ventrikel, 30 sec nachdem das Herz wieder gleichmäßig schlug, gemessen. Dabei wurde zwischen passivem Druck (P_p) (niedrigster Druck während der Diastole), systolischem Druck

(P_s) (höchster Druck während der Systole) und entwickeltem Druck (P_d) ($P_s - P_p$) unterschieden. Die Druckmessung erfolgte unter normalen Bedingungen und 5 min nach adrenerger Stimulation mit Dobutamin (0,2 μ M) oder adrenerger Blockade mit Propranolol (0,1 μ M). Außerdem wurde der inotrope Effekt von hohen Ca^{2+} Konzentrationen (3,5 mM) auf den linken Ventrikel getestet. Für die Berechnung des Wandstress σ wurde folgende Gleichung verwendet: $\sigma = P / [(LV_w / 1.05V + 1)^{2/3} - 1]$, wobei V_w dem Gewicht des linken Ventrikels und V dem Volumen des Ballons entspricht (MacGowan et al., 2004). Die kontraktile Eigenschaften der KO- und Kontrollherzen wurden jeweils unter hohen Volumen (1.4x V_{equ}) verglichen (Peng, 2007).

2.2.17 Spannungsmessung einzelner Myofibrillen

Linksventrikuläre Muskelfasern wurden von Lösungsmittel- und Tamoxifen- behandelten Tieren (30 Tage nach zwei Injektionswochen) entnommen und ÜN in Relaxierungslösung + 1 % Triton X-100 bei 4°C inkubiert. Die membranfreien Fasern wurden anschließend mit Relaxierungslösung gewaschen und in einer Apparatur zur Messung der Kraftentwicklung (Force Transducer, Sensor One Technologies Corporation) eingespannt. Die Messungen erfolgten bei 20-22°C und einer Sarkomerlänge von 2 μ m, die durch Laserdiffraktion bestimmt wurden (Granzier und Irving, 1995). Die Kraftentwicklung der Muskelfasern wurde in Abhängigkeit steigender Ca^{2+} Konzentrationen untersucht und anschließend unter Einbeziehung der Querschnittsfläche des Muskels zur Spannung umgewandelt (Wu et al., 2000). Die relative Spannung ergab sich aus $= [Ca^{2+}]^{nH} / (K + [Ca^{2+}]^{nH})$, wobei nH der Hillkoeffizient ist. Der partielle Druck von Calcium pCa_{50} wurde durch $-(\log K) / nH$ bestimmt.

Relaxierungslösung

40 mM Imidazol

10 mM EGTA

6,4 mM MgAc

5,9 mM NaATP

5 mM NaN_3

80 mM Kaliumpropionat

10 mM Creatinphosphat

1 mM DTT

pH 7.0 einstellen

0,04 mM Leupeptin und 0,5 mM PMSF hinzufügen

2.2.18 Serca2 Aktivitätsbestimmung

Für die Serca2 Aktivitätsbestimmung wurden die Herzen der induzierbaren Titinkinaseregion-KO und Kontroll-Tiere entnommen, gewogen und sofort in flüssigen Stickstoff weggefroren. Anschließend erfolgte die Homogenisierung mit dem Ultra-Turrax T-8 (Ika-Werk) für 5 x 10 sec auf Eis in Lysispuffer (0,033 Vol/100 mg Gewebe). Das Herzlysate wurde dann gefiltert, aliquotiert und bis zur Messung bei -80°C gelagert.

Für den Oxalat-stimulierten ⁴⁵Ca-Einbau in den sarkopasmatischen Vesikel wurden 2 µl Proteinkinaseinhibitor (Calbiochem) in ein Plastikröhrchen vorgelegt und mit 200 µl Imidazolpuffer (enthält ⁴⁵Ca) versetzt. Der Ansatz wurde für 2 min bei 37°C im WB vorgewärmt dann mit 10 µl des Homogenats (3 mg/ml) versetzt und erneut 2 min inkubiert. Anschließend wurde ein 0,45 µm Rundfilter (Milipore) auf eine Saugflasche gesetzt, 100 µl der Probe auf den Filter pipetiert und dann 2x mit 3 ml Waschpuffer gewaschen. Der Filter wurde kurz getrocknet, in ein Szintillationsgefäß überführt und 30-60 min lang bei 50-60°C inkubiert. Anschließend wurden 10 ml Szintillationsflüssigkeit über den Filter gegeben und jede Probe im Counter (Beckman) 2 min lang gemessen.

Die Serca Aktivitätsbestimmung erfolgte bei 0,346 µmol/l und 3,68 µmol/l freies ⁴⁵Ca, wobei jede Probe jeweils doppelt bestimmt wurde. Zusätzlich wurde ein dritter Ansatz mit 3,68 µmol/l freies ⁴⁵Ca + 20 µmol Rutheniumrot pipetiert. Rutheniumrot verringert den Efflux von Ca²⁺ aus dem sarkoplasmatischen Vesikel durch Inhibierung des Ryanodinrezeptors, wodurch mehr ⁴⁵Ca in den Vesikel eingebaut wird.

Nach der Messung wurden je 5 µl Probenlösung aus ca. 8 Ansätzen entnommen, auf ein trockenes Filterpapier pipetiert und ebenfalls im Counter gemessen. Die daraus resultierenden dots per minute (DPM) wurden anschließend gemittelt und die DPM/nmol Calcium berechnet (für den Standard). Die nmol Ca / mg Protein für die drei Reaktionsansätze ergaben sich aus den Mittelwerten der Doppelbestimmungen jeder Probe * 1000 / Standard / µg Protein pro Filter (15 µg).

Lysispuffer

0,25 M Saccharose
10 mM Histidin
50 mM NaH₂PO₄
10 mM NaF
1 mM EDTA
mit Tris auf pH 7,4 einstellen
0,3 mM PMSF und 0,5 mM DTT frisch dazugeben

Waschpuffer

40 mM Imidazol pH 7,0
100 mM KCl
1 mM EGTA

Pipettierschema für die Serca-Aktivitätsmessung

Imidazolpuffer	0,346 $\mu\text{mol/l}$ ^{45}Ca-Ansatz	3,68 $\mu\text{mol/l}$ ^{45}CaAnsatz
160 mM Imidazolpuffer pH 7,0	50 μl	50 μl
0,1 M NaN_3	20 μl	20 μl
2 mM EGTA	20 μl	20 μl
0,1 M Kaliumoxalat	20 μl	20 μl
50 mM ATP-Tris	20 μl	20 μl
300 mM Creatinphosphat	4 μl	4 μl
5 mM ^{45}Ca	3,2 μl	10 μl
ddH ₂ O	50,8 μl	44 μl
0,5 mg/ml Protein Kinase Inhibitor	2 μl	2 μl
Homogenat (3 mg/ml Protein)	10 μl	10 μl

Gesamtvolumen	200 μl	200 μl

Bei der Messung mit Rutheniumrot wurde zum 10 μl ^{45}Ca -Ansatz zusätzlich 10 μl Rutheniumrot (SERVA, Endkonzentration: 0,4 mM) pipettiert und der Ansatz 2 min bei 37°C im WB vorgewärmt bevor das Homogenat dazugegeben wurde.

2.2.19 Y2H-Screen**2.2.19.1 Klonierung der mutierten katalytischen Domäne der Titinkinase**

Für den Y2H-Screen wurden die katalytische Domäne von Titin und eine mutierte Form als Köderproteine verwendet. Strukturanalysen der Titinkinase zeigten, daß die Aktivierung der Kinase über den Tyrosinrest Y170 in der P+1 Schleife erfolgt. Die Mutation dieses Tyrosinrestes Y170 zu Glutamat E170 verhindert die Inaktivierung und täuscht die Phosphorylierung der katalytischen Domäne vor. Für den Basenaustausch wurde der Strategene Mutagenesis Kit verwendet, wobei jeweils die erste und die dritte Base des Tyrosintripletts TAT zu GAG mutiert wurde. Anschließend wurde sowohl das mutierte, als auch das unmutierte Plasmid pGBK-cdm_{mut} bzw. pGBK-cd (BD-Bioscience) für den Y2H-Screen in den AH109-Hefestamm transformiert.

2.2.19.2 Transformation der Baitproteine in Hefe

Für die Transformation des Köderproteins (cd/cdm^{ut}) in den AH109 Hefestamm wurde 1 ml YPDA Medium mit einer Hefekolonie angeimpft, gevortext und in einen Erlenmeyerkolben mit 50 ml YPDA Medium überführt. Die Vorkultur wurde dann ÜN bei 30°C und 250 rpm geschüttelt. Anschließend wurden 300 ml YPDA Medium mit der ÜNK auf eine OD₆₀₀=0,2-0,3 inokuliert und bei 30°C und 250 rpm bis zu einer OD₆₀₀=0,4-0,6 inkubiert. Die Zellen wurden bei 1000 g und RT für 5 min pelletiert, mit 50 ml sterilem TE gewaschen und erneut zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 1,5 ml TE/LiAc resuspendiert. 100 µl der gewonnenen kompetenten Hefezellen wurden dann mit 0,1 mg denaturierter (5 min 95°C) Lachssperma-DNA (Sigma) und 0,1 µg des Köderproteins gemischt und mit 0,6 ml PEG/LiAc/TE Lösung versetzt. Anschließend erfolgte eine Inkubation bei 30°C und 200 rpm. Nach 30 min wurde 70 µl DMSO zum Ansatz gegeben und die Zellen bei 42°C für 15 min und leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend wurde der Transformationsansatz für 1-2 min auf Eis gekühlt und dann bei RT und 14 000 rpm für 5 sec zentrifugiert. Das Pellet wurde in 0,5 ml 1 x TE resuspendiert, auf fünf 10 mm SD-Trp Platten ausplattiert und die Platten bei 30°C für 3-5 Tage inkubiert.

Berechnung der Transformationseffizienz:

$$\frac{\text{Anzahl der Kolonien (cfu)} \times \text{Gesamtvolumen } (\mu\text{l})}{\text{Ausplattiertes Volumen } (\mu\text{l}) \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \mu\text{g DNA}} = \text{cfu}/\mu\text{g DNA}$$

(cfu=colony forming units)

YPDA-Medium

20 g Bactopepton
10 g Hefeextrakt
15 ml 0,2 % Adeninhemisulfat
auf 950 ml mit ddH₂O auffüllen, pH 5,8 einstellen
nach dem autoklavieren 50 ml 40 % Glucose hinzufügen

TE/LiAc

10 % 10 x TE
10 % 10 x LiAc
80 % ddH₂O

10 x TE, pH 7,5

100 mM Tris/HCl
10 mM EDTA

10 x LiAc, pH 7,5

1 M LiAc

PEG/LiAc/TE

10 % 10 x TE
10 % 10 x LiAc

SD-Trp

2,5 g (NH₄)₂SO₄

0,85 g Hefebase ohne Aminosäuren, Ammoniumsulfat, Glucose

80 % 50 % PEG

0,3 g DO-Supplement (-Trp) (BD-Bioscience)

10 g Agar

pH 5,8 einstellen, auf 500 ml mit ddH₂O auffüllen, 15 min 121°C autoklavieren

2.2.19.3 Y2H-Screen/Verpaarung von Hefen

Eine große frische Kolonie des AH109 Hefestamm, der das Köderprotein enthält, wurde in 50 ml SC-Trp Medium angeimpft und ÜN bei 30°C und 250 rpm inkubiert. Nach Erreichen einer OD₆₀₀>0,8 wurden die Zellen bei 1000 g für 5 min zentrifugiert, der Überstand bis auf 5 ml entfernt und das Zellpellet resuspendiert. Anschließend wurde 1 ml der prätransformierten Bibliothek bei RT aufgetaut und 990 µl zusammen mit der Zellsuspension in einen 2 l Kolben überführt. Die restlichen 10 µl wurden für die Titerbestimmung eingesetzt. Die Zellsuspension wurde mit 45 ml 2 x YPDA/Kan Medium versetzt und bei 30°C und 30-50 rpm ÜN inkubiert. Nach 20 h wurde unter dem Mikroskop (400-fache Vergrößerung) die Zygotenbildung überprüft. Der Verpaarungsansatz wurde dann für weitere 4 h inkubiert. Die Zellen wurden anschließend bei 1000 g für 10 min zentrifugiert und in 10 ml 0,5 x YPDA/Kan resuspendiert. Zur Bestimmung der Transformationseffizienz wurden je 100 µl von 1:10 000, 1:1000, 1:100 und 1:10 Verdünnungen auf 10 mm SD-Leu, SD-Trp und SD-Leu-Trp Platten ausplattiert. Um schwache Interaktionen ebenfalls zu detektieren wurden je 200 µl der restlichen Zellsuspension auf 150 mm SD-His-Leu-Trp Platten ausplattiert. Die Platten wurden dann bei 30°C für 4-8 Tage inkubiert. Anschließend wurden die positiven Klone von den 3-fach defizienten Platten auf 4-fach defiziente Platten (SD-His-Leu-Trp-Ade) + α-X-gal umgestrichen und erneut inkubiert.

SD-Trp / SD-Leu / SD-Trp-Leu / SD-Trp-Leu- / His SD-His-Leu-Trp-Ade Platten

2,5 g (NH₄)₂SO₄

0,85 g Hefebase ohne Aminosäuren, Ammoniumsulfat, Glucose

0,3 g DO-Supplement -Trp / -Leu / -Trp-Leu / -Trp-Leu-His oder -Trp-Leu-His-Ade (BD-Bioscience)

10 g Agar

pH 5,8 einstellen, auf 500 ml mit ddH₂O auffüllen, 15 min 121°C autoklavieren

SC-Trp

2,5 g (NH₄)₂SO₄

0,85 g Hefebase ohne Aminosäuren, Ammoniumsulfat, Glucose

0,3 g DO-Supplement (-Trp) (BD-Bioscience)

pH 5,8 einstellen, auf 500 ml mit ddH₂O auffüllen, 15 min 121°C autoklavieren

2 x YPDA/Kan

10-15 mg/l Kanamycin in 2 x YPDA

2.2.19.4 Isolierung von DNA aus Hefe

Mehrere Kolonien eines positiven Klons wurden in 200 µl Lysis Puffer resuspendiert, mit 2 Spatelspitzen acid washed glass beads (Sigma) versetzt und für 1 min gevortext. Dann wurden 400 µl Phenol/Chloroform dazugegeben und erneut 1 min gevortext. Die Suspension wurde bei 14 000 rpm für 5 min zentrifugiert und die wäßrige Phase in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Es folgte eine zweite Extraktion mit 500 µl Phenol/Chloroform und eine dritte mit 300 µl Chloroform. Zur wäßrigen Phase wurden anschließend 1/10 Vol 3 M NaAc und 2,5 Vol absoluter Ethanol gegeben und die DNA bei -20°C für 30 min gefällt. Die DNA wurde dann bei 14 000 rpm und 4°C für 10 min pelletiert und anschließend mit 100 µl TE + RNase resuspendiert.

TE-Puffer

10 mM Tris-HCl, pH 8,0

1mM EDTA, pH 8,0

10 ml TE Puffer wurden mit 40 µl RNase (10 mg/ml) versetzt

2.2.19.5 Transformation und Isolierung von DNA aus Bakterien

Die DNA der positiven Y2H Klone wurde dann mittels Elektrotransformation in kompetente HB101 Zellen transformiert, auf LB Amp Platten ausplattiert und bei 37°C ÜN inkubiert. Je eine Kolonie eines positiven Klones wurde in 3 ml LB Amp Medium angeimpft, ÜN bei 37°C und 250 rpm inkubiert und die DNA mittels Plasmid Mini-Prep Kit (Peqlab) nach Herstellerangaben isoliert.

2.2.19.6 Restriktion und Sequenzierung

Die DNA der positiven Y2H Klone wurde mit EcoR1 und Xho1 gespalten um die Größe des Inserts zu überprüfen. Desweiteren wurde die isolierte DNA sequenziert (Big Dye Terminator Kit, Applied Biosystem). Mit der NCBI Blast-Suche wurden die positiven Klone identifiziert.

2.2.19.7 Kontrollverpaarung

Für die Kontrollverpaarung wurde eine Kolonie des Köderproteins (in AH109) und eine Kolonie des positiven Interaktionspartners (in Y187) in ein Eppendorfgefäß mit 0,5 ml YPDA Medium überführt und bei 30°C und 250 rpm 20-24 h inkubiert. Anschließend wurden je 50 µl auf SD-Trp-Leu-His + X-α-Gal-Platten ausgestrichen und bei 30°C für 3-5 Tage inkubiert.

2.2.20 Pulldownanalyse in C2C12-Zellen

2.2.20.1 Transfektion und Aufreinigung der katalytischen Titinkinase-Domäne in C2C12-Zellen

Für jeden Pulldown-Ansatz wurden drei 10 cm Zellkulturschalen mit $0,4 \times 10^6$ C2C12-Zellen ausgesät. Ein Tag später wurden jeweils 20 µg von pCGT7-cd, pCGT7-cdmut, pCGT7-Meg, pCGT7-cdmut+rd oder pCGT7-cd+rd pro 10 cm Zellkulturschale mit Calciumphosphat transfiziert (Graham und van der Eb, 1973; Wigler et al., 1978). Als Transfektions-Kontrolle diente ein pEGFP-Plasmid. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit kaltem PBS gewaschen mit 400 µl Lysispuffer 1/10 cm Schale versetzt und mit einem Douncer homogenisiert. Die Zellysate von drei 10 cm Schalen wurden in ein 2 ml Eppendorfgefäß überführt und bei 12 000 rpm 10 min bei 4°C zentrifugiert. Um das Lysat aufzureinigen wurden anschließend 50 µl Protein A Agarose beads (Roche) und 1 µg unspezifischer mouse IgG2a-AK (Diatec) zum Überstand gegeben und 2 h bei 4°C rotiert. Als Inputkontrolle wurden 25 µl des C2C12-Lysates weggefroren und später auf ein SDS-Gel aufgetragen. Für den Pulldown wurden 100 µl beads mit 500 µl kaltem PBS-Azid und 3 µg monoklonaler T7-Antikörper versetzt und 24 h bei 4°C rotiert. Anschließend wurden die beads 3 x 5 min mit kaltem PBS-Puffer gewaschen um den nichtgebundenen T7-Antikörper zu entfernen. Dabei wurde jeweils 1 ml PBS-Puffer zu den beads gegeben, das Eppendorfgefäß 3-5 x invertiert, 5 min bei 4°C inkubiert und bei 2000 rpm und 4°C für 2 min zentrifugiert. Das vorgereinigte

Zellysat wurde dann auf die T7-gekoppelten beads gegeben und ÜN oder mindestens 6 h bei 4°C rotierend inkubiert. Nach der Bindung des Fusionsproteins an die T7-gekoppelten beads folgten vier Waschschr tte mit je 1 ml Lysispuffer 1 und ein Waschschr tt mit 1 ml Lysispuffer 2 für 5 min. Als Outputkontrolle für das SDS-Gel wurden erneut 25 µl des Lysats weggefroren. Die Agarosebeads mit den gekoppelten katalytischen Titinkinasedom nen und der Megalinkontrolle wurden anschließend für LC-gekoppelte MS-Analysen (2.2.20.3) verwendet. Das C2C12-Zellysat vor und nach dem Binden an die Agarosebeads wurde auf ein 12 %iges SDS-Gel aufgetragen, geblottet und die überexprimierten Fusionsproteine mit einem T7-AK detektiert.

Lysispuffer 1

50 mM Tris pH 7,5
150 mM NaCl
1 % Triton X-100
10 % Glycerol
5 mM MgCl₂
1 mM EGTA

Lysispuffer 2

50 mM Tris pH 7,5
100 mM NaCl
0,1 % Triton X-100
10 % Glycerol
5 mM MgCl₂
1 mM EGTA

je 1 Protease-Inhibitor-Cocktail-Tablette (Roche) / 10 ml Puffer

2.2.20.2 HPLC gekoppelte Massenspektrometrie-Analyse

Für die MS-Identifizierung möglicher Bindungspartner der Titinkinasedom ne wurde pCGT7-cd, pCGT7-cdmut und pCGT7-Megalin als Kontrolle in C2C12-Zellen überexprimiert und wie in 2.2.20.1 beschrieben aufgereinigt. Um hohe Konzentrationen des T7-Antikörpers im Eluat zu vermeiden, wurde für die MS-Analyse kovalent gekoppelte T7-Protein Agarose A beads (Novagen) verwendet. Die Titinkinasekonstrukte mit den möglichen Bindungspartnern wurden 2 x mit 1,5 Vol 0,1 M Zitronensäure pH 2,2 für 10 min bei RT eluiert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 500g und RT für 10 min. Der Überstand aus beiden Elutionen wurde vorsichtig mit einer Hamiltonspritze abgenommen, vereinigt und mit 150 µl 2M Trisbase (pH 10,4)/ml Eluationsvolumen neutralisiert. Anschließend erfolgte eine Wessel-Flügge-Proteinfällung (Wessel und Flugge, 1984). Das salzfrei gewaschene Proteinpellet wurde dann mit Trypsin verdaut und die Peptide durch eine Reversed Phase Chromatographie (MDLC-System, GE Healthcare) mit einem 3 h Gradienten aufgetrennt. Dabei wurde nach dem Protokoll von Wolff verfahren (Wolff et al., 2006). Die Identifizierung der Proteine erfolgte mit einem LTQ FTICR-Massenspektrometer (Thermo

Electron Corporation), wobei die SEQUEST algorithm V27.12- und BioWorks 3.2-Software (Thermo Electron Corporation), verwendet wurden (Wolff et al., 2006).

2.2.21 Pulldownanalyse in *E. coli*

2.2.21.1 Aufschluß und Aufreinigung der GST-Fusionsproteine

Für die Pulldownanalyse in *E. coli* wurde die mutierte katalytische Domäne (cd) von Titin in den Gst-Fusionsvektor pGex4T1 (GE-Healthcare) kloniert und anschließend in *E. coli* BL21 transformiert.

Für die Überexpression des Fusionsproteins und der Kontrolle (pGex4T1-Vektor ohne Insert) wurden 200 ml LB + 2000 μ L Amp, 150 μ l Chloramphenicol (34 mg/ml), 10ml Glucoselösung (36 %) mit einer 2 ml ÜNK auf OD₆₀₀=0,05 angeimpft und bei 37°C bis OD₆₀₀=0,3 geschüttelt. Anschließend wurden 2 ml der Kultur als Kontrolle vor der Induktion entnommen, abzentrifugiert und das Pellet bei -20°C gelagert. Durch Zugabe von 100 μ l 1 M IPTG zur Kultur wurde die Expression der Fusionsproteine induziert. Anschließend wurde die Kultur für weitere 24 h bei 16°C geschüttelt und bei 4°C und 7700 g für 10 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 10 ml PBS resuspendiert und mit Ultraschall bei 70 % power and pulse für 10 min aufgeschlossen. Nach Zugabe von 0,5 ml 20 %igem Triton X-100 (Endkonzentration 1 %) wurde das Lysat für 30 min auf Eis geschüttelt und dann bei 12 000 rpm und 4°C für 10 min zentrifugiert. Das Pellet wurde bei -20°C gelagert und der Überstand für den Pulldown weiterverwendet. Für die Aufreinigung des Gst-Fusionsproteins und der Kontrolle wurden 50 μ l Glutathion Sepharose 4b beads (GE-Healthcare) in ein Eppendorfgefäß gegeben und 3 x mit 200 μ l PBS gewaschen. Die Zentrifugation erfolgte jeweils bei 500 g und 4°C für 3 min. Vom aufgeschlossenen Überstand wurde 1 ml auf die gewaschenen beads gegeben und ÜN bei 4°C oder 2 h bei RT rotiert. Der Überstand wurde aufgehoben und die beads mit PBS + 0,1 % Triton 3 x gewaschen.

Um die Expression und Aufreinigung der Fusionsproteine zu überprüfen, wurde die entnommene 2 ml Probe vor der IPTG-Induktion wie die Hauptkultur mit PBS und Triton aufgeschlossen, während das Pellet der Hauptkultur mit 1 %iger SDS Lösung 5 min bei 95°C inkubiert wurde. Beide Ansätze, sowie eine Probe des aufgeschlossenen Überstandes vor und nach der Bindung an die Separosebeads wurden mit 4-fachem Laemmlipuffer (2.2.4) versetzt, 5 min bei 95°C inkubiert und auf ein 12 %iges SDS-Gel aufgetragen.

2.2.21.2 Pulldownanalyse

Für den Pulldown wurden Mäuseherzen entnommen und sofort in flüssigen Stickstoff überführt. Anschließend wurde das Gewebe mit Mörser und Pistill zerkleinert, in einen Douncer überführt und mit 4 Vol Trispuffer versetzt. Es folgten 10-15 Douncerstöße um das Gewebe mechanisch aufzuschließen. Anschließend wurde das Lysat nochmal mit Ultraschall (50 % power und pulse) für 2 min aufgeschlossen und 20 min auf Eis inkubiert. Nach einer Zentrifugation bei 4°C und 12 000 rpm für 10 min wurde der Überstand abgenommen und die Proteinkonzentration mit Bradford bestimmt (2.2.5). Jeweils 500 µg Proteinlysate wurden mit Trispuffer auf 500 µl aufgefüllt und mit 10 µl gewaschenen Sepharosebeads versetzt. Dann erfolgte die Vorreinigung des Lysats bei 4°C für 1-2 h im Rotator. Das Lysat wurde anschließend zu den Fusionsprotein-gekoppelten beads (2.2.21.1) und der Kontrolle (Gst alleine) gegeben und ÜN bei 4°C rotiert. Der Überstand wurde dann aufbewahrt und die beads 6-10 x mit Trispuffer und 2 x mit TE gewaschen. Anschließend erfolgte die Elution der Fusionsproteine mit den möglichen Bindungspartnern. Dazu wurden 100 µl 2D-Lysispuffer auf die beads gegeben, geschüttelt und kurz bei RT inkubiert. Nach der Zentrifugation bei 500 g und RT für 5 min wurde der Überstand abgenommen und mittels 2D-Gelelektrophorese (2.2.8) aufgetrennt. Die Kontroll- und Probengele wurden mit Silber (Bloom und Goodpasture, 1976) gefärbt und mit der 2D-Software von Decodon übereinander gelegt und ausgewertet. Proteinspots, die nur im Probengel sichtbar waren wurden aus CBB gefärbten Gelen ausgeschnitten und mittels Massenspektrometrie (2.2.8.6) identifiziert.

Trispuffer

20 mM Tris pH 7,5

125 mM NaCl

1 mM EDTA

2 mM MgCl₂

2 mM CaCl₂

1 mM EGTA

1 mM PMSF

2.2.22 Statistik

Die Meßwerte einer Gruppe wurden gemittelt und die Mittelwerte zweier Gruppen durch den Students T-Test auf ihre Signifikanz hin geprüft. Dabei erfüllte ein P-Wert von $P < 0,1$ die

Signifikanzkriterien bei der 2D-Gelanalyse, während für alle anderen Untersuchungen *P<0,05 und **P<0,01 als signifikant angesehen wurde.

Für die Berechnung der Druck-Volumen-Beziehung bei den isolierten Herz-Versuchen wurde außerdem folgendes lineares Regressionsmodell benutzt: $Y = b_0 + b_x X + b_x^2 X^2 + b_d D + b_{dx} D * X + b_{dx}^2 D * X^2$, wobei Y die abhängige Variable (Wandstress), X die unabhängige Variable (V), D die Dummyvariable, b_0 der Intercept und b_i der Regressionskoeffizient ist. Daraus ergab sich $R^2 \geq 0.90$. Die Regressionskurven wurden anschließend mit dem F-Test verglichen und als signifikant $P < 0,05$ befunden.