



**Massenspektrometrische Analyse der Interaktionen von Protein mit
Proteinen und Proteinen mit niedermolekularen Verbindungen**

**Protein-protein and small molecule-protein interaction analyzed by mass
spectrometry**

Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Graduate School of Life Sciences,
Julius-Maximilians-Universität Würzburg,
Klasse Biomedizin

Vorgelegt von

Matthias Bach

aus

Böblingen

Würzburg, 2017



Eingereicht am:

Bürostempel

Mitglieder des Promotionskomitees:

Vorsitzende/r: Prof. Dr. Manfred Gessler

1. Betreuer: Prof. Dr. Andreas Schlosser

2. Betreuer: Prof. Dr. Christoph Sotriffer

3. Betreuer: Prof. Dr. Ulrike Holzgrabe

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunden ausgehändigt am:

Affidavit

I hereby confirm that my thesis entitled Protein-protein and small molecule-protein interaction analyzed by mass spectrometry is the result of my own work. I did not receive any help or support from commercial consultants. All sources and / or materials applied are listed and specified in the thesis.

Furthermore, I confirm that this thesis has not yet been submitted as part of another examination process neither in identical nor in similar form.

Würzburg,
Place, Date

Signature

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation Massenspektrometrische Analyse der Interaktionen von Protein mit Proteinen und Proteinen mit niedermolekularen Verbindungen eigenständig, d.h. insbesondere selbständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Würzburg,
Ort, Datum

Unterschrift

Danksagung

Ich möchte mich bei allen Menschen bedanken, die dazu beigetragen haben, dass diese Arbeit gelingen konnte.

Mein besonderer Dank gilt hierbei Prof. Dr. Andreas Schlosser für die Bereitstellung des interessanten Themas meiner Doktorarbeit, der sehr guten Betreuung und der überaus hilfreichen und freundlichen Diskussionen.

Bei Dr. Jens T. Vanselow möchte ich mich für die zuverlässige statistische Auswertung meiner MS-Daten und die anregenden Diskussionen bedanken. Dr. Petra Hänzelmann danke ich für die Bereitstellung der überexprimierten Proteine.

Ein weiterer Dank geht an alle aktuellen und ehemaligen Gruppenmitglieder der AG Schlosser: Henriette Uthe, Dr. Rasha ElBashir, Mirco Steger, Stephanie Lamer, Dr. Katja Vanselow, Christian Kraft, Christiane Winkler, Conny, Beate Vogt, Larissa Höll, Magnus-Carsten Huppertz. Vielen Dank für die tolle und motivierende Arbeitsatmosphäre.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei allen Mitgliedern der klinischen Forschergruppe 216, die zum Gelingen des Projektes beigetragen haben. Dr. Daniela Brännert und Dr. Anna Lehmann möchte ich hierbei besonders für die ausgiebigen Diskussionen und die ordentliche Zusammenarbeit danken. Frau Prof. Dr. Holzgrabe, Prof. Dr. Christoph Sotriffer und Dr. Manik Chatterjee und danke ich für die kompetente Projektbetreuung und die freundlichen Diskussionen. Außerdem möchte ich Raina Seupel, Xia Cheng, Joshua Weinmann und Jonathan Maier für die gute Zusammenarbeit danken. Prof. Dr. Manfred Gessler danke ich für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Zu guter Letzt möchte ich meinen Eltern, meiner Familie und meiner Frau Mirjam für die umfangreiche Unterstützung danken.

Meinen Eltern und meiner Ehefrau

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung.....	12
2	Summary	16
3	Einleitung.....	19
3.1	Massenspektrometrie	19
3.1.1	Ionisierungstechniken.....	19
3.1.1.1	Elektrosprayionisierung	20
3.1.1.2	Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation (MALDI).....	22
3.1.2	Massenanalysatoren	23
3.1.2.1	Quadrupol	24
3.1.2.2	Ionenfalle	25
3.1.2.3	Orbitrap	26
3.1.3	Bottom-up Proteomics.....	30
3.1.3.1	Verdau von Proteinen	31
3.1.3.2	LC-MS	34
3.1.3.3	Fragmentierung von Peptiden	35
3.1.3.4	Identifizierung von Peptiden und Proteinen	37
3.1.4	Quantifizierung von Proteinen und Peptiden	39
3.1.4.1	Markierungsfreie Quantifizierung (LFQ)	40
3.1.4.2	Markierung von Peptiden mit ¹⁸ O.....	42
3.1.4.3	Stable Isotope Labeling by Amino Acids in Cell Culture (SILAC).....	43
3.2	Protein-Protein Interaktionen	45
3.2.1	Co-Immunpräzipitation (Co-IP).....	46
3.2.2	Chemisches Quervernetzen von Proteinen.....	47
3.2.3	Kombination von Co-IP mit XL-MS	51
3.2.3.1	Datenauswertung von Quervernetzten Peptiden.....	52
3.3	Interaktionen von Proteinen mit niedermolekularen Verbindungen	54

3.3.1	Drug-Target Identifizierung mittels Affinitätsreinigung und Massenspektrometrie	56
3.3.2	Thermal Profiling	58
3.4	Zielsetzung der Arbeit	60
4	Material & Methoden.....	61
4.1	Chemikalien.....	61
4.2	Puffer, Kits und Lösungen.....	65
4.3	Geräte, Utensilien und Verbrauchsmaterialien.....	66
4.4	Software.....	71
4.5	Methoden.....	72
4.5.1	Interaktionen von Proteinen mit Proteinen.....	72
4.5.1.1	Crosslinking von NPL4 und UFD1 mit BS3	72
4.5.1.2	Anzucht und Ernte von Hefezellen	72
4.5.1.3	Aufschluss der Hefezellen mit Glaskügelchen	73
4.5.1.4	Cryoaufschluss von Hefezellen.....	73
4.5.1.5	Bestimmung der Proteinkonzentration mittels BCA Protein Assay Kit	73
4.5.1.6	Co-Immunpräzipitation mit HA-markierten Untereinheiten aus einem Hefelysat	74
4.5.1.7	Co-Immunpräzipitation der DNA-PK aus INA6 Zellysat	75
4.5.1.8	Crosslinking auf den Beads	75
4.5.1.9	Verdau auf den Beads	76
4.5.1.10	Western Blot	76
4.5.1.11	Silberfärbung.....	77
4.5.1.12	Synthese von Disuccinimidyl Sulfoxid (DSSO).....	77
4.5.1.13	LTQ Messungen mit der Nanospraynadel	79
4.5.1.14	Crosslinking von Cytochrom C mit DSSO.....	79
4.5.1.15	NanoLC-MS/MS Analyse für Proben mit quervernetzten Peptiden.....	79

4.5.1.16	Datenbanksuche von quervernetzten Peptiden mit StavroX.....	80
4.5.1.17	Crosslinking von UBX und p97N mit DSSO	80
4.5.1.18	MS ³ -Methode für das DSSO Crosslinking	80
4.5.1.19	Datenbanksuche für quervernetzte Peptide mit DSSO	82
4.5.1.20	Markierung der C-Termini von Peptiden mit ¹⁸ O bei pH 8	82
4.5.1.21	Markierung der C-Termini von Peptiden mit ¹⁸ O bei pH 8 und pH 6	83
4.5.1.22	Inaktivierung von Trypsin mit Pefabloc nach der ¹⁸ O-Markierung.....	83
4.5.2	Interaktionen von Protein mit niedermolekularen Verbindungen.....	83
4.5.2.1	Immobilisierung der biotinylierten Verbindungen	84
4.5.2.2	Anzucht von INA6-Zellen	84
4.5.2.3	SILAC Labeling von INA6 Zellen	84
4.5.2.4	Zellyse von INA6 Zellen	85
4.5.2.5	Anreicherung der Zielproteine	85
4.5.2.6	Verdau von Proteinen in Lösung	85
4.5.2.7	Entsalzung von Proben mit Stage Tips	85
4.5.2.8	SDS-PAGE	86
4.5.2.9	Verdau von Proteinen im Gel.....	86
4.5.2.10	NanoLC-MS/MS Analyse.....	87
4.5.2.11	MS Datenanalyse	87
4.5.2.12	MS-Datenanalyse von SILAC Experimenten.....	89
4.5.2.13	DNA-PK Kinaseassay.....	89
5	Ergebnisse und Diskussion	91
5.1	Analyse von Protein-Protein Interaktionen	91
5.1.1	Quervernetzung von Proteinen mit BS3.....	93
5.1.1.1	Quervernetzung von überexprimiertem UFD1 und NPL4 mit BS3	95
5.1.1.2	Quervernetzung des Mediator Komplexes mit BS3	103
5.1.1.3	Fazit zum Quervernetzten von Proteinen mit BS3.....	112

5.1.2	Quervernetzung von Proteinen mit dem CID-spaltbaren Crosslinker Disuccinimidylsulfoxid (DSSO).....	113
5.1.2.1	Quervernetzen von Cytochrom C mit DSSO.....	116
5.1.2.2	Quervernetzung von UBX und p97N mit DSSO.....	118
5.1.2.3	Fazit zum quervernetzten von Proteinen mit DSSO.....	124
5.1.3	Methodenentwicklung für eine optimierte Precursor-Selektion von quervernetzten Peptiden.....	125
5.1.3.1	Enzymatische Markierung der C-Termini von Proteinen mit ¹⁸ O-Wasser.....	127
5.1.3.2	Überprüfung des ¹⁸ O-Markierungsgrades von Peptiden.....	127
5.1.3.3	Markierung der Peptide aus β-Galactosidase mit H ₂ ¹⁸ O bei pH 8.....	128
5.1.3.4	Markierung der C-Termini von β-Galactosidase mit ¹⁸ O bei pH 8 und pH6..	129
5.1.3.5	Markierung der C-Termini von β-Galactosidase mit ¹⁸ O bei pH 8 und pH 6 und Inaktivierung von Trypsin mit Pefabloc.....	130
5.1.3.6	Vergleich der Peptide mit einem niedrigen Markierungsgrad.....	131
5.1.3.7	Fazit zur enzymatischen Markierung von Peptiden mit ¹⁸ O am C-Terminus.	133
5.1.4	Identifizierung von quervernetzten Proteinen über SDS-PAGE Profile.....	133
5.1.4.1	Quervernetzen des Mediator Komplexes auf magnetischen Beads mit Glutaraldehyd.....	134
5.1.4.2	XL Profile von Med2-HA und Med18-HA mit Glutaraldehyd.....	136
5.1.4.3	Fazit zur Identifizierung von quervernetzten Proteinen über SDS-PAGE Profile.....	140
5.2	Massenspektrometrie-basierte Identifizierung von Drug-targets.....	141
5.2.1	Überprüfung von unspezifischen Proteinbindungen an den Linker.....	142
5.2.2	Identifizierung potentieller Targets von α-acyl Aminocarboxamiden.....	143
5.2.2.1	Identifizierung zellulärer Targets der Substanz AH436.....	146
5.2.2.2	Identifizierung zellulärer Targets von Proteinen der Substanz AH495....	151

5.2.2.3	Vergleich der zellulären Targets der Substanzen AH436 und AH495	152
5.2.2.4	Zielproteine der α -acyl Aminocarboxamide und neuer Wirkmechanismus	153
5.2.2.5	Überprüfung der Anreicherung von PIKKs mit AH436 mittels Western Blot	155
5.2.2.6	Validierung der DNA-PK als Zielprotein der α -acyl Aminocarboxamide mittels Kinaseassay	156
5.2.2.7	Validierung der DNA-PK als Zielprotein der α -acyl Aminocarboxamide mittels Co-IP	159
5.2.2.8	Fazit zur Identifizierung der potentiellen Targets von α -acyl Amino- carboxamiden	160
5.2.3	Identifizierung zellulärer Targets von Naphtylisochinolin.....	161
5.2.3.1	Identifizierung zellulärer Targets der Substanz BG135.....	161
5.2.3.2	Identifizierung zellulärer Targets der Substanz BG138.....	163
5.2.3.3	Zielproteine der Naphtylisochinoline.....	164
5.2.3.4	Fazit zur Identifizierung der potentiellen Targets von Naphtylisochinolin	165
6	Abkürzungsverzeichnis.....	166
6.1	Allgemein	166
6.2	Aminosäuren.....	172
7	Literaturverzeichnis	173
8	Anhang.....	I
8.1	Interaktionen von Proteinen mit Proteinen.....	I
8.1.1	Quervernetzung von UFD1 und NPL4 mit BS3	I
8.1.2	Quervernetzung von Med17HA mit BS3.....	XV
8.1.3	Quervernetzen von Cytochrom C mit DSSO	XIX
8.1.4	Quervernetzen von UBX und p97N mit DSSO	XXV

8.1.5	Methodenentwicklung für die Precursor-Selektion von quervernetzten Peptiden.	XXVI
8.2	Interaktionen von Proteinen mit niedermolekularen Verbindungen	XXIX
8.2.1	Untersuchung des Gesamtproteins von INA6 Zellen nach der Behandlung mit Inhibitoren.....	XXIX
8.2.1.1	Untersuchung des Gesamtproteins von INA6-Zellen nach der Behandlung mit AH390.....	XXX
8.2.1.2	Untersuchung des Gesamtproteins von INA6-Zellen nach AUY922 Behandlung.....	XXXI
8.2.1.3	Gesamtprotein von INA6-Zellen nach Behandlung mit AH367 und AUY922	XXXII
8.2.2	Anreicherung von Proteinen mit dem potentiellen HSP70 Inhibitor AH487	XXXIII
8.2.2.1	Anreicherung von Proteinen mit Substanz AH487.....	XXXIII
8.2.3	Anreicherung von Proteinen mit Dioncochinon B.....	XXXIV
8.2.3.1	Anreicherung von Proteinen mit Substanz BG136.....	XXXIV
8.3	Abbildungsverzeichnis	XXXV
8.4	Tabellenverzeichnis	XL
8.5	Publikationen.....	XLI
8.6	Lebenslauf	Fehler! Textmarke nicht definiert.

1 Zusammenfassung

Proteine können aufgrund ihrer biochemischen Vielfalt eine Vielzahl von Interaktionen mit anderen Proteinen oder chemischen Verbindungen eingehen. Im ersten Teil dieser Arbeit wurden Protein-Protein Interaktionen mittels chemischen Quervernetzens untersucht. Das Ziel war, neue und verbesserte Methoden zu entwickeln, um Interaktionsnetzwerke zu erstellen. Im zweiten Teil wurden die Interaktionen von Proteinen mit niedermolekularen Verbindungen untersucht, um *Drug Targets* zu identifizieren und zu validieren.

Die Untersuchung von Protein-Protein Interaktionen mittels Massenspektrometrie (MS) ist eine leistungsfähige Methode, um alle potentiellen Interaktionen eines Proteins nach einer Anreicherung (Co-IP) aus einem Zelllysat zu detektieren. Durch das zusätzliche Quervernetzen dieser Proteine und anschließender MS kann ein Interaktionsnetzwerk erstellt werden, um direkte von indirekten Interaktionen unterscheiden zu können (Topology Mapping). Zur Methodenetablierung wurden kommerzielle Crosslinker und rekombinante Proteine von bekannten Interaktionspartnern mit niedriger Komplexität verwendet. Die beiden Interaktionspartner NPL4 und UFD1 konnten mit dem Crosslinker BS3 erfolgreich quervernetzt und anhand der vernetzten Peptide identifiziert werden. Im nächsten Schritt wurde dieser Arbeitsablauf auf eine Co-IP des Mediatorkomplexes aus Hefe angewendet. Die Probenkomplexität ist hierbei 500 - 1000-fach höher als bei der Verwendung von rekombinanten Proteinen. Nach der erfolgreichen Quervernetzung konnte innerhalb des Komplexes ein Interaktionsnetzwerk erstellt werden. Diese Daten passen zu dem bereits bekannten Modell des Mediatorkomplexes. Interaktionen zu bekannten Interaktionspartnern, wie der RNA-Pol II, konnten aufgrund deren substöchiometrischen Anreicherung nicht identifiziert werden.

Aufgrund der genannten Limitationen beim Quervernetzen von Proteinen wurden folgende neue und verbesserte Methoden entwickelt:

1. Verwendung des spaltbaren Crosslinkers (DSSO), der während der Messung selektiv durch niedrige Kollisionsenergie gespalten werden kann, um die Datenbanksuche zu vereinfachen. Die Funktionalität der DSSO-Strategie konnte erfolgreich am Protein Cytochrom C getestet werden. Bei der ersten Fragmentierung wird der Linker gespalten,

anschließend können die getrennten Peptide separat fragmentiert werden. Die erzeugten Daten sind mit einer Standarddatenbanksuche kompatibel, was bei gemischten Spektren von zwei Peptiden nicht der Fall wäre. Beim Quervernetzen der rekombinanten Interaktionspartner UBX und p97N mit DSSO konnte der zu bestätigende Crosslink zwischen zwei Lysinen nicht identifiziert werden. Grund hierfür könnte eine zu kurze Linkerlänge von DSSO sein. Diese Versuche brachten jedoch einige Limitationen des Ansatzes zum Vorschein, wie die Beschränkung auf die Protease Trypsin, aufgrund der positiven Ladung am C-Terminus und die Notwendigkeit von großen Proteinmengen, da das Spalten des Linkers einen zusätzlichen Intensitätsverlust für die folgende Identifizierung der Peptide mit sich bringt.

2. Da die niedrige Abundanz von quervernetzten Peptiden das Hauptproblem bei deren Identifizierung ist, wurde eine Methode entwickelt, um während der Messung direkt nach diesen niedrig abundanten Spezies zu suchen. Entscheidendes Kriterium hierfür war, dass quervernetzte Peptide zwei C-Termini haben. Diese wurden zur Hälfte enzymatisch mit ^{18}O bzw. ^{16}O markiert und wieder vereinigt. Der resultierende Massenunterschied von 8 Da ($4 \times ^{18}\text{O}$) kommt ausschließlich bei zwei quervernetzten Peptiden vor und kann während der Messung direkt gesucht werden. Die vollständige Markierung von Peptiden mit ^{18}O wurde zunächst am Protein Beta-Galaktosidase getestet. Bereits hier stellte sich heraus, dass der enzymatische Rücktausch von ^{18}O zu ^{16}O ein Problem darstellt und die Markierungseffizienz von Aminosäuren beeinflusst wird, die sich C-terminal nach der Spaltstelle befinden. Mit dieser Strategie ließ sich somit keine vollständige Markierung für alle Peptide erreichen, was für diese Strategie essentiell gewesen wäre.

3. Um alle Probleme zu umgehen, die bei der Identifizierung von quervernetzten Peptiden auftreten, wurde eine Methode entwickelt, um quervernetzte Proteine anhand von Profilen nach einer Auftrennung im Polyacrylamidgel (SDS-PAGE) zu identifizieren. Durch das Quervernetzen von Proteinen entstehen zusätzliche Proteinbanden nach einer SDS-PAGE, die im Gel nach oben verschoben sind. Alle Proteine in diesen neu erzeugten Bereichen stellen somit potentielle Interaktionspartner dar. Als Modellsystem wurde der Mediatorkomplex verwendet. Er wurde aus einem Zellysate mittels Co-IP angereichert und anschließend quervernetzt. Aus den mittels LC-MS/MS gemessenen Gelfractionen

wurden Proteinprofile erstellt und miteinander verglichen. Die Intensitätsmaxima der Proteine des Mediator Komplexes konnten in bestimmten zusätzlichen Fraktionen gefunden werden, was den indirekten Nachweis für eine Interaktion darstellt. Die Funktionalität der Strategie konnte somit bestätigt werden. Ein verbleibender Nachteil ist jedoch die zu geringe Trennleistung von Polyacrylamidgelen. Befinden sich mehr als 50 Proteine in einer Fraktion, können potentielle Interaktionspartner nicht eindeutig zu einer Untereinheit eines Komplexes zugeordnet werden.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde im Rahmen der Klinischen Forschergruppe 216 (CRU216) Interaktionen von Proteinen mit verschiedenen niedermolekularen Verbindungen massenspektrometrisch untersucht, um potentielle *Drug Targets* zu identifizieren. Diese Versuche sind vergleichbar mit Co-IP Experimenten, da sich der Arbeitsablauf nur durch die Anreicherung mittels chemischer Verbindung unterscheidet. Hierzu wurden biotinylierte Verbindungen immobilisiert und potentielle *Drug Targets* aus einem komplexen Zelllysate angereichert. Die Identifizierung der echten Bindungspartner wurde über quantitative Massenspektrometrie erreicht. Dabei wurden die angereicherten Proteine, die an die niedermolekularen Substanzen binden mit einer geeigneten Kontrollanreicherung verglichen. Mit den getesteten α -acyl Aminocarboxamiden konnten verschiedene Proteinkomplexe und interagierende Proteine spezifisch angereichert werden. Hierbei waren die vier Kinasen DNA-PK, ATM, ATR und mTOR besonders interessant, da sie mit onkogenem Signalling und Überlebensmechanismen wie der Hitzeschockantwort in Zellen des Multiplen Myeloms (MM) in Verbindung stehen. Die Inhibition der DNA-PK, ATM, ATR und mTOR mit α -acyl Aminocarboxamiden stellt somit einen möglichen Therapieansatz dar, wenn er zusammen mit hitzestressauslösenden Inhibitoren verwendet wird. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Armadillo Domäne innerhalb der potentiellen *Drug targets* signifikant angereichert wurde. Sie stellt damit eine potentielle Bindestelle der α -acyl Aminocarboxamide dar.

Abschließend wurden Proteine mit biotinylierten Naphtylisochinolin aus einem MM-Zelllysate angereichert, deren Vorläufersubstanzen eine Wirkung auf Tumorzellen und den

Malariaparasit *Plasmodium falciparum* gezeigt hatten. Hierbei konnten vor allem RNA-bindende- und mRNA-Splicing Proteine identifiziert werden, die zum Teil essentiell für das Spleißen *in-vivo* sind. Hierzu gehören mehrere Untereinheiten der Splicing Faktoren 3A und 3B. Die Veränderung der transkriptionellen Regulation und der resultierende Effekt auf Krebszellen konnte bereits in anderen Studien mit dem Inhibitor Spliceostatin A gezeigt werden, der das Spleißen beeinflusst.

2 Summary

Based on the huge biochemical variety of proteins they can interact in many different ways with other proteins or small molecules. The first part of this work is about protein-protein interactions which were investigated with chemical crosslinking. The aim of this work was the development of new and improved methods for the construction of interaction networks. The second part is about protein-small molecule interactions to identify new drug targets with subsequent validation.

Mass spectrometry (MS) is a powerful tool to investigate all protein-protein interactions after enrichment from a cell lysate (Co-IP). By adding crosslinking to Co-IP experiments it is possible to create a topology map which is important to differentiate between direct and indirect interactions. To validate the crosslinking procedure, a commercial available crosslinker and recombinant proteins of known interaction partners with low sample complexity were used. The interaction partners NPL4 and UFD1 were successfully crosslinked with BS3 and crosslinked peptides were identified with MS. Next step was to apply this workflow on the Co-IP of the yeast mediator complex. Here the sample complexity is 500 to 1000 times higher than with recombinant proteins. After successfully crosslinking, a topology map of the subunits of the mediator complex was created. The result matches the latest model of the complex. Crosslinks to known interaction partners, like the RNA-Pol II, were not identified because of their substoichiometric enrichment.

Because of the known limitations of protein crosslinking, new and improved methods were developed:

1. Application of the MS-cleavable crosslinker DSSO, which could be cleaved with low collision energy, to improve the database search of crosslinked peptides. Proof of concept was done by crosslinking Cytochrom C. In the first fragmentation step only DSSO is cleaved. Fragmentation of the separated peptides is done in the next step with higher energy. Peptid fragments are compatible with a standard database search. The application of this method on the interacting proteins UBX and p97N failed because the predicted crosslink could not be identified. This could be due to the lack of linker length of DSSO. But more important, this experiment revealed the drawbacks of the DSSO approach.

Trypsin is needed because this leads to a positive charge on the C-Terminus. Furthermore large amounts of protein are required to reach the needed intensity for all fragmentation steps.

2. Since the low abundancy of crosslinked peptides is the main issue for their identification, a new method was developed to directly search for them during the MS measurement. The defining criterion for this search was the occurrence of two C-termini in crosslinked peptides. Samples were splitted, labeled with ^{18}O or ^{16}O , and mixed again to generate a mass shift of 8 Da which is unique for crosslinked peptides. This mass shift can be used to directly search for these peptides during the measurement. Proof of concept was tested by labeling beta-galactosidase. Complete labeling could not be reached because of enzymatic back-exchange from ^{18}O with ^{16}O . Furthermore the neighbouring amino acids at the C-termini influence the labeling efficiency. Due to the incomplete labeling, the method could not be used for identifying crosslinked peptides.

3. To circumvent all problems which occur with the identification of crosslinked peptides, another method was developed to identify crosslinked proteins by their mass shift after separation on a polyacrylamide gel (SDS-PAGE). By crosslinking proteins additional protein bands are generated which appear in the upper part of the gel. All proteins in this region are potential interaction partners. Proof of concept was done by enrichment (Co-IP) of the yeast mediator complex from a cell lysate with subsequent crosslinking. From the LC-MS/MS data, profiles for every protein of the complex were generated. The additionally generated crosslink intensity peaks of interacting subunits overlapped with each other, which is the indirect proof of the functionality of this approach. The main problem with this strategy is the low separation performance. When about 50 proteins are located in one fraction, it is not possible to unambiguously match a protein to a specific subunit of the protein complex.

In the second part of this work, the interactions of proteins with small molecules were investigated by mass spectrometry, to identify potential drug targets. Biotinylated versions of active compounds were immobilized to magnetic streptavidin beads and incubated with INA6 cell lysate. By quantitative analysis of proteins, which bind to the

control beads and proteins, which bind to the inhibitor beads, potential drug targets were identified.

With the used α -acyl aminocarboxamides several protein complexes and interacting proteins were specifically enriched. These included the four kinases DNA-PK, ATM, ATR and mTOR, which are involved in oncogenic signaling and survival mechanisms. Moreover it is known, that the DNA-PK interacts with HSF1 and therefore regulates the HSF1-mediated heat shock response. The inhibition of DNA-PK, ATM, ATR and mTOR with α -acyl aminocarboxamides is a new therapeutic opportunity when it is combined with other substances which trigger the heat shock response. A potential binding site of the α -acyl aminocarboxamides is the armadillo domain, because it was significantly enriched among the potential drug targets.

Several naphtylisochinolines were also biotinylated, immobilized and incubated with INA6 cell lysate. Precursors of these substances showed activity against multiple myeloma cells and the malaria pathogen *Plasmodium falciparum*. Here we could enrich proteins which are associated with RNA-binding and mRNA splicing, including several subunits of the splicing factors 3A and 3B, which are essential for splicing. The change of the transcriptional regulation and the resulting effect on cancer cells by influencing mRNA splicing is already known and was shown by other inhibitors like Spliceostatin A.

3 Einleitung

3.1 Massenspektrometrie

Mit einem Massenspektrometer können Analyten als freie Ionen im Vakuum gemessen werden. Die grundlegenden Bauteile eines Massenspektrometers sind die Ionenquelle, um die Analyten in Form von Ionen in die Gasphase zu überführen, der Massenanalysator, um das Masse-zu-Ladung-Verhältnis zu bestimmen und der Detektor, um den Ionenstrom zu messen (Abbildung 1A). Das Ergebnis der Messung ist ein Massenspektrum, bei dem die relative Häufigkeit der Ionen gegen den m/z -Wert aufgetragen wird (Abbildung 1B).

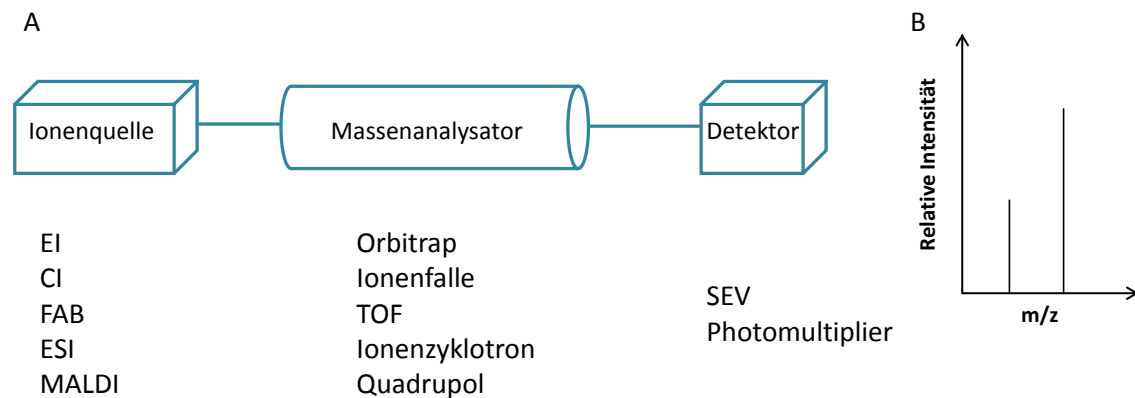


Abbildung 1: **Schematische Anordnung der Bauteile eines Massenspektrometers und ein Massenspektrum.**

Zur Analyse der Probe muss diese zunächst ionisiert werden. Das Masse-zu-Ladungs-Verhältnis (m/z) der ionisierten Analyten wird im Massenanalysator bestimmt, gefolgt von der Detektion im Detektor. Es gibt verschiedene Kombinationen dieser 3 Bauteile, die auf die jeweilige Anwendung hin optimiert werden können (Modifiziert nach (Lottspeich and Engels, 2006). B) Exemplarisches Massenspektrum: Der m/z -Wert ist gegen die relative Intensität aufgetragen.

3.1.1 Ionisierungstechniken

Die Voraussetzung für die Messung von Analyten mittels Massenspektrometrie ist die Ionisierung und die damit verbundene Überführung in die Gasphase. Methoden hierfür sind die Elektronenstoßionisation (EI, (Rapp and Englande.P, 1965)) und die chemische Ionisation (CI, (Munson and Field, 1966)). Bei der Elektronenstoßionisation wird ein Elektronenstrahl durch eine verdampfte Probe im Hochvakuum geleitet. Durch die Kollision der Elektronen

mit den Probenmolekülen werden Radikationen gebildet, die weiter in Fragmente zerfallen. Je höher die Elektronenenergie gewählt wird, desto mehr Fragmentationen werden gebildet. Die chemische Ionisation von Probenmolekülen wird durch den Transfer von Protonen aus einem Reaktantgas wie Methan herbeigeführt, das zuvor ionisiert wurde. Dabei entstehen MH^+ -Moleküle, die während des Ionisierungsprozesses weniger stark fragmentieren als die Radikationen bei der Elektronenstoßionisation.

Für große, nicht-flüchtige und thermisch instabile Substanzen sind diese Ionisierungstechniken jedoch weniger geeignet, da es bereits während der Ionisierung zur Fragmentierung bzw. thermischen Zersetzung der Probe kommt. Die Anwendung auf Proteine und Peptide setzt eine milde Ionisierung voraus, wie sie mittels Fast Atom Bombardment (FAB, (Barber et al., 1981)), Elektrospray-Ionisation (ESI, (Fenn et al., 1989)) oder Matrix-unterstützter Laser-Desorption/Ionisation (MALDI, (Karas et al., 1987)) erreicht werden kann. Letztendlich haben sich die Techniken ESI und MALDI in den Lebenswissenschaften durchgesetzt.

3.1.1.1 Elektrosprayionisierung

Bei der Elektrosprayionisierung wird ein Flüssigkeitsstrahl in einem elektrostatischen Feld durch Dispersion in viele kleine Tröpfchen aufgeteilt, die nach der vollständigen Desolvatisierung ins Massenspektrometer gelangen (Abbildung 2). Dieser Vorgang beginnt mit der kontinuierlichen Zuführung der Probe durch die Spitze einer leitfähigen Kapillare. Durch das angelegte elektrische Feld zwischen Kapillare und Massenspektrometer werden die Analyten nach ihrer Ladung getrennt. Das führt dazu, dass die positiven Ionen an die Flüssigkeitsoberfläche gezogen werden und sich in Richtung Kathode bewegen. Dieser Flüssigkeitsstrom wird auch Taylor-Konus genannt (Taylor, 1964). Dieser Konus ist in einem hohen elektrischen Feld stabil und emittiert kontinuierlich einen feinen Flüssigkeitsstrom in die Richtung des Massenspektrometers. Der Prozess der Tröpfchenbildung aus dem Konus und deren Desolvatisierung lässt sich in vier Phasen unterteilen. Es bilden sich zunächst kleine geladene Analyttröpfchen. Die Tröpfchen verlieren immer mehr Lösungsmittel, wodurch die Ladungsdichte auf der Tröpfchenoberfläche immer mehr ansteigt. Die hohe Ladungsdichte führt zum Zerfall der Tröpfchen in Mikrotröpfchen (Coulomb-Explosion) wenn deren Stabilitätsgrenze erreicht

ist (Rayleigh-Limit). Die Rayleigh-Gleichung definiert, ab wann die Ladung Q die Oberflächenspannung γ ausgleicht (Gleichung 1).

$$Q^2 = 64 \pi^2 \epsilon_0 \gamma r^3 \quad (1)$$

Mit: ϵ_0 Dielektrizitätskonstante im Vakuum

γ Oberflächenspannung

r Radius des Tröpfchens

Beim Transfer in das Massenspektrometer kommt es schließlich zur Desolvatisierung der Analytmoleküle in freie Ionen. Es gibt zwei verschiedene Modelle, die den Prozess der Ionenbildung genauer beschreiben. Das Modell des geladenen Rückstandes (charged-residue model; (Dole et al., 1968)) geht auf Dole zurück. Durch aufeinanderfolgende Coloumb-Explosionen entstehen Tröpfchen mit nur einem Analytmolekül. Eine weitere Theorie, von J. Tribane und B. Thomson, geht davon aus, dass die Emission von Ionen aus größeren Tröpfchen mit ca. 70 Ladungen und einem Durchmesser von 8 nm erfolgt (ion evaporation model; (Thomson and Iribarne, 1979)).

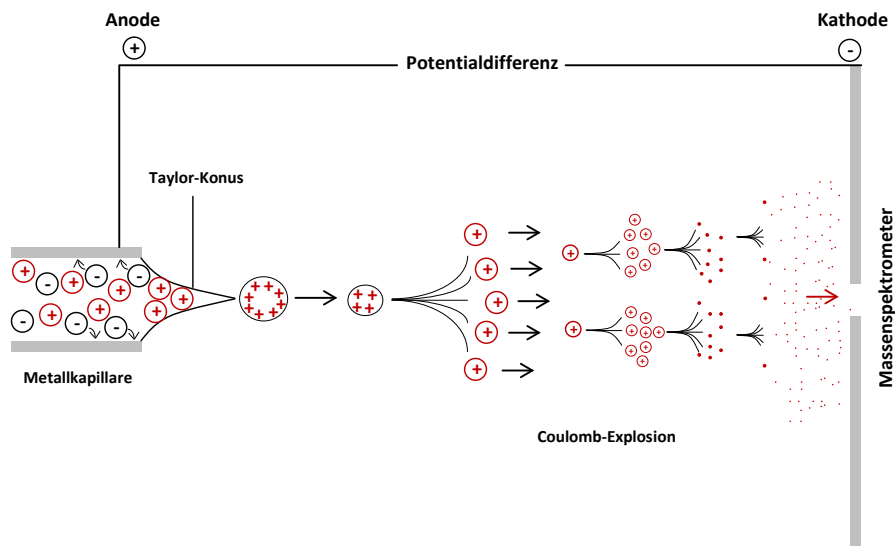


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Ionisierung einer Analytprobe während der Elektrosprayionisierung im Positiv-Ionen-Modus.

Die flüssige Probe wird durch eine Metallkapillare gepresst und innerhalb des elektrostatischen Feldes in kleine Tröpfchen aufgeteilt. Nach der Desolvatisierung der Tröpfchen liegen die Analyten als freie Ionen vor, was die weitere Charakterisierung mit dem Massenanalysator ermöglicht (Modifiziert nach (Lottspeich and Engels, 2006)).

3.1.1.2 Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation (MALDI)

Die Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation wurde von Michael Karas und Franz Hillenkamp in den 80er Jahren entwickelt (Karas et al., 1987). Hierbei wird die zu untersuchende Analytlösung zunächst mit einem 1000- bis 10000fachen Überschuss an Matrixmolekülen verdünnt. Die Matrix besteht meistens aus kleinen organischen Molekülen, die eine hohe Absorption im Bereich der verwendeten Laserwellenlänge aufweisen. Hierzu gehören aromatische Säuren wie 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB) oder α -Cyano-4-hydroxizimtsäure. Das erzeugte Gemisch wird auf der Probenplatte auskristallisiert und anschließend im Hochvakuum des Massenspektrometers mit einem kurzwelligen Laserpuls von wenigen Nanosekunden beschossen (Abbildung 3). Die Übertragung der Energie, die notwendig ist, um die Analyten in die Gasphase zu überführen, wird von den angeregten π -Elektronensystemen der Matrixmoleküle zur Verfügung gestellt. Weiterhin wird von den angeregten Matrixmolekülen, die einen Säurerest aufweisen, ein Proton auf den Analyt übertragen, der dadurch als positiv geladenes Ion vorliegt (Liao and Allison, 1995).

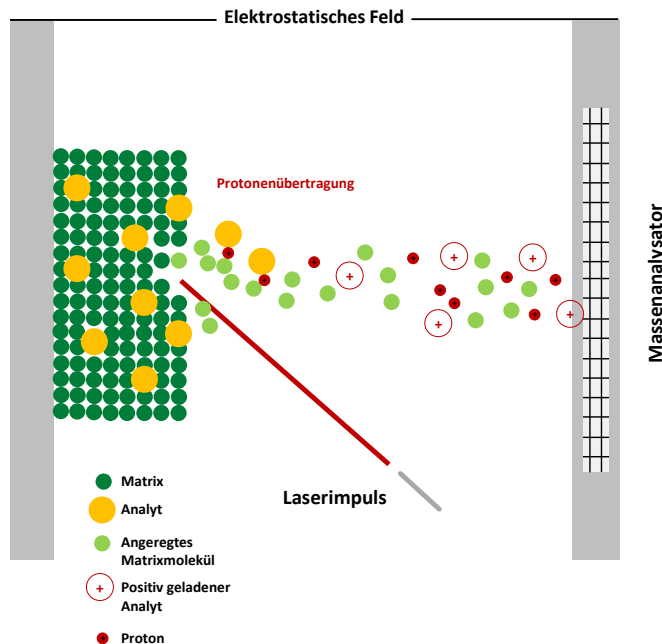


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Matrix-unterstützten Laser-Desorption/Ionisation.

Analytmoleküle werden mit Hilfe eines kurzwelligen Laserpulses und der organischen Matrix in die Gasphase überführt und können mit dem Massenspektrometer analysiert werden (Modifiziert nach (Lottspeich and Engels, 2006)).

Außerdem werden durch MALDI vor allem einfach geladene Ionen erzeugt. Dieses Phänomen wurde durch das *Lucky-Survivor*-Modell beschrieben (Karas et al., 2000).

Analytmoleküle können durchaus als mehrfachgeladene Ionen in der Matrix vorliegen, jedoch kommt es während des Ionisierungsvorganges zu einer Neutralisierung, die bei höher geladenen Spezies schneller erreicht wird als bei einfach geladenen Ionen. Dies resultiert in einem Massenspektrum mit hauptsächlich einfach geladenen Ionen, die im Vergleich zu 2-fach geladenen Ionen schlechtere Fragmentationenspektren erzeugen.

3.1.2 Massenanalysatoren

Zu den gebräuchlichsten Massenanalysatoren zählen unter anderem der Quadrupol, der Flugzeitanalysator (TOF), die Ionenfalle und die Orbitrap. Moderne Massenspektrometer sind meistens aus einer Kombination von verschiedenen Massenanalysatoren aufgebaut, um dem Nutzer möglichst viele Messoptionen zu bieten. Die ersten TOF-Massenspektrometer wurden 1948 von A. Cameron und D. Eggers gebaut (Cameron and Eggers, 1948). Fünf Jahre später folgte die Entwicklung des Quadrupols durch Wolfgang Paul, der ebenso die theoretische Grundlage für die Ionenfalle legte (Paul and Steinwedel, 1953). Mit der Einführung von Fouriertransformation-Ionenzyklotronresonanz-Massenspektrometern im Jahre 1974 wurde die Aufzeichnung von hochauflösenden Massenspektren realisiert (Comisarow and Marshall, 1974). Die neueste Generation von Massenspektrometern, die von Alexander Makarov realisiert wurde, hat einen Orbitrapmassenanalysator, der ebenfalls hohe Auflösungen erreicht (Makarov, 2000).

Massenanalysatoren sind durch folgende Parameter maßgeblich definiert. Die Auflösung R eines Massenspektrometers definiert die minimale Massendifferenz zweier m/z -Werte, die noch voneinander unterschieden werden können (Gleichung 2). Eine Definition hierfür ist die Halbwertsbreitenmethode, bei der Δm als volle Peakbreite auf 50 % der Peakhöhe (FWHM) definiert ist ((Lottspeich and Engels, 2006)).

$$R = \frac{m}{\Delta m} \quad (2)$$

Mit: m Masse

Δm Massendifferenz

Ein weiterer wichtiger Parameter ist die Massengenauigkeit. Hierbei wird die theoretische Masse des monoisotopischen Peaks mit der experimentell gemessenen Masse verglichen. Der Unterschied der beiden Massen wird als parts per million (ppm) angegeben und liegt bei Orbitrapgeräten im Bereich von 5 ppm (Marshall and Hendrickson, 2008).

Bei komplexen Proben spielt der dynamische Bereich eine große Rolle, da zugleich hoch- und niedrigabundante Analyten gemessen werden. Die Mengenverteilungen erstrecken sich hierbei über mehrere Größenordnungen. Je größer der dynamische Bereich eines Massenspektrometers ist, desto besser können Analyten mit unterschiedlichen Konzentrationen gemessen werden.

3.1.2.1 Quadrupol

Der Quadrupolmassenanalysator wurde 1953 von Paul und Steinwedel beschrieben (Paul and Steinwedel, 1953). Er besteht aus vier stabförmigen Elektroden, die in einem bestimmten Radius um die Z-Achse kreisförmig angeordnet sind (Abbildung 4). An die Elektroden liegt eine Gleich- und Wechselspannung an, wobei die gegenüberliegenden Elektroden die gleiche Polarität der Gleichspannung und die gleiche Phase der Wechselspannung haben. Die jeweiligen nebeneinanderliegenden Stäbe haben eine entgegengesetzte Polarität und eine um 180° versetzt Phase. Durch das Einstellen einer bestimmten Gleich- und Wechselspannung kann erreicht werden, dass nur Ionen mit einem bestimmten m/z -Wert auf einer stabilen Flugbahn, im elektrischen Feld, durch den Quadrupol zum Detektor gelangen (Abbildung 4, rote Flugbahn). Ionen, die einen anderen m/z -Wert haben, können keine stabile Flugbahn durch den Quadrupol beschreiben und werden durch Kollision mit den Stäben ausselektiert (Abbildung 4, grüne und blaue Flugbahn). Durch die Kombination von verschiedenen Gleich- und Wechselspannungen können jegliche m/z -Werte spezifisch selektiert werden.

Die Funktion des Quadrupols als Massenfilter wird in Kombination mit weiteren Massenanalysatoren (Q-TOF, Q-Orbitrap) genutzt, um Ionen mit bestimmten m/z -Werten für die Fragmentierung auszuwählen (Yost and Enke, 1979).

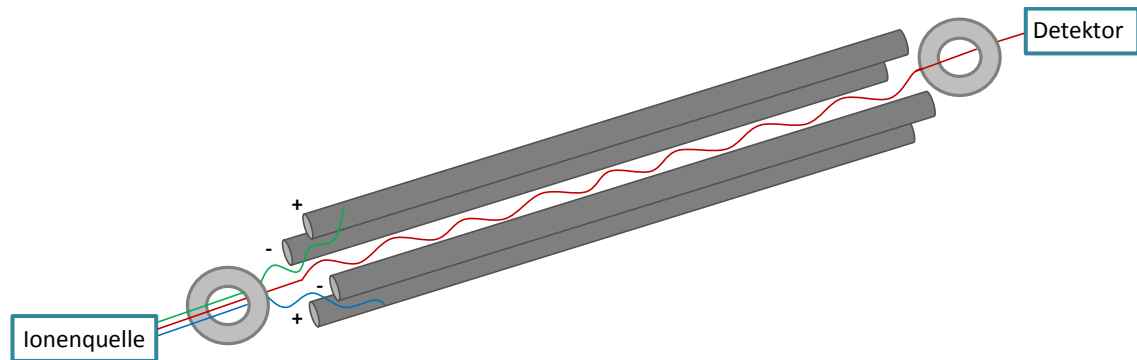


Abbildung 4: **Schematische Darstellung eines Quadrupol Massenanalysators.**

Die vier stabförmig geformten Elektroden sind kreisförmig angeordnet. An die Elektroden liegt eine Gleich- und Wechselspannung an wobei die gegenüberliegenden Elektroden die gleiche Polarität der Gleichspannung und die gleiche Phase der Wechselspannung haben. Durch das Einstellen einer bestimmten Gleich- und Wechselspannung kann erreicht werden, dass nur Ionen mit einem bestimmten m/z -Wert auf einer stabilen Flugbahn durch den Quadrupol zum Detektor gelangen (Modifiziert nach (El-Aneed et al., 2009)).

3.1.2.2 Ionenfalle

Massenspektrometer mit einer Ionenfalle als Massenanalysator sind aufgrund ihrer geringen Anschaffungskosten und hohen Sensitivität sehr verbreitet. Die Technik basiert auf der von Wolfgang Paul entwickelten Theorie der Speicherung von Ionen in einem dreidimensionalen Quadrupolfeld (Paul and Steinwedel, 1953). Eingefangene Ionen können für eine bestimmte Zeit (μs bis s) auf einer stabilen Bahn im elektrischen Feld gehalten und analysiert werden (Abbildung 5). Die Falle besteht aus einer Ringelektrode und den beiden Endkappen, die unter Wechselspannung betrieben werden. Über die Kappen werden die Ionen in und aus der Falle geleitet. Die in die Falle eintretenden Ionen werden durch Stöße mit Heliumatomen in der Falle zunächst abgebremst und gesammelt. Im Vergleich zum Quadrupol können in der Ionenfalle bei einer bestimmten Gleich- und Wechselspannung sehr viele verschiedene Ionen auf stabilen Bahnen gehalten werden. Der Massenanalyse in der Falle folgt die selektive Injektion aller Ionen aus der Falle in die Detektoren. Hierzu werden die Ionen schrittweise über den gesamten m/z -Bereich instabil gemacht. Dies geschieht durch die Erzeugung von Multipolfeldern an den Endkappen, was die Detektionsgeschwindigkeit enorm steigert. Somit übertrifft der Ionenfallen- den Quadrupolmassenanalysator im Bereich der Scanrate und Massenauflösung (Han et al., 2008).

Die Lineare Ionenfalle ist eine spezielle Form der Ionenfalle. An den Enden eines Quadrupols wird eine zusätzliche Spannung angelegt, die die Ionen am Verlassen des

Quadrupols hindert. Dadurch können Ionen mit bestimmten m/z -Werten spezifisch angereichert werden. Aufgrund ihrer schnellen Scanraten sind lineare Ionenfallen Bestandteile von Hybridmassenspektrometern, um parallel zum primären Analysator Fragmentationenspektren aufzuzeichnen.

Ein wesentlicher Nachteil der Ionenfalle ist der low mass cut-off. Für die Fragmentierung eines bestimmten m/z -Wertes wird eine bestimmte Spannung gewählt, die die Ionen destabilisiert und in den Detektor injiziert. Technisch bedingt werden dadurch aber auch Ionen destabilisiert, deren m/z -Werte kleiner als $1/3$ des ausgewählten m/z -Wertes sind (Schwartz et al., 2002). Kleine Peptidfragmente, in der Form von y_1 - und b_1 -Ionen, können aufgrund des low mass cut-off nicht mehr detektiert werden. Außerdem ist die Verwendung von kleinen Reporterionen (ITRAQ), die zur Quantifizierung von Peptiden auf MS^2 -Ebene genutzt werden, nicht möglich (Wiese, 2007).

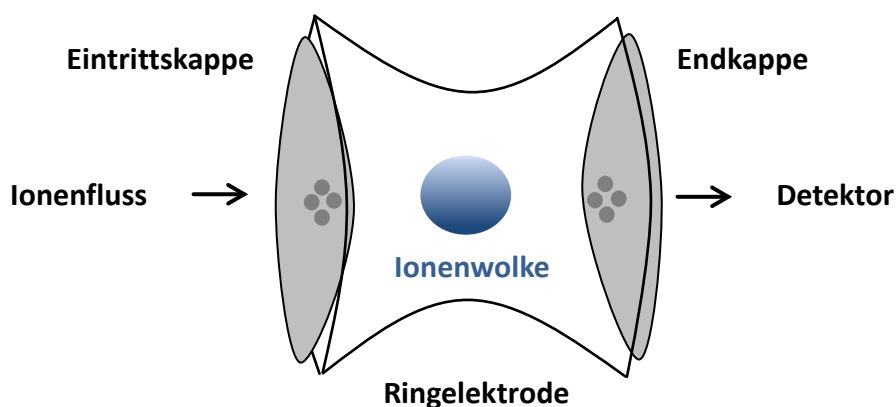


Abbildung 5: Schematischer Aufbau eines Ionenfallenmassenspektrometers.

Generierte Ionen werden über die Endkappe in die Ionenfalle geleitet und dort analysiert. Durch die Erzeugung von Multipolfeldern werden die gesammelten Ionen über die Austrittskappe in den Detektor transferiert (Modifiziert nach (Lottspeich and Engels, 2006)).

3.1.2.3 Orbitrap

Die neueste Generation von Massenspektrometern besitzt einen orbitalen Massenanalysator (Orbitrap), der von Alexander Makarov entwickelt wurde (Hu et al., 2005). Bei dieser elektrostatischen Ionenfalle werden die Ionen auf Kreisbahnen um die zentrale Spindelektrode gehalten, die von einer faßförmigen Außenelektrode umschlossen ist (Abbildung 6). Dort werden die Ionen analysiert, indem sie sich kreisförmig um die zentrale Spindelektrode bewegen. Hierbei ist die

Winkelgeschwindigkeit ω_z der Ionen auf der Z-Achse abhängig von dem m/z-Verhältnis der Ionen und der gerätespezifischen Konstante k (Gleichung 3).

$$\omega_z = \frac{k}{m/z} \quad (3)$$

Die spezifischen harmonischen axialen Oszillationen der Ionen um die Spindel werden in Form des *image current* gemessen und durch Fourier-Transformation in die m/z-Werte umgerechnet. Die dadurch erreichte hohe Auflösung wird durch längere Scanzeiten erreicht, da sie proportional zur Quadratwurzel der Oszillationen ist. Aufgrund der hohen Auflösung und Massengenauigkeit stellen Orbitrap-Massenspektrometer eine günstige Alternative zu FT-ICR-Geräten dar.

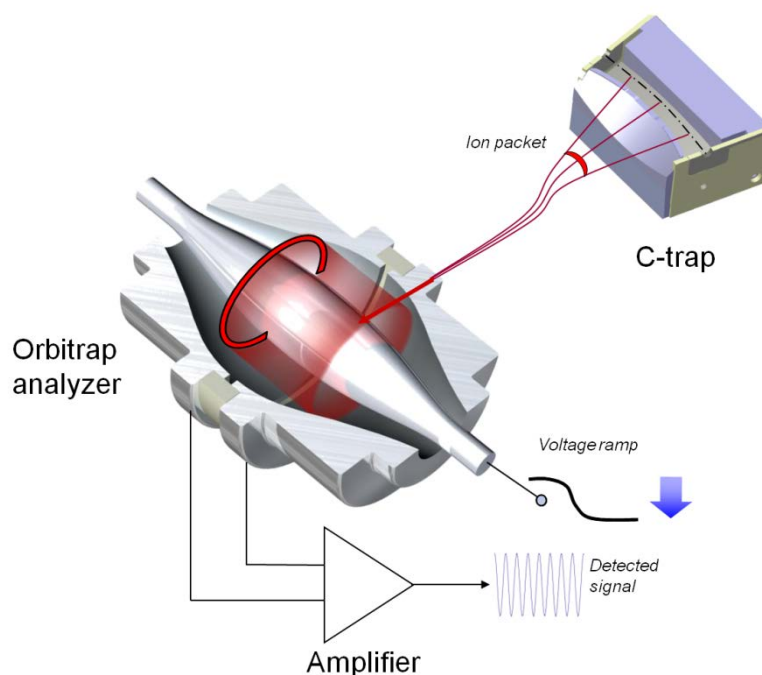


Abbildung 6: Schematischer Aufbau eines Orbitrap Massenspektrometers.

In der Mitte befindet sich die zentrale Spindelektrode, die von der faßförmigen Außenelektrode umschlossen ist. Die Ionen werden mit der C-Trap stoßweise in die Orbitrap befördert. Dort bewegen sie sich auf elliptischen Bahnen um die zentrale Elektrode. Die harmonischen Oszillationen der Ionen auf der Z-Achse werden als image current gemessen und mittels Fourier-Transformation in die m/z-Werte umgerechnet (Quelle: Thermo Fisher Scientific).

Zu analysierende Ionen durchlaufen in einem Hybridmassenspektrometer folgende Bauteile: Nachdem die Ionen mittels ESI generiert wurden, treten sie über den Probenkonus in das Massenspektrometer ein (Abbildung 7). Dort passieren sie die S-Linse, die aus flachen Ringelektroden besteht und mit Hochfrequenzspannung betrieben

wird. Die Ionen werden hier eingefangen und zu einem fokussierten Strahl gebündelt. Für den Übersichtsscan (MS^1) werden die Ionen in der C-Trap, die mit Stickstoff befüllt ist, abgebremst und gesammelt (Makarov et al., 2006). Durch Wechselstrompulse werden die Ionen über die Gateelektrode in die Orbitrap geschossen und bewegen sich dort auf stabilen Kreisbahnen um die innere Spindelelektrode. Die abundantesten Ionen aus diesem ersten Scan werden dann schrittweise für die Fragmentierung ausgewählt.

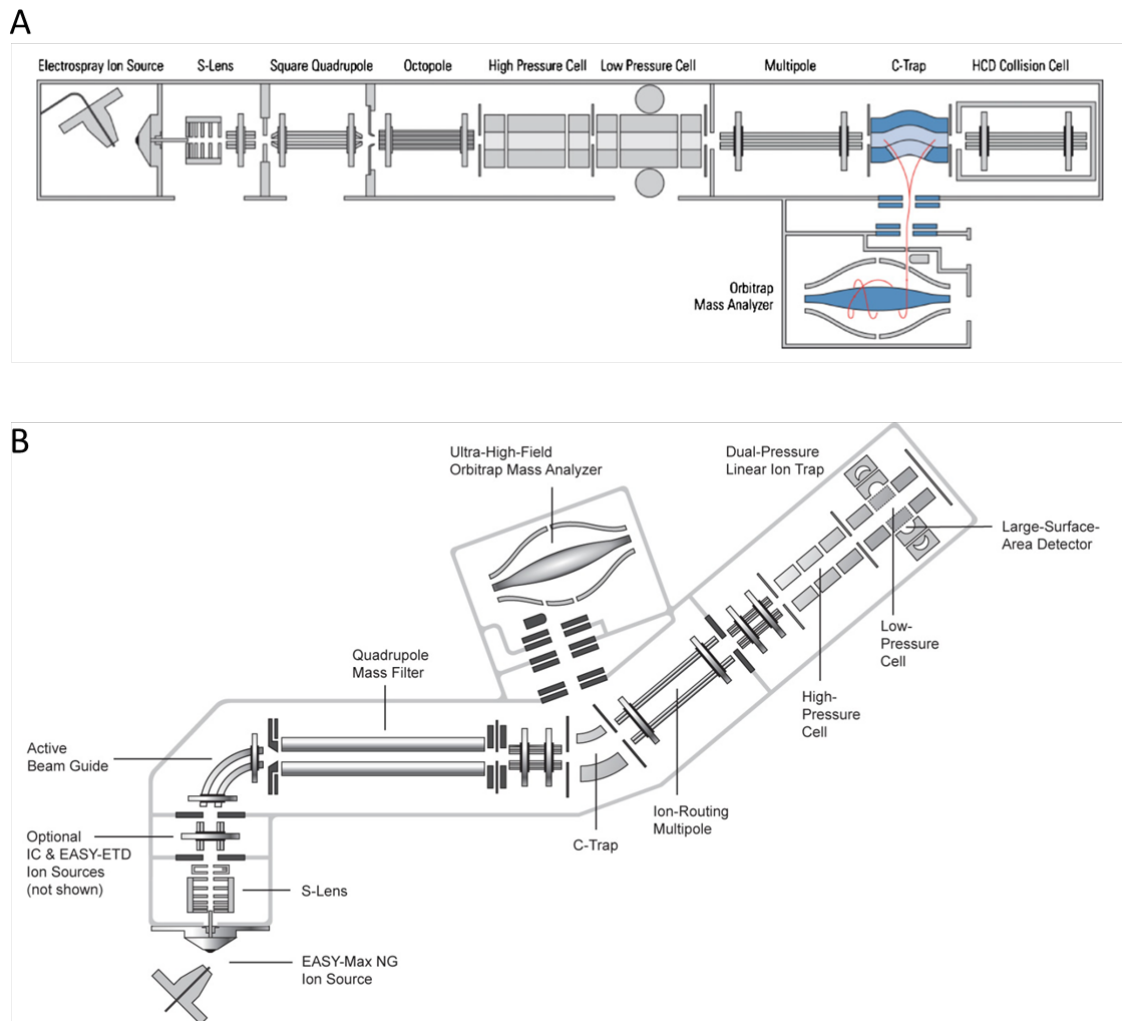


Abbildung 7: Schematischer Aufbau der Orbitrap Velos Pro (A) und der Orbitrap Fusion (B).

Die mittels ESI generierten Ionen gelangen in das Massenspektrometer und werden dort fokussiert. In der C-Trap werden sie gesammelt und in den Orbitrap-Massenanalysator geschossen. Dort bewegen sich die Ionen auf einer Kreisbahn um die zentrale Spindel. Die spezifische Oszillation der verschiedenen Ionen wird als image current gemessen und per Fourier-Transformation in den jeweiligen m/z -Wert umgerechnet. In neueren Hybridinstrumenten kommt zudem eine lineare Ionenfalle zum Einsatz, die es ermöglicht während den Scans in der Orbitrap Fragmentationsspektren aufzuzeichnen (Quelle A: (Makarov and Scigelova, 2010); Quelle B: <http://planetorbitrap.com>)).

Zwei der häufig verwendeten Messmethoden, um Ionen zu fragmentieren, sind die High/High- und die High/Low-Methode. Im High/High-Modus werden die Vorläufer- und die Fragmentionen in der Orbitrap gemessen. Beide haben somit eine hohe Auflösung und Massengenauigkeit. Im High/Low-Modus hingegen werden die Fragmentionen in der linearen Ionenfalle gemessen. Der Vorteil dieser Methode ist, dass die Messung der Fragmentionen parallel zur Messung der Vorläuferionen in der Orbitrap stattfindet und die Scanraten kürzer sind. Die schnelleren Scanraten in der Ionenfalle sind aber mit einer niedrigen Auflösung und Massengenauigkeit verbunden.

Je nach Aufbau des Massenspektrometers werden verschiedene Bauteile für das Filtern der Ionen verwendet, die später fragmentiert werden sollen. Bei einer Orbitrap Velos Pro (Abbildung 7A) werden die Ionen, die für die Fragmentierung ausgewählt wurden, in der linearen Ionenfalle selektiert und gesammelt, in die HCD-Zelle geleitet und fragmentiert, die Fragmente in der C-Trap gesammelt und in der Orbitrap analysiert (High/High). Für die High/Low-Messung in der Orbitrap Velos Pro werden die für die Fragmentierung ausgewählten Ionen in der linearen Ionenfalle gesammelt, mittels CID fragmentiert und gemessen.

Bei der Orbitrap Fusion handelt es sich um ein Tribridmassenspektrometer, das zusätzlich zur Orbitrap und zur Ionenfalle einen Quadrupol als Massenfilter beinhaltet (Abbildung 7B). Die Selektion der Ionen für die Fragmentierung kann mit dem Quadrupol oder der Ionenfalle durchgeführt werden. Außerdem können die Fragmentionen, die mit HCD oder CID generiert wurden, in der Orbitrap oder der Ionenfalle gemessen werden. Als zusätzliche Fragmentierungsoption kann zudem ETD verwendet werden.

3.1.3 Bottom-up Proteomics

Unter dem Begriff *Bottom-up Proteomics* versteht man die Identifizierung und Quantifizierung von Proteinen anhand der Peptide, die durch einen Verdau mit einer Protease entstanden sind. Diese Peptide werden mittels LC-MS/MS analysiert. Hierzu müssen die Proteine zunächst aus einer biologischen Probe wie Zellen oder einem Gewebe mit einer passenden Methode extrahiert werden (Abbildung 8).

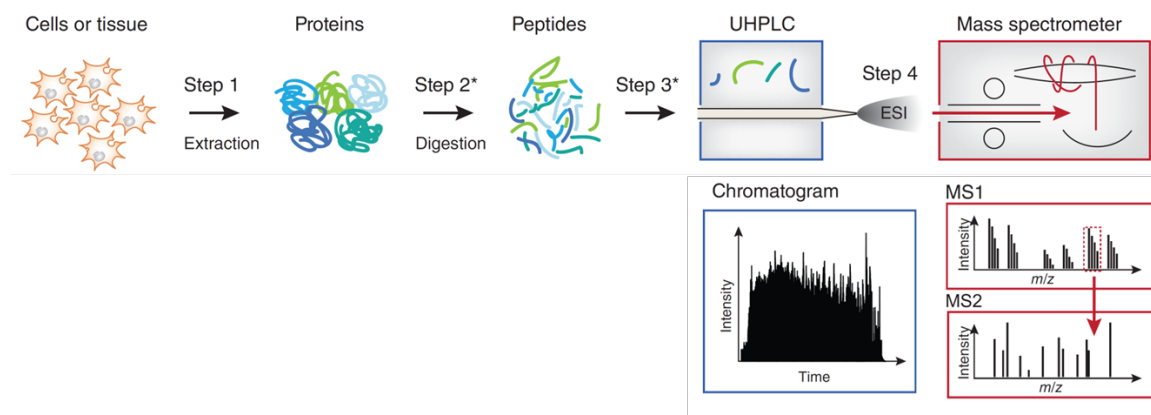


Abbildung 8: Schematische Darstellung des Bottom-up Proteomics Arbeitsablaufes, der für die Messungen von Peptiden mittel LC-MS/MS verwendet wird.

Zunächst werden die Proteine aus Zellen oder einem Gewebe extrahiert, mit einer Protease verdaut und mit Hilfe einer HPLC aufgetrennt, die online an ein Massenspektrometer gekoppelt ist. Die Ionisierung der aufgetrennten Peptide erfolgt mit Elektrosprayionisation, gefolgt von der Massenanalyse und Detektion im Massenspektrometer (Modifiziert nach (Meissner and Mann, 2014).

Dieser Schritt stellt bereits einen kritischen Punkt dar, wenn es darum geht, dem *in-vivo* Zustand der Proteine, bezüglich posttranslationaler Modifikationen oder transienter Interaktionspartner, möglichst nahe zu kommen (Leon et al., 2013).

So wird bei der Untersuchung von Phosphorylierungen neben einem Protease- zusätzlich ein Phosphataseinhibitor zugegeben, um unspezifische Dephosphorylierungen während des Aufschlussprozesses zu vermeiden. Um transiente Interaktionspartner nach einer Co-IP zu untersuchen, kann bei Hefezellen ein besonders milder Cryoaufschluss mit einer Planetenmühle angewendet werden ((Subbotin and Chait, 2014), (Uthe et al., 2017)). Die extrahierten Proteine werden dann mit einem Detergens in Lösung gebracht.

Ein weiterer Schritt, um Proteine vollständig zu entfalten und eine definierte Modifikation der entstandenen Thiole zu erreichen, ist die Reduktion und Alkylierung der Seitenketten

von Cysteinen (Abbildung 9). Die Reduktion der Disulfidbrücken führt zur besseren Denaturierung der Peptide und erzeugt zunächst reaktive Thiolgruppen. Durch die folgende Alkylierung mit Iodacetamid werden die Thiolgruppen einheitlich modifiziert. In der späteren Datenbanksuche können diese Carbamidomethylmodifikationen als feste Cysteinmodifikation mit der Masse 57.021464 Da definiert werden (Creasy and Cottrell, 2002).

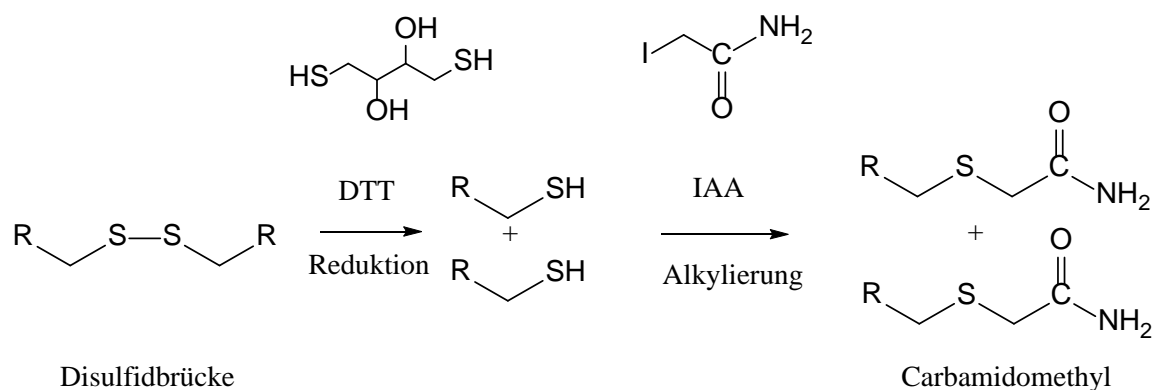


Abbildung 9: **Reaktionsschema der Reduktion und Alkylierung von Disulfidbrücken wie sie in Cysteinseitenketten vorkommen.**

Im ersten Schritt wird die Disulfidbrücke, unter der Bildung der beiden Thiole gespalten. Die reaktiven Thiole werden im zweiten Schritt selektiv mit Iodacetamid (IAA) alkyliert.

Die enorme Leistungsfähigkeit von neuen Orbitraphybridmassenspektrometern in Kombination mit Bottom-up Workflows konnte bereits in mehreren Veröffentlichungen gezeigt werden ((Geiger et al., 2012), (Nagaraj et al., 2012)). Mit einem 4 h Gradienten kann eine komplexe Probe so aufgetrennt werden, dass 100.000 Peptide bzw. 8.000 Proteine identifiziert und quantifiziert werden können. Aufgrund der enormen Datenmenge, die in nur einer Messung erzeugt wird, wurden Softwaretools entwickelt, die auf einer automatisierten Datenbanksuche basieren ((Perkins et al., 1999), (Cox and Mann, 2008)).

3.1.3.1 Verdau von Proteinen

Der Verdau der Proteine wird meistens mit Trypsin durchgeführt, da es die Proteine C-terminal von Lysin und Arginin spaltet. Die entstandenen Peptide haben durch den N-Terminus und die basische Aminosäure am C-Terminus mindestens zwei basische Reste, die für die weitere Analyse der Peptidsequenz, während der Fragmentierung im positiven Modus, vorteilhaft sind. Um eine vollständige Sequenzabdeckung der Proteine zu

erreichen, kann ein Protein mit verschiedenen Proteasen mit unterschiedlichen Schnittstellen verdaut werden. Weitere oft genutzte spezifische Proteasen sind GluC und AspN, die C-terminal nach Glutaminsäure bzw. N-terminal nach Asparaginsäure schneiden. Die Verwendung von unspezifischen Proteasen wie Elastase oder Thermolysin resultiert in einer Vielzahl von Peptiden, was zu einer guten Sequenzabdeckung führt. Allerdings entsteht somit eine höhere Probenkomplexität und die Intensität der einzelnen Peptide ist geringer als bei einer spezifischen Protease.

Für den Verdau von Proteinen können prinzipiell zwei verschiedene Ansätze gewählt werden (Abbildung 10). Beim Gelverdau wird die Probe zunächst im denaturierten Zustand mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie angefärbt. Anschließend können einzelne Proteinbanden oder ganze Gelspuren ausgeschnitten werden. Die Gelstücke werden entfärbt, gewaschen und eingetrocknet, gefolgt von der Zugabe einer Protease. Die Gelstücke quellen wieder auf und die Protease schneidet die Proteine im Gel. Nach dem Verdau werden die Peptide aus der Gelmatrix extrahiert und für die folgende MS-Messung angesäuert damit die basischen Reste für die Messung im positiven Modus protoniert sind ((Shevchenko et al., 1996), (Lundby and Olsen, 2011)).

Der Verdau von Proteinen in Lösung kann mit verschiedenen Methoden erreicht werden. Nach der Zellyse liegen die Proteine im nativen Zustand in Lysepuffer vor. Durch die Zugabe eines Detergens wie SDS, SDC oder einer chaotropen Substanz wie Harnstoff in hohen Konzentrationen, werden die Proteine denaturiert. Ein kritischer Punkt bei dieser Strategie ist, dass die denaturierende Substanz für die LC-MS/MS Messung entfernt werden muss. Bei der Filter-aided sample preparation (FASP) kann die Probe zunächst in SDS-haltigem Puffer vorliegen (Wisniewski et al., 2009). Die Probe wird dann auf einen 3-10 kDa Filter pipettiert und mit 8 M Harnstoff mehrfach gewaschen, indem die Waschlösung durch den Filter zentrifugiert wird. Anschließend muss die Probe durch die Zugabe einer Protease im Harnstoffpuffer bei Temperaturen von 18-22 °C verdaut werden, da der Harnstoff bei höheren Temperaturen mit den Seitenketten von Lysin, Arginin und dem N-Terminus reagiert (Carbamylierungen). Alternativ kann die Probe auch ohne SDS direkt mit Harnstoff denaturiert und verdaut werden.

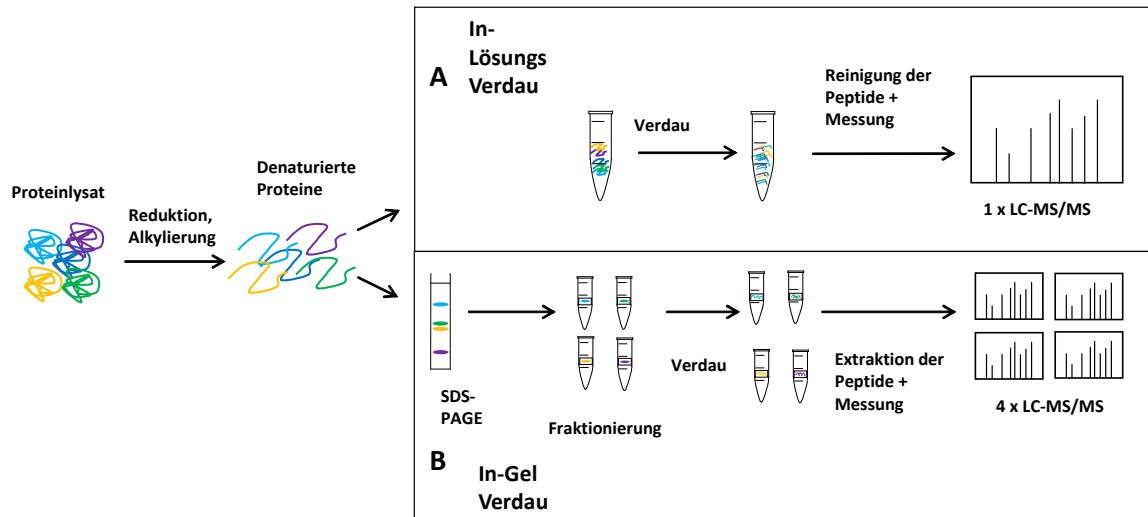


Abbildung 10: Schematische Darstellung eines (A) In-Lösungs- und eines (B) In-Gel-Verdaus.

Bei beiden Ansätzen werden die Proteine im Zelllysats zunächst reduziert und alkyliert. Die denaturierten Proteine können dann entweder in Lösung verdaut werden (A) oder über die Auftrennung mittels SDS-PAGE im Gel verdaut werden (B).

Die Verwendung von Natriumdesoxycholat (SDC) als Detergens hat den Vorteil, dass es nach dem Verdau aus der Lösung entfernt werden kann. Hierzu wird die Probe mit Essigsäureethylester gemischt und mit TFA angesäuert. Das protonierte SDC löst sich im Ethylacetat und kann von der wässrigen Phase abgetrennt werden (Masuda et al., 2008). Nachdem das restliche Ethylacetat abgedampft ist, können die Proben mittels StageTips entsalzt werden (Rappsilber et al., 2007). Hierzu werden mehrere Scheiben aus C18-Material in einer Pipettenspitze platziert. Nach der Äquilibrierung werden die Peptide auf das C18-Material geladen, gewaschen und mit Acetonitril eluiert. Die Messung der Proben erfolgt in einer leicht sauren Lösung mit 2 % Acetonitril.

Vergleicht man den Verdau im Gel mit dem Verdau in Lösung, so haben beide Methoden ihre Vor- und Nachteile. Beim Gelverdau ist die Probe frei von Detergenzien, wodurch keine Waschschritte durchgeführt werden müssen, um diese zu entfernen. Durch die Auftrennung der Probe im Gel können Proteine mit einer bestimmten Masse ausgeschnitten werden oder eine komplexe Probe für die Messungen fraktioniert werden. Durch die reduzierte Probenkomplexität können mehr niedrig abundante Proteine identifiziert werden. Im Gegensatz hierzu muss beim Verdau in Lösung das Detergens mit mehreren Wasch- oder Fällungsschritten entfernt werden. Die verdaute Probe kann durch die fehlende Fraktionierung eine hohe Probenkomplexität haben, weswegen die

Messung auf einer langen Säule mit einem längeren Gradienten durchgeführt werden muss. Der Vorteil des Verdau in Lösung ist, dass bei zwei Proben nur zwei Messungen und nicht die einzelnen Messungen der Fraktionen von den Proben miteinander verglichen werden müssen.

3.1.3.2 LC-MS

Um auch Verdau komplexerer Proteinmischungen analysieren zu können, müssen vor der Messung der Peptide Detergenzien und Puffersubstanzen entfernt werden, da die Proben mittels Umkehrphasenchromatographie und Elektrosprayionisation aufgetrennt und ionisiert werden ((Puchades et al., 1999), (Rappsilber et al., 2003)). Salze im Puffer stören die Ionisierung und Detergenzien binden an die C18-Säule und stören die Auftrennung der Peptide. Auf der hydrophoben, analytischen Säule werden die Peptide aufgrund von hydrophoben Wechselwirkungen mit der stationären und mobilen Phase aus Wasser und organischem Lösemittel wie Acetonitril aufgetrennt (Abbildung 11).

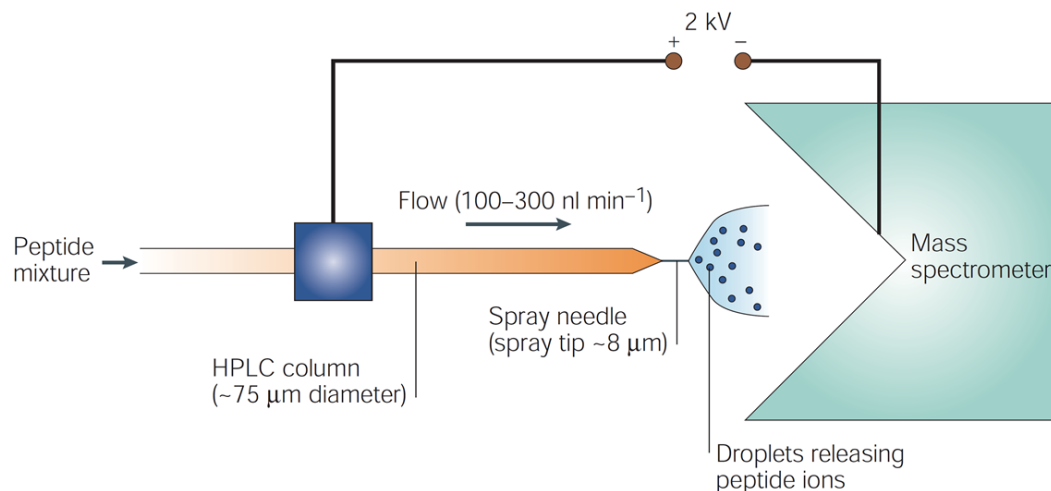


Abbildung 11: Experimentelle Anordnung eines LC-MS Experiments.

Die Peptide aus einem Proteinverdau werden über den Autosampler auf die analytische Säule geladen. Unter hohem Druck werden die Peptide auf der Säule aufgrund ihrer hydrophoben Wechselwirkung aufgetrennt, mittels ESI ionisiert und online in das Vakuum des Massenspektrometers transferiert und gemessen(Quelle: (Steen and Mann, 2004)).

Polare Peptide eluieren früher von der Säule, da sie weniger mit der Säule wechselwirken, hydrophobe Peptide hingegen binden stärker an die Säule und werden erst mit höheren Konzentrationen an organischem Lösemittel eluiert. Die Trennleistung der analytischen Säule hängt dabei maßgeblich von der Partikelgröße des Säulenmaterials ab. Durch die Verwendung eines längeren Gradienten kann die Auftrennung weiter erhöht werden. Die

LC ist mittels ESI online mit dem Massenspektrometer verbunden, wodurch eine kontinuierliche Detektion der Analyten mit dem MS erfolgt. Die dadurch generierten chromatographischen Daten werden in der Form des gemessenen Ionenstroms über die Gradientenzeit aufgezeichnet (Total Ion Current; TIC). Außerdem werden die m/z-Werte, die Intensität und die Fragmente der Peptide ermittelt (Meissner and Mann, 2014).

3.1.3.3 Fragmentierung von Peptiden

Die Fragmentierung von Peptiden kann im Massenspektrometer mit unterschiedlichen Methoden erfolgen. Zunächst wird in einem Übersichtsscan (MS^1) die Masse des Proteins oder der Peptide gemessen. Diese Vorläufermassen werden selektiv ausgewählt und können je nach Ladung und Modifikationen entsprechend fragmentiert werden. Für große Moleküle wie Proteine und lange Peptide, die eine Ladung von mehr als +3 haben oder posttranslationale Modifikationen (PTMs) aufweisen, ist die Fragmentierung mittels Elektronentransfer geeignet ((Zubarev et al., 1998), (Syka et al., 2004)). Hierbei wird mit Fluoranthren, das in die Ionenfalle geleitet wird, ein Elektron auf das selektierte Peptid oder Protein übertragen und somit die Fragmentierung induziert. Die Fragmente entstehen unabhängig von der Aminosäuresequenz in der Form von c- und z-Ionen (Abbildung 12; (Roepstorff and Fohlman, 1984), (Biemann, 1992)). Phosphorylierungen, Glykosylierungen und andere Modifikationen, die bei einer Fragmentierung mittels CID vom Peptid abgespalten werden, bleiben nach der Fragmentierung mit ETD erhalten und können genauer analysiert werden.

In einem bottom-up Experiment, bei dem die PTMs eine untergeordnete Rolle spielen und die Peptide durch den tryptischen Verdau im Regelfall eine Ladung von +2 besitzen, wird die Fragmentierung durch stoßinduzierte Dissoziation (CID oder HCD) herbeigeführt ((Hunt et al., 1986), (Frese et al., 2011)). In diesem Prozess werden die protonierten Peptide durch Anregung an der Amidbindung des Peptidrückgrats zur Kollision mit einem inerten Gas wie Helium oder Stickstoff gebracht. Dabei entstehen die Fragmentationen, wenn die interne Energie die energetische Hürde für die Spaltung einer kovalenten Bindung erreicht hat.

Die entstandenen Fragmentationen lassen sich in b- und y-Ionen unterteilen, welche die N- und C-terminale Ionenserie des Peptids widerspiegeln (Abbildung 12). Bei der

Verwendung von HCD in einer separaten Kollisionszelle besteht die Möglichkeit, kleine Reporterionen zu verwenden (ITRAQ), da die Limitation des low mass cut-off nur auf die Fragmentierung mit CID innerhalb der Ionenfalle zutrifft.

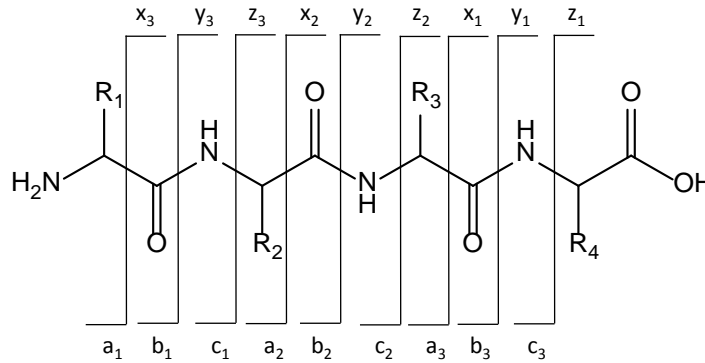


Abbildung 12: **Schematische Darstellung der Peptidfragmente nach der Nomenklatur von Biemann.** Die a-, b- und c-Ionen bilden die N-terminale Ionenserie. Die x-, y- und z-Ionen bilden die C-terminale Ionenserie.

Der Massenunterschied zwischen zwei Ionen innerhalb einer Ionenserie, entspricht der Masse einer oder mehrerer Aminosäuren des fragmentierten Peptids abzüglich der Masse von Wasser (Abbildung 13). Anhand des MS²-Spektrums kann durch manuelle Auswertung oder durch eine Datenbanksuche die Sequenz von Peptiden ermittelt werden. Bei komplexen Proteinproben können die Teilsequenzen wieder den generierten Peptiden der jeweiligen Proteine zugeordnet werden (Perkins et al., 1999).

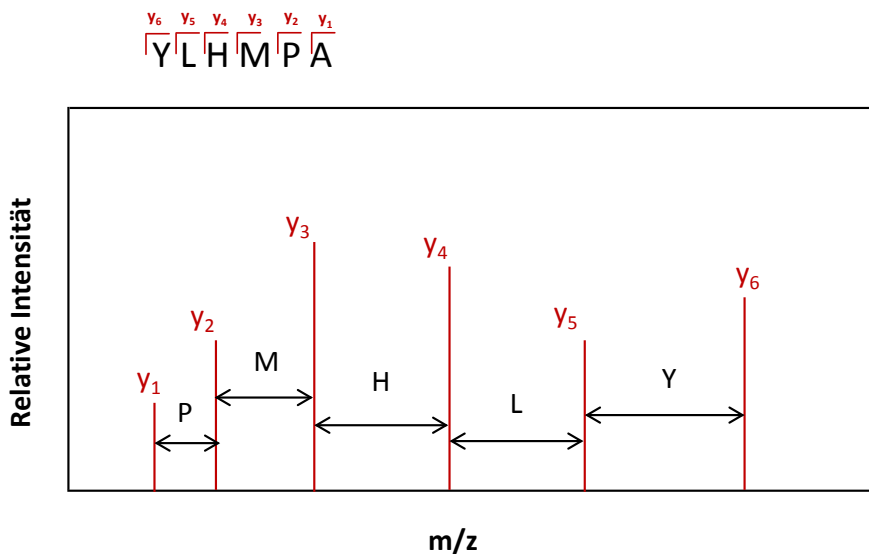


Abbildung 13: **Schematische Darstellung der y-Ionen des Peptids YLHMPA in einem Fragmentionenspektrum.** Bei einer stoßinduzierten Fragmentierung mittels CID oder HCD werden die Aminosäuren an den Peptidbindungen gespalten, was zu y- und b-Ionen führt.

3.1.3.4 Identifizierung von Peptiden und Proteinen

Nach dem Verdau der Proteine und der anschließenden Fragmentierung der Peptide, werden die MS/MS-Spektren dazu genutzt, um mit rechnergestützten Methoden die Aminosäuresequenzen der Peptide zu identifizieren. Es gibt drei grundlegende Methoden, um MS/MS-Spektren einer Peptidsequenz zuzuordnen. Diese werden im Folgenden beschrieben:

Beim *Spectral Matching* werden die experimentell generierten Fragmentationenspektren mit den theoretischen Spektren von Peptiden aus einer Datenbank verglichen (Abbildung 14).

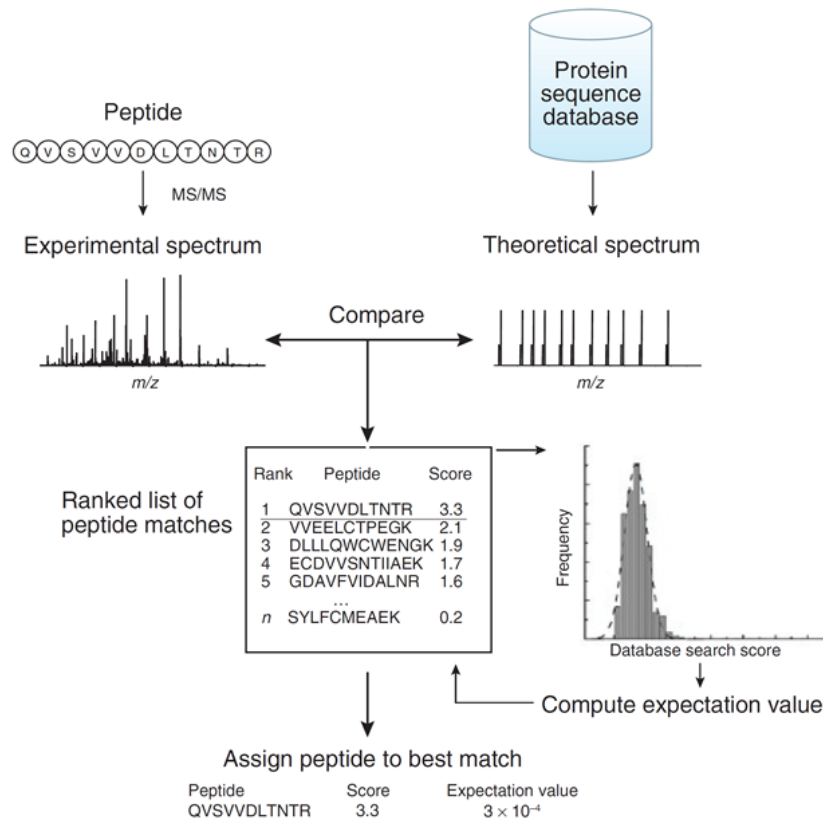


Abbildung 14: **Identifizierung von Peptiden mittels Datenbanksuche der MS/MS-Spektren.**

Die gemessenen Spektren werden mit theoretischen MS/MS-Spektren verglichen. Mit einem Scoring-Modell wird die Ähnlichkeit der Spektren ermittelt und in einer Rangliste zusammengefasst (Quelle: (Nesvizhskii et al., 2007)).

Die theoretischen Spektren beinhalten hierbei keine unterschiedlichen Intensitäten der Fragmentationen und nur kanonische Fragmente. Der Suchraum wird durch den Benutzer begrenzt, indem die Massentoleranz, die verwendete Protease und die zu erwartenden

festen und variablen Modifikationen angegeben werden. Bei den identifizierten Peptiden wird zudem zwischen den razor und unique Peptiden unterschieden. Unique Peptide haben eine einzigartige Aminosäuresequenz, die in keinem anderen Protein enthalten ist. Razor Peptide können nicht eindeutig nur einem Protein der verwendeten Datenbank zugeordnet werden (Nesvizhskii and Aebersold, 2005). Sie sind somit potentieller Bestandteil von mehreren Proteinen innerhalb einer Datenbanksuche.

Jedem potentiellen theoretischen MS/MS-Spektrum, das zu dem experimentell erzeugten Spektrum passt, wird ein Score zugeordnet, der als Indiz für die Ähnlichkeit der Spektren gilt. Besser als ein willkürlicher Score ist die Verwendung der False Discovery Rate (FDR, (Benjamini and Hochberg, 1995)). Die FDR gibt an, wie wahrscheinlich es ist, dass die Nullhypothese zutrifft und ein potentieller Datenbanktreffer als falsch positiv angegeben wird (Kall et al., 2008). Die FDR einer Datenbanksuche kann einfach ermittelt werden, indem die gleiche Suche zusätzlich gegen die umgekehrten Sequenzen durchgeführt wird (Elias and Gygi, 2007). Alle Peptide, die in der Suche umgekehrten Sequenzen zugeordnet werden können, sind falsch-positive Treffer. Diese Wahrscheinlichkeit, falsch-positive Treffer zu generieren, wird auf die Suche gegen die richtigen Sequenzen übertragen. Gebräuchlich ist die Verwendung einer FDR von 1 %, was bedeutet, dass eine Wahrscheinlichkeit von maximal 1 % für jedes MS/MS-Spektrum besteht, falsch zugeordnet zu werden. Zwei weitverbreitete Suchplattformen, die auf dem Prinzip des spectral matching basieren, sind Mascot (Perkins et al., 1999) und Maxquant (Cox and Mann, 2008).

Bei der Identifizierung mittels *Spectral Library Searching* werden die MS/MS-Spektren mit den bereits experimentell ermittelten Spektren aus einer Datenbank verglichen. Diese Spektren erhalten im Vergleich zum *Spectral Matching* die Intensitätsinformation der einzelnen Fragmente, und Peaks von nichtkanonischen Fragmentationen. Somit ist vor allem die Identifizierung von Spektren mit niedrigen Intensitäten zuverlässiger und generell schneller (Zhang et al., 2011). Mittlerweile gibt es eine Vielzahl von Suchmaschinen, die auf dem Prinzip des *Spectral Library Searching* basieren: z.B. SpectraST (Lam et al., 2007), X!Hunter (Craig et al., 2006), Bibliospec (Frewen et al., 2006).

Eine weitere Möglichkeit, um aus den gemessenen Peptidfragmenten die Peptidsequenz zu bestimmen, ist die *de-novo*-Sequenzierung (Taylor and Johnson, 1997). Hierbei werden die Peptidsequenzen mit einem Algorithmus direkt von den MS/MS-Spektren ermittelt, indem alle Kombinationen der detektierten Aminosäure angenommen werden. Durch den großen Suchraum dauert die *de novo* Sequenzierung länger als eine Datenbanksuche und als Ergebnis können auch mehrere Peptidsequenzen für ein MS/MS-Spektrum in Frage kommen. Ist die Aminosäuresequenz nicht genau bekannt, wie zum Beispiel beim variablen Teil von Antikörpern, kann diese durch eine *de-novo*-Sequenzierung ermittelt werden. Somit stellt diese Methode eine wichtige Alternative zum *Spectral Matching* und zum *Spectral Library Searching* dar. Eine leistungsfähige und benutzerfreundliche Software, die auf diesem Prinzip beruht ist das Programm Peaks (Ma et al., 2003).

3.1.4 Quantifizierung von Proteinen und Peptiden

Neben der Identifizierung von Proteinen und Peptiden ist die Quantifizierung das wichtigste Ziel in der Massenspektrometrie. Die relative Quantifizierung ist besonders für komplexe Proben mit 1000 und mehr Peptiden geeignet, bei der alle Peptide innerhalb der Probe quantifiziert werden sollen. Hierzu werden zwei oder mehrere Proben miteinander verglichen. Die Veränderungen der Proteinmengen werden relativ zur Referenzprobe angegeben. Im Rahmen der relativen Quantifizierung gibt es wiederum verschiedene Möglichkeiten, die sich hinsichtlich ihrer Genauigkeit unterscheiden (Elliott et al., 2009). Innerhalb der letzten Jahrzehnte wurden zahlreiche Markierungsstrategien entwickelt, um die relative Quantifizierung von Proteinen und Peptiden zu ermöglichen (Lehmann, 2017). Die gebräuchlichen Methoden reichen von der metabolischen Markierung aller Proteine mit stabilen Isotopen über die chemische Markierung auf Peptidebene bis hin zur markierungsfreien Quantifizierung (Abbildung 15).

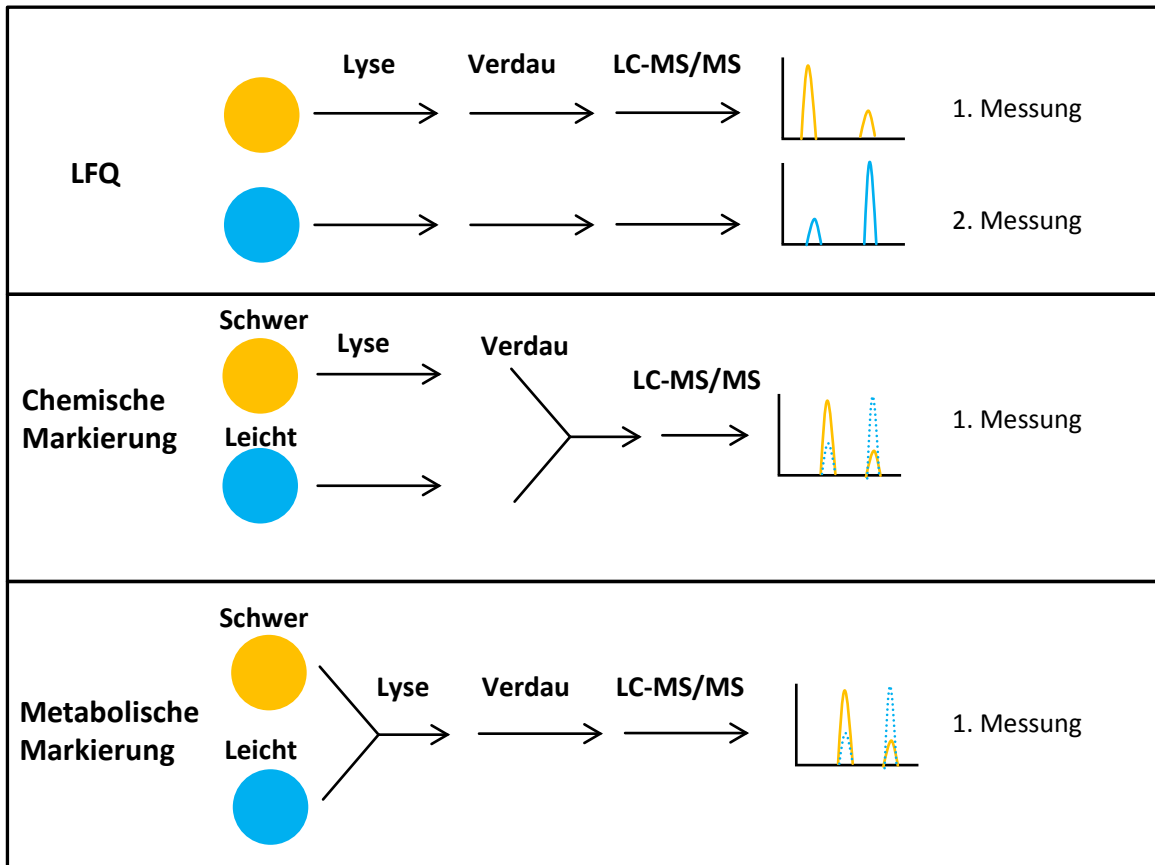


Abbildung 15: Schematische Darstellung verschiedener Markierungsstrategien, die für die relative Quantifizierung von Proteinen und Peptiden mit Massenspektrometrie verwendet werden.

Der einfachste Ansatz ist der markierungsfreie Vergleich zweier Proben (LFQ). Die Proben werden hierbei komplett parallel bearbeitet und gemessen. Erst die Datenauswertung und Quantifizierung wird zusammen durchgeführt. Bei der chemischen Markierung können die Proben bereits auf Protein- oder Peptidebene vereint werden, wodurch nur eine Messung durchgeführt werden muss. Die genaueste Methode stellt die metabolische Markierung dar, da die zu vergleichenden Proben sehr früh vereint werden können und alle folgenden Schritte zusammen durchgeführt werden (Modifiziert nach Bantscheff 2007).

3.1.4.1 Markierungsfreie Quantifizierung (LFQ)

Die markierungsfreie Quantifizierung von Peptiden und Proteinen ist eine kostengünstige Alternative zur metabolischen oder chemischen Markierung mit stabilen Isotopen (Elliott et al., 2009). Ein weiterer Vorteil ist, dass alle Probenvorbereitungsschritte entfallen, die mit der Markierung in Verbindung stehen, was zur weiteren einfachen Handhabung beiträgt. Klinische Proben, wie Gewebe oder Blut, die nicht metabolisch markiert werden können und große Datensätze, die zu viele unterschiedliche Isotopenmarkierungsvarianten benötigen, sind gute Beispiele für die Verwendung einer markierungsfreien Quantifizierung ((Megger et al., 2013), (Dephoure and Gygi, 2012)).

Die Quantifizierung der Peptide kann zum einen durch die Anzahl der Spektren (*Spectral Counting*) oder zum anderen durch die Intensität des extrahierten Ionenchromatogramms (XIC) ermittelt werden (Abbildung 16). Die Software Scaffold, die von Brian Searle entwickelt wurde, ermöglicht die Quantifizierung über die Spektrenzahl (Searle, 2010). Außerdem wird in Mascot ein sogenannter emPAI-Wert (Exponentially Modified Protein Abundance Index) angegeben, der auf den Spektrenzahlen beruht (Ishihama et al., 2005). Insgesamt betrachtet ist die Anzahl der Spektren eher eine grobe Abschätzung, wie oft eine Substanz gemessen wird, aber nicht wieviel bzw. mit welcher Intensität diese gemessen wurde.

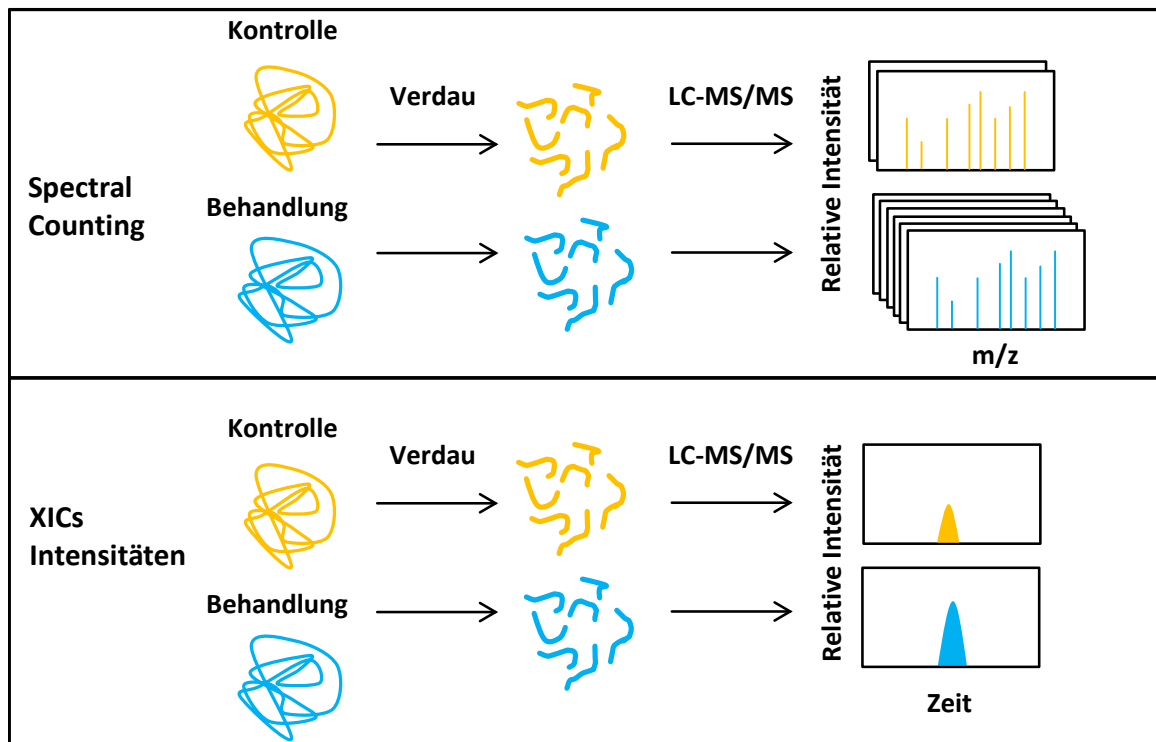


Abbildung 16 Schematische Darstellung eines markierungsfreien bottom-up workflows.

Die Probenvorbereitung und die Messung werden komplett getrennt durchgeführt. Die Quantifizierung der Proteine kann über die Anzahl der Spektren oder die Intensität der einzelnen Peptide erfolgen (Modifiziert nach (Deracinois et al., 2013).

Eine wesentlich genauere Methode, um Proteine und Peptide ohne eine Markierung zu quantifizieren, kann mit den Intensitäten der Extracted Ion Currents (XICs) erreicht werden. Dabei werden die Massen der einzelnen Ionen aus dem Total Ion Current (TIC) extrahiert und als Chromatogramm in Abhängigkeit der Intensität dargestellt. Die Option MaxLFQ, die in Maxquant implementiert ist, ermöglicht die Quantifizierung von

Proteinen über die gemessenen Intensitäten der zugehörigen Peptide aus den XICs. Gerade für niedrig abundante Peptide ist die Quantifizierung über die Peakintensitäten genauer als mit der Spektrenanzahl (Cox et al., 2014). Hierbei ist es wichtig, dass möglichst viele Peptide in allen Proben identifiziert werden, damit für die Quantifizierung der Proteine, genügend Datenpunkte zur Verfügung stehen (Cox and Mann, 2008). Zudem sorgt eine hohe Massengenauigkeit dafür, dass die XICs nicht durch andere Peptidsignale verfälscht werden.

3.1.4.2 Markierung von Peptiden mit ^{18}O

Die Markierung von Peptiden mit ^{18}O am C-Terminus und/oder an sauren Resten von Aminosäuren ist eine Methode, die zur relativen Quantifizierung verwendet wird. Innerhalb der Quantifizierungsmethoden, die in der Massenspektrometrie verwendet werden, ist sie im Hinblick auf die Genauigkeit zwischen der metabolischen Markierung und dem markierungsfreien Ansatz anzusiedeln (Miyagi and Rao, 2007). Da die Proben auf der Peptidebene markiert werden, können beide Proben wie bei der chemischen Markierung zusammen gemessen werden (Abbildung 15).

Es konnte bereits in mehreren Veröffentlichungen gezeigt werden, dass die unspezifische Markierung der Carboxylgruppen säurekatalysiert erreicht werden kann ((Murphy and Clay, 1979), (Liu et al., 2010), (Haaf and Schlosser, 2012)). Sollen jedoch nur die C-Termini markiert werden, kann durch einen Proteinverdau mit einer Protease wie Trypsin, die C-terminal nach Lysin oder Arginin spaltet, bei der Verwendung von H_2^{18}O und einem leicht basischen pH von 8, der Einbau von einem ^{18}O in die Carbonsäure des Peptides erfolgen. Gespaltene Peptide können erneut an die Protease binden und es kann zum Einbau eines zweiten ^{18}O kommen (Abbildung 17). Diese zweite Markierung dauert bei einem pH von 8 wesentlich länger und es kann zu einem Gemisch von einfach und zweifach markierten Peptiden kommen. Deshalb wurde der zweite ^{18}O Einbau bei pH 6 durchgeführten werden, da die Enzymaktivität somit deutlich gesteigert ist ((Hajkova et al., 2006), (Loftheim et al., 2010)).

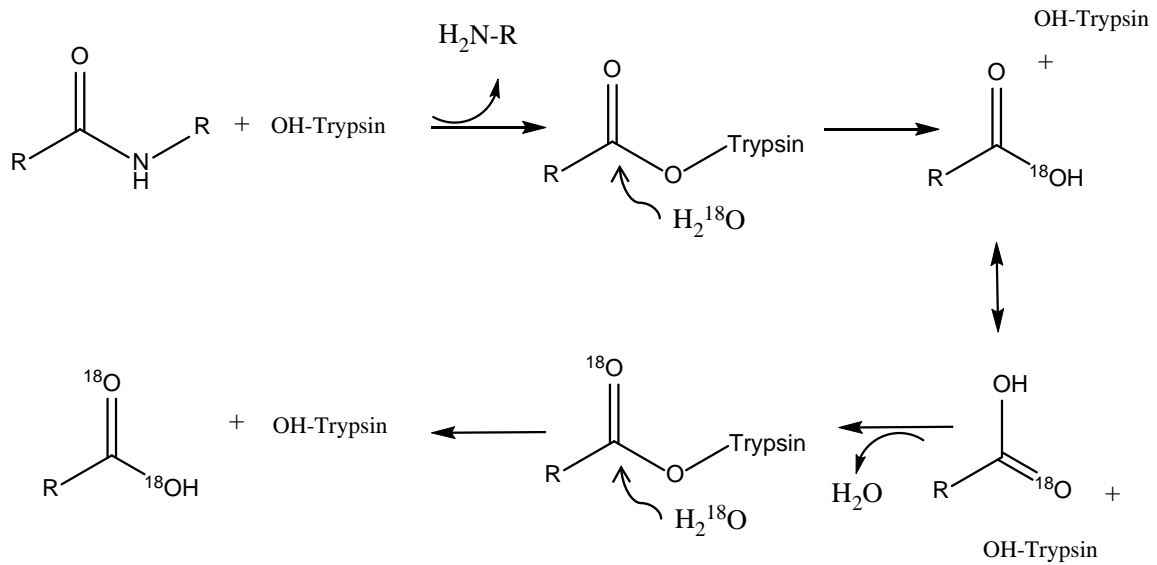


Abbildung 17: **Reaktionsschema der proteolytischen ^{18}O -Markierung von Peptiden am C-Terminus.**

Beim tryptischen Verdau entsteht ein intermediäres Enzym-Peptidester, das in ^{18}O -Wasser hydrolysiert und somit zum ersten Einbau von einem ^{18}O -Atom führt. Das markierte Peptid kann erneut mit Trypsin einen Ester bilden, wird ein weiteres Mal in ^{18}O -Wasser hydrolysiert und ist somit 2-mal mit ^{18}O -Atomen markiert.

Nach der vollständigen Markierung des C-Terminus mit zweimal ^{18}O muss in der weiteren Handhabung der Proben darauf geachtet werden, dass es nicht zu einem Rücktausch von ^{18}O durch Trypsin kommt, wenn die Probe in H_2^{16}O gemessen wird. Die Inaktivierung von Trypsin in der Probe kann durch Hitze (Petritis et al., 2009), die Absenkung des pH-Wertes (Stewart et al., 2001), die Verwendung von immobilisiertem Trypsin (Sevinsky et al., 2007) oder mit einem Proteaseinhibitor erfolgen (Dentan et al., 1996).

3.1.4.3 Stable Isotope Labeling by Amino Acids in Cell Culture (SILAC)

Die metabolische Markierung von Proteinen in menschlichen Zelllinien ist die Methode der Wahl bei der relativen Quantifizierung von komplexen Proben (Ong et al., 2002). Um einen minimalen Abstand von 6 Da zwischen leichtem und schwerem Peptid zu erreichen, reicht es bei Lysin und Arginin aus, wenn alle Kohlenstoffe als ^{13}C vorliegen. Außerdem können die vorhandenen Stickstoffatome durch ^{15}N ersetzt werden, um einen größeren Abstand der Isotopenmuster zu erreichen (Abbildung 18).

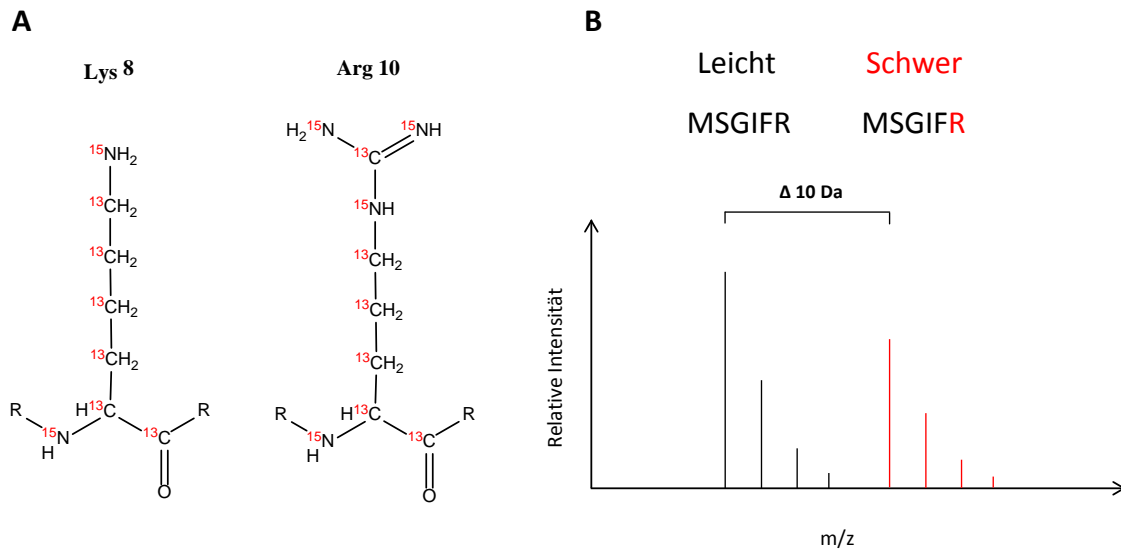


Abbildung 18: **Strukturformel der Aminosäuren Lysin und Arginin, die für das metabolische Labeling mit schweren Isotopen markiert wurden (A). Exemplarische Massenverschiebung eines Peptids, die durch SILAC erzeugt wurde (B).**

(A) Bei beiden Aminosäuren Lysin und Arginin wurden alle Kohlenstoff- und Stickstoffatome durch die stabilen Isotope ^{13}C und ^{15}N ersetzt. (B) Dadurch kommt es bei der relativen Quantifizierung im Regelfall zu einem Massenunterschied von 8 Da bei Lysin und 10 Da bei Arginin.

Die Verwendung von Lysin und Arginin hat zudem den Vorteil, dass nach dem tryptischen Verdau der Proteine jedes Peptid mindestens ein Lysin oder Arginin aufweist und somit als leichte und schwere Version vorliegt. Die metabolische Konversion von Arginin zu Prolin muss zudem beachtet werden, da es sonst zu Fehlern bei der Quantifizierung kommen kann (Ong et al., 2003). Die Zugabe von einem leichten Überschuss an Prolin ins Zellmedium kann diesen ungewünschten Effekt verhindern. Nach etwa fünf Zellverdopplungen im SILAC-Medium sind die Zellen vollständig markiert. Durch die Möglichkeit der Auswertung von SILAC-Daten mit der Software Maxquant findet diese Markierungsmethode eine breite Anwendung innerhalb des massenspektrometrischen Forschungsfeldes (Cox and Mann, 2008).

3.2 Protein-Protein Interaktionen

Protein-Protein Interaktionen sind ein wesentlicher Bestandteil von zellulären Prozessen ((Giot et al., 2003), (Li et al., 2004), (Krogan et al., 2006)). Das Verständnis dieser Interaktionen ist somit essentiell, um biologische Prozesse wie die DNA-Replikation, die Translation, das Spleißen und die Sekretion besser zu verstehen. Es gibt verschiedene Arten von Protein-Protein Interaktionen, die sich hinsichtlich ihrer Dauer, Spezifität und Position unterscheiden.

Proteine, die eine hohe Affinität zueinander haben und sogenannte Proteinkomplexe bilden sind oft dauerhaft miteinander verbunden, um eine Vielzahl von unterschiedlichen Funktionen zu erfüllen (Taatjes, 2010). Im Gegensatz hierzu stehen transiente Interaktionen, die nur sehr schwach und kurzzeitig stattfinden (Nooren and Thornton, 2003). Hierzu zählen unter anderem die Interaktionen von Kinasen mit ihren Substratproteinen (Bose et al., 2006).

Um Proteininteraktionen auf molekularer Ebene zu untersuchen gibt es verschiedene analytische, mikroskopische und molekularbiologische Methoden. Zur letzteren gehören Methoden der Expressionsklonierung, wie das *two-hybrid* System, das von Fields und Song entwickelt wurde (Fields and Song, 1989). Es basiert auf der Wirkungsweise des GAL4-Transkriptionsaktivators, der eine DNA-Bindedomäne (C-terminal) und eine saure Aktivator-domäne (N-terminal) aufweist. Wenn die Interaktion von zwei Proteinen überprüft werden soll, wird an das eine Protein die DNA-Bindedomäne und an das andere Protein die Aktivator-domäne angehängt. Interagieren die beiden Proteine miteinander, kommt es zur Expression des Reportergens. Die meisten bekannten Protein-Protein Interaktionen wurden durch große *two-hybrid*-Screenings beschrieben (Ito et al., 2001).

Eine mikroskopische Methode zur Untersuchung von Protein-Protein Interaktionen ist mittels Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer möglich (FRET). Bei dieser Methode wird zunächst das Donorfluorophor mit einer spezifischen Wellenlänge angeregt. Befindet sich der Donor wenige Nanometer vom Akzeptorfluorophor entfernt, kann die Energie strahlungsfrei übertragen werden (Förster, 1948). Der Akzeptor emittiert dann in einer spezifischen Wellenlänge, was das mikroskopische Readout darstellt. Sind sowohl der

Donor als auch der Akzeptor an zwei Proteine gekoppelt, kann eine Interaktion über die Emission des Akzeptors bestimmt werden (Jares-Erijman and Jovin, 2003).

3.2.1 Co-Immunpräzipitation (Co-IP)

Eine weitere leistungsfähige Methode um Protein-Protein Interaktionen zu identifizieren, ist die Anreicherung eines Zielproteins und dessen Interaktionspartner mittels Co-Immunpräzipitation (Abbildung 19). Die Methode beruht auf dem Prinzip, dass Antikörper mit ihrem variablen Teil sehr spezifisch an bestimmte Aminosäuresequenzen von Proteinen binden. Das antigenträgende Protein und dessen Interaktionspartner können damit aus einem komplexen Zelllysat angereichert werden. Nach der Anreicherung werden unspezifisch bindende Proteine mit Waschpuffer entfernt und die spezifischen Bindepartner und interagierenden Proteine von den Antikörpern eluiert. Dies wird durch die Denaturierung der Proteine durch ein Detergens wie SDS und/oder hohe Temperaturen (70°C) erreicht. Die Analyse der gebundenen Proteine kann nach der Auftrennung mittels SDS-PAGE mit Immundetektion (Western Blot, (Nowinski et al., 1979)) oder mittels Massenspektrometrie erfolgen.

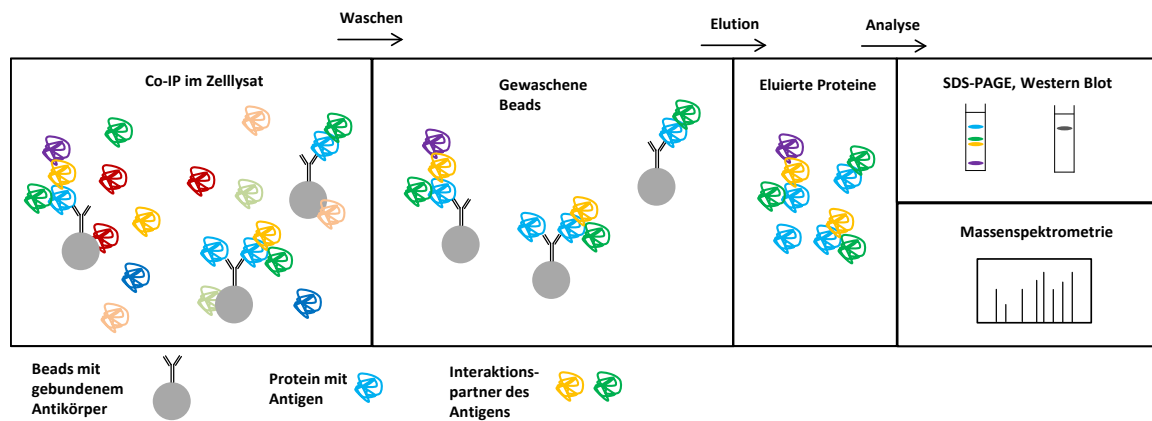


Abbildung 19: Schematische Darstellung einer Co-Immunpräzipitation.

Der Antikörper, der gegen das spezifische Antigen gerichtet ist, ist an Beads fixiert und wird mit einem Zelllysat inkubiert. Nachdem das Antigen und interagierende Proteine an den Antikörper gebunden haben werden mehrere Waschschritte durchgeführt, um nicht-spezifische Bindungspartner zu lösen. Die gebundenen Proteine werden dann von den Beads eluiert und können entweder mittels SDS-PAGE und Western Blot oder mittels Massenspektrometrie untersucht werden.

Die Methode der Wahl ist, alle Proteine nach einer Co-IP mittels Massenspektrometrie zu identifizieren, wodurch neue unbekannte Interaktionen aufgeklärt werden können. Diese Methode kann auch in quantitativer Weise mit einer Kontrollprobe genutzt werden, um spezifisch von unspezifisch unterscheiden zu können (Selbach and Mann, 2006). Beim Western Blot muss für jedes Protein ein Antikörper verfügbar sein und einzeln getestet werden. Die Analyse mittels Massenspektrometrie ist somit ein ungerichteter Ansatz, der dem Western Blot nur im Hinblick auf die Sensitivität unterlegen ist.

Für die Untersuchung von transienten Interaktionen können ein besonders milder Zellaufschluss und milde Waschbedingungen während der Co-IP zielführend sein (Uthe et al., 2017). Jedoch beinhalten die Daten keine Information über die Topologie der gefundenen Interaktionen. Jedes angereicherte Protein ist ein potentieller Interaktionspartner des Baitproteins. Um herauszufinden, wie die Proteine miteinander interagieren, kann die Aufreinigung der Proteine mit chemischem Quervernetzen und einer massen-spektrometrischen Detektion kombiniert werden (Kapitel 3.2.3, (Liu et al., 2015), (Wang et al., 2017)).

3.2.2 Chemisches Quervernetzen von Proteinen

Werden Quervernetzung und Massenspektrometrie der entstandenen vernetzten Peptide kombiniert, können Distanzinformationen von reaktiven Gruppen in Proteinen ermittelt werden. Diese Distanzeinschränkungen können dazu verwendet werden, die Struktur eines Proteins oder eines Proteinkomplexes zusammen mit anderen Methoden genauer zu definieren (Back et al., 2003; Young et al., 2000). Das chemische Quervernetzen von Proteinen wird aber auch zunehmend dafür verwendet, um direkte Proteininteraktionen nachzuweisen (Beth et al., 1986). Der Nachweis von zwei quervernetzten Peptiden, die aus zwei unterschiedlichen Proteinen stammen, ist ein starker Hinweis auf eine Protein-Protein-Interaktion (Zhang et al., 2009). Die genaue Stelle der Interaktion innerhalb der Proteine bietet zudem die Informationen für die weitere funktionelle Analyse (Leitner et al., 2016).

Die kommerzielle Verfügbarkeit einer Vielzahl von verschiedenen Substanzen zum Quervernetzen von Proteinen stellt die Grundlage für die Anwendung in vielen Laboren dar. Die vermutlich am meisten benutzten Crosslinker sind die aminreaktiven NHS-Ester

(Abbildung 20A, (Staros, 1982). Neben der wasserunlöslichen Form, die mit organischen Lösungsmitteln wie DMSO verwendet werden muss, gibt es auch modifizierte Substanzen mit einer wasserlöslichen Sulfatgruppe. NHS-Ester reagieren mit nukleophilen Gruppen wie primären und sekundären Aminen (Abbildung 21A). Mit steigendem pH-Wert nehmen die Reaktivität mit Aminen und die Hydrolyse zu (Staros, 1988).

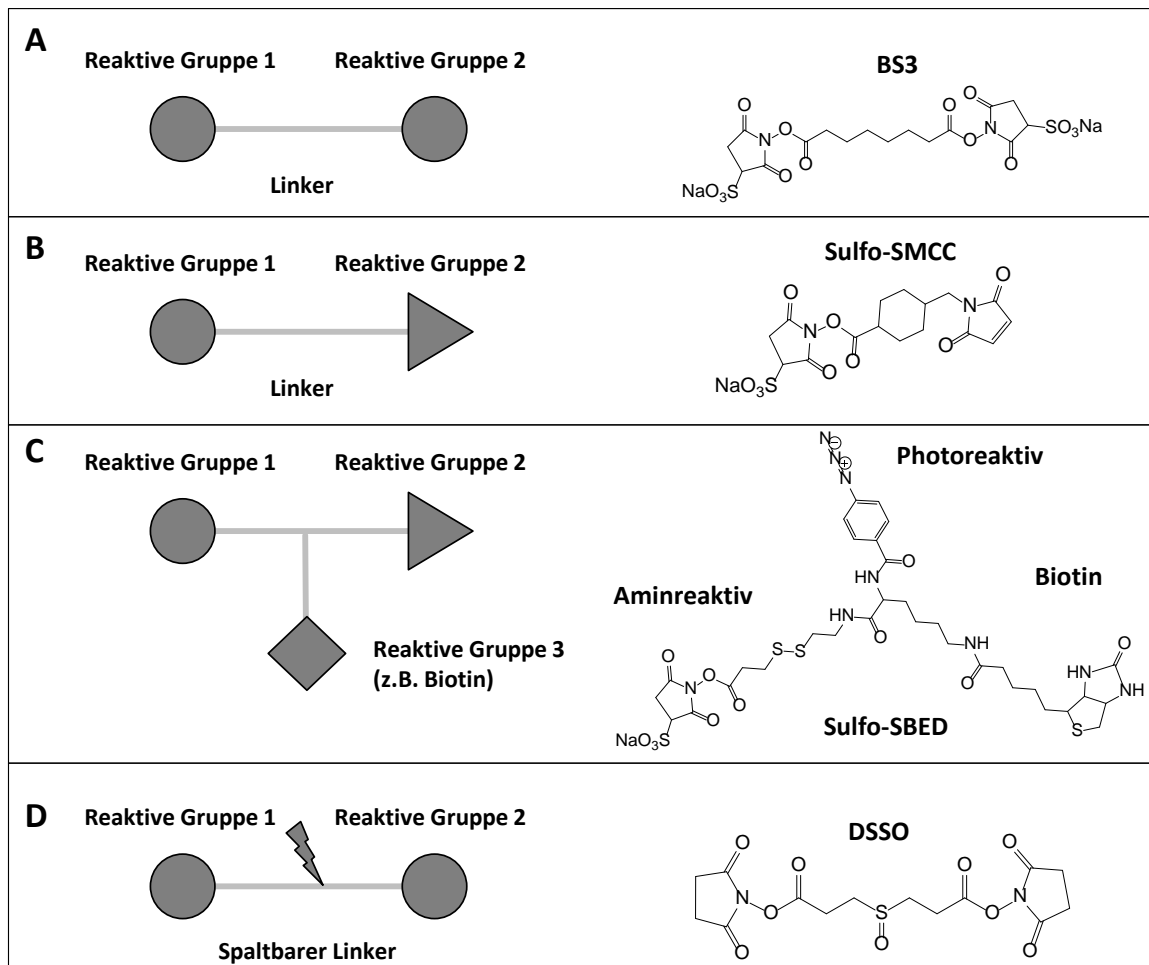


Abbildung 20: Schematische Darstellung von verschiedenen Crosslinkern, die zum Quervernetzen von Proteinen verwendet werden können.

A) Homobifunktionaler Crosslinker, der an beiden Seiten die gleiche reaktive Gruppe aufweist. BS3 ist ein weitverbreiteter wasserlöslicher Crosslinker. Die NHS-Ester reagieren hauptsächlich mit den primären Aminen von Lysinseitenketten.

B) Heterobifunktionaler Crosslinker Sulfo-SMCC, der Lysine mit Thiolen von reduzierten Disulfidbrücken vernetzen kann. C) Trifunktionaler Crosslinker Sulfo-SBED: Die beiden reaktiven Gruppen reagieren mit Lysinen und nach UV-Puls mit verschiedenen Stellen im Protein. Quervernetzte Peptide können über die Biotingruppe angereichert werden.

D) Homobifunktionaler MS²-spaltbarer Crosslinker: Nach der Reaktion mit Lysinen an beiden Enden des Linkers können die beiden C-S-Bindungen selektiv mit niedriger CID-Energie gespalten werden. Die getrennten Peptide können danach im MS³ mit höherer Energie fragmentiert werden (Modifiziert nach (Sinz, 2006)).

Eine weitere Vernetzungsmöglichkeit bieten Crosslinker mit einer Maleimidfunktion (Abbildung 20B). Maleimide reagieren in einem pH-Bereich von 6.5-7.5 mit Thiolen (Smyth et al., 1964), die in den Seitenketten von Cysteinen vorhanden sind (Abbildung 21B). Mit steigendem pH-Wert nehmen die Reaktivität mit Aminen und die Hydrolyse zu (Brewer and Riehm, 1967). Da die Seitenketten von Cysteinen oft als Disulfidbrücken vorliegen, müssen Proteine erst reduziert werden bevor die Verlinkungsreaktion stattfinden kann. Dieser Schritt kann jedoch die räumliche Struktur des Proteins verändern.

Crosslinker mit einer photoaktivierbaren Gruppe können durch die Bestrahlung mit UV-Licht gezielt zur Reaktion gebracht werden. Im Falle von Sulfo-SBED (Abbildung 20C) wird der Crosslinker zunächst zur Proteinmischung gegeben, wo er durch den aminreaktiven NHS-Ester an eine Lysinseitenkette kovalent bindet. Im nächsten Schritt wird das photoreaktive Arylazid mit UV-Licht zu einem Nitren umgewandelt, das unspezifisch mit Doppelbindungen oder aktiven Wasserstoffbindungen reagiert (Abbildung 21C, (Sinz, 2006)).

Die dritte funktionelle Gruppe in Sulfo-SBED ist das Biotin, welches für die Affinitätsreinigung verwendet wird. Aufgrund der niedrigen Abundanz von quervernetzten Proteinen/Peptiden in einer komplexen Proteinmischung, stellt deren Anreicherung einen wichtigen Aspekt dar, um gute Massenspektren zu erhalten ((Trester-Zedlitz et al., 2003), (Fujii et al., 2004)). Zusätzlich kann der trifunktionale Linker nach der Anreicherung an der vorhandenen Disulfidbrücke reaktiv gespalten werden. Quervernetzte Peptide werden somit getrennt, haben jedoch eine für den Crosslinker spezifische Modifikation, die bei der Datenbanksuche genutzt werden kann. Weiterhin ist somit keine spezielle Software notwendig, die gemischte Spektren von zwei quervernetzten Peptiden identifizieren kann.

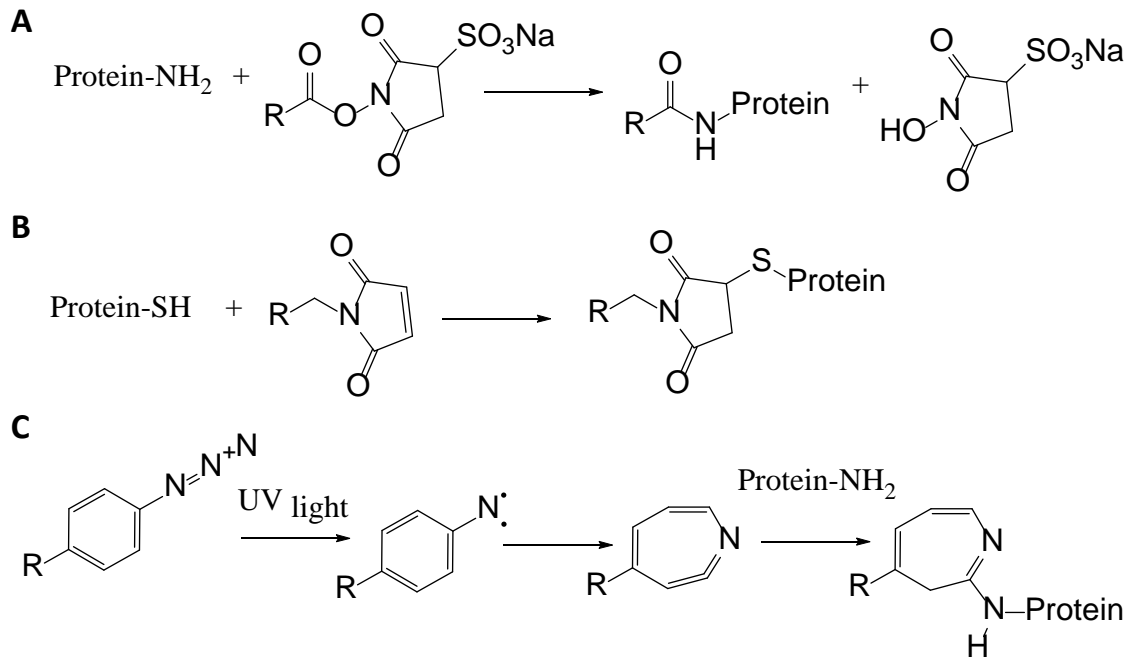


Abbildung 21: **Reaktionsschema verschiedener funktioneller Gruppen, die zum Quervernetzen von Proteinen verwendet werden.**

Aminreaktive NHS-Ester, B) Thiolreaktive Maleimide, C) Photoreaktive Arylazide (Modifiziert nach (Sinz, 2006).


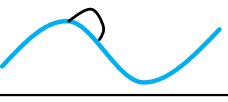

Die Verwendung von im Massenspektrometer selektiv spaltbaren Crosslinkern ist eine Möglichkeit, um die Datenauswertung bei XL-Versuchen zu vereinfachen (Kao et al., 2011). Zunächst werden mit dem Crosslinker (z .B. DSSO) über die aminreaktiven NHS-Ester zwei Proteine miteinander quervernetzt. Nach dem Verdau der Proteine können die beiden vernetzten Peptide mit niedriger Kollisionsenergie selektiv getrennt werden. Anschließend können die getrennten Peptide im MS³-Modus mit mehr Energie fragmentiert werden und somit identifiziert werden. Die MS³-Spektren können dann wie MS²-Spektren in einer normalen Datenbanksuche verwendet werden. Die Anwendung dieser Technologie auf Proteomebene konnte bereits erfolgreich gezeigt werden (Liu et al., 2017).

Bei der Quervernetzung einer Proteinlösung entstehen nach dem Verdau Peptide, die verschiedene Modifikationen aufweisen. Diese Peptide können in drei verschiedene Kategorien eingeordnet werden (Tabelle 1). Reagiert nur ein Teil des Crosslinkers mit einem Peptid und der andere Teil mit einem kleinen Molekül, wie Wasser oder Ammonium, liegt eine Dead-End Modifikation vor (Typ 0). Liegen innerhalb eines Proteins zwei reaktive Seitenketten nahe beieinander und reagieren beide mit einem

Crosslinker, so entsteht eine Intralinkmodifikation (Typ 1). Wenn beide reaktive Gruppen des Crosslinkers mit zwei Proteinen oder zwei Proteinabschnitten eines Proteins reagieren, die durch die Sekundärstruktur nahe beieinander liegen, entstehen nach dem Verdau zwei Peptide, die über den Linkerteil des Crosslinkers miteinander verbunden sind (Typ 2).

Tabelle 1: Auflistung der möglichen Peptidmodifikationen, die bei einer Quervernetzungsreaktion entstehen können.

Bei einer Dead-End Modifikation hat der Crosslinker zum einen mit einer reaktiven Seitenkette einer Aminosäure reagiert und zum anderen mit einem kleinen Molekül, wie Wasser oder Ammonium. Die Intralinkmodifikation wird innerhalb eines Peptids erzeugt, wenn zwei reaktive Seitenketten nahe beieinander liegen und mit dem Crosslinker reagieren. Für die Interlinkmodifikation müssen zwei Abschnitte innerhalb eines Proteins oder von zwei verschiedenen Proteinen in unmittelbarer Nähe sein (Modifiziert nach (Clifford-Nunn et al., 2012)).

Struktur	Nomenklatur	Typ
	Dead-End	0
	Intralink	1
	Interlink	2

3.2.3 Kombination von Co-IP mit XL-MS

Das Quervernetzen von großen Mengen an aufgereinigten Proteinen und die Identifizierung der quervernetzten Peptide, ist eine weitverbreitete Methode, um Strukturmodelle in Kombination mit anderen Methoden wie der Röntgenkristallographie zu erstellen (Walzthoeni et al., 2013). Hierbei spielen die Länge und die reaktiven Gruppen des Linkers eine entscheidende Rolle, welche Aminosäureseitenketten miteinander reagieren.

Die Kombination von Co-IP mit XL-MS ist hingegen eine leistungsfähige Methode, um den tatsächlichen *in-vivo*-Zustand der Proteininteraktionen in der Zelle zu untersuchen. Das markierte Protein und dessen Interaktionspartner werden hierzu über eine Co-Immunpräzipitation angereichert und anschließend auf den Beads chemisch quervernetzt (Abbildung 22). Die zu untersuchenden Proteine sind somit bereits aus dem Zelllysat

angereichert und können effizienter quervernetzt werden, als das bei einer Quervernetzung direkt im Zellysate der Fall wäre. Die gebundenen und quervernetzten Proteine werden anschließend eluiert und mit einer Protease verdaut. Diese hochkomplexe Peptidmischung kann nun mittels LC-MS/MS gemessen und die Quervernetzungen identifiziert werden. Das Ergebnis aller Quervernetzungen ist ein Interaktionsnetzwerk der angereicherten Proteine (Topology Mapping; (Herzog et al., 2012)). Zudem können transiente Interaktionspartner erfasst werden, wenn das entsprechende Fragmentationenspektrum vorliegt.

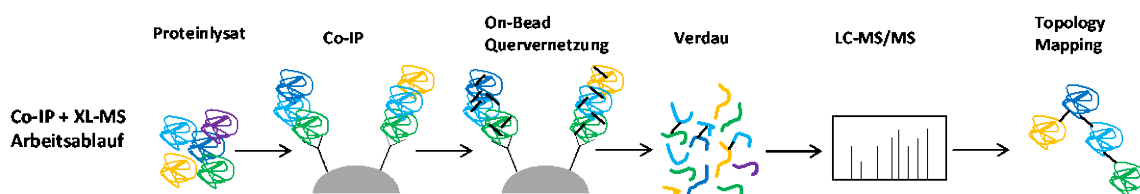


Abbildung 22: Schematische Darstellung eines Co-IP-XL-MS Experiments.

Zunächst werden Proteine aus einem Zellysate mittels Affinitätsreinigung angereichert. Das Zielprotein wurde zuvor mit einer Affinitätsmarkierung exprimiert, um die Anreicherung mit einem kommerziellen Antikörper zu ermöglichen. Die angereicherten Proteine oder Proteinkomplexe werden mit einem Crosslinker quervernetzt, von den Beads eluiert und verdaut. Quervernetzte Peptide können in einem weiteren Schritt spezifisch angereichert werden, um eine bessere Detektion zu ermöglichen. Die Identifizierung von quervernetzten Peptiden kann dazu verwendet werden, neue Interaktionsnetzwerke zu beschreiben (Modifiziert nach (Liu and Heck, 2015)).

Der entscheidende limitierende Faktor hierbei ist, dass man eine sehr große Menge an Protein anreichern muss, da die interessanten Quervernetzungen nur in kleinen Mengen erzeugt werden. Ein möglicher optionaler Schritt, um die quervernetzten Peptide gezielt anzureichern ist die Verwendung der Size Exclusion Chromatography (SEC, (Leitner et al., 2012)), der Ion Exchange Chromatography (IXC, (Chen et al., 2010)) oder die Anreicherung mit einer funktionellen Gruppe am Crosslinker (Ahrends et al., 2006).

3.2.3.1 Datenauswertung von Quervernetzten Peptiden

Eine große Herausforderung beim Quervernetzen von Proteinen ist die Interpretation und die Auswertung der Daten. Die etablierten Auswertepattformen wie Mascot und Maxquant haben bis jetzt noch keine Option, um quervernetzte Peptide in einer Auswertung zu identifizieren. Das MS^2 -Spektrum von zwei quervernetzten Peptiden setzt sich im Gegensatz zu einem normalen MS^2 -Spektrum aus den Fragmenten von zwei Peptiden und der Linkermodifikation zusammen (Abbildung 23).

Eines der Hauptprobleme für die Algorithmen, die für die Datenanalyse verwendet werden, ist das sogenannte n-square Problem (Liu et al., 2015). Dieses Problem resultiert daraus, dass jedes Peptid der Datenbank mit jedem Peptid über den Crosslinker verlinkt werden kann. Somit vergrößert sich der Suchraum bei einer Datenbanksuche quadratisch in Bezug auf die Anzahl der Peptide in der Datenbank.

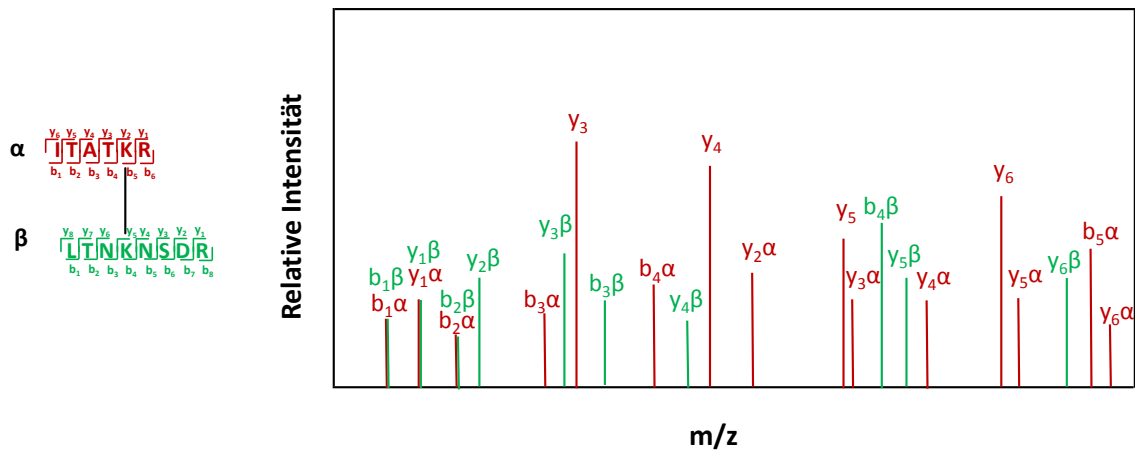


Abbildung 23: Schematisches MS²-Spektrum von zwei quervernetzten Peptiden.

Neben dem Fragmentationsspektrum sind die Peptidsequenzen mit den jeweiligen b- und y-Ionen markiert. Das MS/MS-Spektrum ist eine Mischung aus den Fragmenten der beiden Peptide.

Eine Möglichkeit um Crosslinkdaten auszuwerten, bei denen ein oder zwei Proteine vernetzt wurden, ist mit dem kommerziell verfügbaren Programm GPMW (Peri et al., 2001). Neben der Aminosäuresequenz der Proteine kann der Benutzer den verwendeten Crosslinker, die vernetzten Aminosäuren und die erzeugte Modifikation angeben. Das Programm gibt dann alle theoretischen quervernetzten Peptide an, die nach dem Verdau mit einer bestimmten Protease entstehen können. Interessante Peptide können damit manuell überprüft werden, was jedoch sehr zeitaufwendig ist.

Wird ein CID-spaltbarer Crosslinker wie DSSO verwendet (siehe Kapitel 3.2.2), kann das n-square Problem komplett umgangen werden, da die MS³-Spektren der gespaltenen Peptide wie MS²-Spektren in einer Datenbanksuche benutzt werden. Die spezifischen Fragmentationen aus den MS²-Spektren können zusätzlich zur Validierung der Quervernetzungen herangezogen werden.

Besteht keine alternative Methode zur Auswertung, gibt es Programme wie StavroX, die eine benutzerfreundlichere Auswertung von Crosslinkdaten ermöglichen (Götze et al., 2012). Hiermit können einzelne Rohdaten nach der Konvertierung in das mgf-Format (Mascot generic file) auf Quervernetzungen hin untersucht werden. Die Aminosäuresequenz der zu untersuchenden Proteine wird im FASTA-Format für die Suche bereitgestellt. Als nächstes müssen versuchsspezifische Parameter wie die verwendete Protease, variable und feste Modifikationen, der verwendete Crosslinker, die Fragmentierungsmethode und der statistische cut-off in Form der FDR angegeben werden. Die Software berechnet im ersten Schritt alle theoretischen Peptide und Quervernetzungen, die beim Verdau der angegebenen Proteine entstehen können. Im zweiten Schritt werden die theoretischen MS- und MS/MS-Daten mit den experimentell generierten Daten verglichen. Danach folgt die grafische Ausgabe der gefundenen quervernetzten Peptide.

3.3 Interaktionen von Proteinen mit niedermolekularen Verbindungen

Niedermolekulare Verbindungen können aufgrund ihrer funktionellen Gruppen und ihren strukturellen Eigenschaften mit Makromolekülen interagieren. Die Funktion eines Proteins kann durch diese Interaktion eingeschränkt, inhibiert oder gesteigert werden. Ist das Protein ausschlaggebend für ein bestimmtes Krankheitsbild und stellt somit ein therapeutisches Ziel dar, kann die Behandlung mit dieser Substanz eine Besserung der Symptome bewirken.

Viele bekannte niedermolekulare Verbindungen sind natürlichen Ursprungs oder davon abgeleitete Derivate. Die Suche nach neuen potenten Verbindungen, die eine ausreichende Wirksamkeit haben, kann durch das Screenen von großen Substanzbibliotheken im High-throughputverfahren verwirklicht werden (Mayr and Bojanic, 2009; Sundberg, 2000). Hierbei gibt es zwei verschiedene Strategien (Abbildung 24). Ist bereits bekannt, dass ein Protein maßgeblich an einer Erkrankung beteiligt ist, können gezielt potentielle Inhibitoren synthetisiert oder ganze Substanzbibliotheken mit dem überexprimierten Protein, in einem biochemischen Assay, getestet werden (Abbildung 24A, (Macarron et al., 2011)). Ein anderer Ansatz geht von einem spezifischen

Krankheitsphänotyp aus, der als Ausgangspunkt für die Testung von Substanzbibliotheken gilt (Abbildung 24B, (Stockwell, 2000), (Stockwell, 2004)). Diese Herangehensweise hat den Vorteil, dass der Effekt des Moleküls auf das ganze biologische System getestet wird und dass neue therapeutische Zielproteine gefunden werden können.

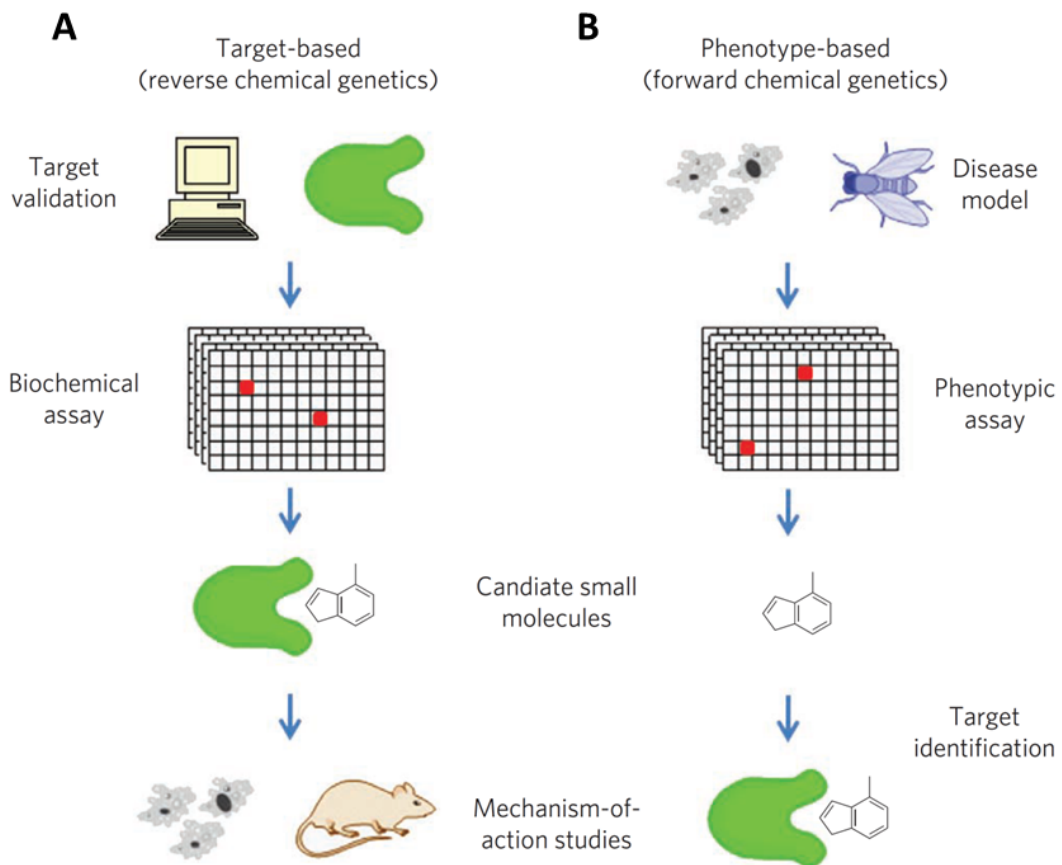


Abbildung 24: **Wirkungsmechanismus und Identifizierung von Zielproteinen mit Hilfe der chemischen Genetik.**

A) Im zielbasierten Ansatz werden zunächst das Zielprotein und dessen Rolle innerhalb einer Krankheit validiert. Danach werden in einem biochemischen Assay passende niedermolekulare Verbindungen identifiziert. Am Ende muss noch der Wirkungsmechanismus und mögliche Nebeneffekte genauer untersucht werden. B) Der auf dem Phänotyp basierende Ansatz hat ein bestimmtes Krankheitsmodell als Ausgangspunkt. Im phänotypischen Assay werden dann Moleküle identifiziert, die einen positiven Effekt auf dieses Krankheitsbild haben. Die Identifizierung des Zielproteins und des Wirkungsmechanismus stellt den letzten Schritt dar (Quelle: (Schenone et al., 2013)).

3.3.1 Drug-Target Identifizierung mittels Affinitätsreinigung und Massenspektrometrie

Wurde in einem aufwendigen phänotypischen Screening eine besonders wirksame Substanz gefunden, kann diese verwendet werden, um die Zielproteine zu identifizieren (Abbildung 24B). Hierzu muss die Substanz für einen chemoproteomischen Ansatz entsprechend modifiziert werden, um sie an eine Matrix zu immobilisieren. Eine Möglichkeit ist die Biotinylierung der Substanz und anschließende Immobilisierung an eine Streptavidinmatrix (von Kleist et al., 2016). Dabei muss beachtet werden, dass durch die Modifikation der Substanz an einer wichtigen Stelle im Molekül, die Bindung an das Zielprotein verloren gehen kann. Außerdem können die chemischen Eigenschaften des Linkers die Bindung von Proteinen beeinflussen. Es konnte gezeigt werden, dass die Verwendung von hydrophilen Linkern einen positiven Effekt auf die Probenqualität hat (Shiyama et al., 2004).

Ein wichtiger Punkt ist die Wahl der Kontrolle. Ist die verwendete Substanz ausreichend wasserlöslich, kann eine Kompetitionskontrolle verwendet werden, bei der der freie Inhibitor, während der Anreicherung, zum Proteinlysate gegeben wird. Dieser bindet einen Großteil der Zielproteine, wodurch nur noch ein kleiner Teil an der Inhibitor-Matrix verbleibt (Cheng et al., 2010). Alternativ hierzu können die Zielproteine nach der Anreicherung mit freiem Inhibitor von den Beads eluiert werden (Harding et al., 1989). Ist die verwendete Substanz nur schwer wasserlöslich, muss die Kompetitionskontrolle mit einer einfachen Beadkontrolle ersetzt werden (Bach et al., 2017).

Wurden die Anreicherungsprobe und die Kontrolle mit stabilen Isotopen markiert, muss die Messung der eluierten und verdauten Peptide gemeinsam erfolgen (Abbildung 25, (Ong et al., 2009)). Alternativ kann dieser Versuch auch markierungsfrei in zwei Messungen durchgeführt werden. In beiden Fällen muss aber überprüft werden, ob es zu unspezifischen Bindungen von Proteinen an den Linker kommt, um mögliche falsch positive Zielproteine ausschließen zu können (Kapitel 5.2.1). Die quantitative Information zwischen der Anreicherung und der Kontrolle wird dazu genutzt, um spezifisch an die Substanz bindende Proteine von unspezifisch an die Beads bindende Proteine zu unterscheiden.

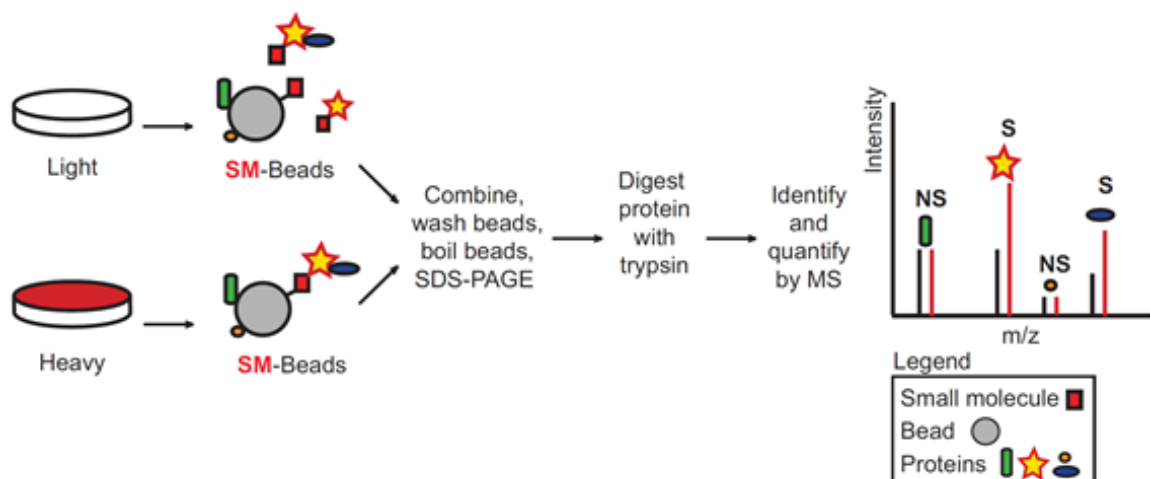


Abbildung 25: **Quantitativer Chemical Proteomics Workflow zur Bestimmung der Interaktionen von niedermolekularen Substanzen mit Proteinen.**

Um zwischen spezifisch an das Molekül und unspezifisch an die Beads bindende Proteine zu unterscheiden, wird ein Teil der Zellen metabolisch mit stabilen Isotopen markiert. Der Kontrollansatz bleibt ohne die Markierung mit stabilen Isotopen und die Zugabe von freiem Inhibitor führt dazu, dass kaum noch Zielproteine an die Inhibitor-Beads binden können. Im anderen Ansatz, in dem die Zielproteine angereichert werden, wurde eine Markierung mit schweren Isotopen durchgeführt. Nach der Anreicherung werden die Beads vereint, gewaschen, die Proteine von den Beads gekocht, mittels SDS-PAGE aufgetrennt, mit Trypsin verdaut und mit LC-MS/MS identifiziert und quantifiziert. Die quantitative Information wird dazu genutzt um zwischen spezifischen und unspezifischen Bindern zu unterscheiden (Quelle: (Ong et al., 2009)).

Eine weitere Herausforderung stellen Proteine dar, die mit den primären Zielproteinen interagieren, da nicht zwischen direkten und indirekten targets unterschieden werden kann. Indem man alle potentiellen Zielproteine auf ihre Interaktion miteinander überprüft, können funktionelle Cluster erstellt werden, die für die Dateninterpretation hilfreich sind (von Mering et al., 2003). Zudem kann man alle potentiellen Zielproteine auf strukturelle Ähnlichkeiten hin überprüfen und somit die Anreicherung von einer bestimmten Proteindomäne identifizieren (Overington et al., 2006). Besteht die Möglichkeit, sollten alle potentiellen Zielproteine in einem zellulären Assay überprüft werden, um die Proteine zu bestätigen, die für die Wirkung der Substanz in Frage kommen. Dies kann z.B. durch den Knockdown der jeweiligen Proteine erfolgen (Wu et al., 2011).

3.3.2 Thermal Profiling

Ist die Markierung einer bioaktiven Substanz für einen chemoproteomischen Ansatz (Bantscheff et al., 2007) nicht möglich oder zu aufwendig, können die molekularen Zielstrukturen auch per Thermal Proteome Profiling identifiziert werden (Savitski et al., 2014). Diese Strategie basiert darauf, dass die Stabilität von Proteinen durch die Zugabe von Liganden beeinflusst werden kann (Vedadi et al., 2006).

In ersten Versuchen von Molina konnten die Zielproteine von verschiedenen Inhibitoren innerhalb der Zelle mit dem *Cellular Thermal Shift Assay* (CETSA) identifiziert und per Western Blot bestätigt werden (Molina et al., 2013). Der Thermal Shift Assay stellt nun eine Weiterentwicklung dieser Strategie dar, da nun alle Proteine massenspektrometrisch untersucht werden. Durch die Erstellung von Schmelzkurven für jedes Protein können direkte und indirekte Zielproteine von unbeeinflussten Proteinen unterschieden werden (Abbildung 26).

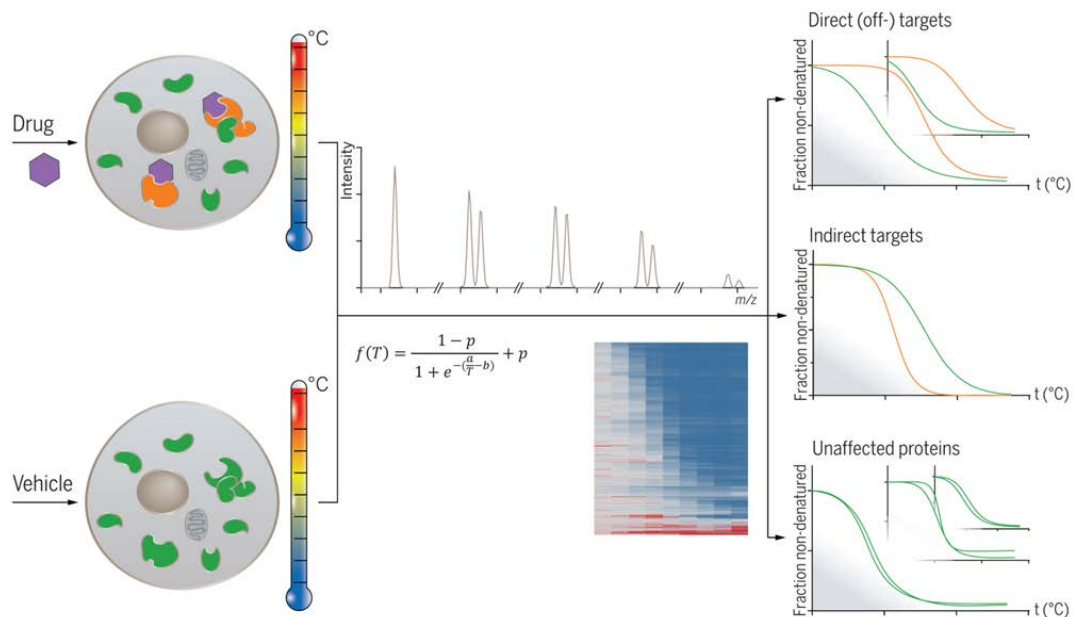


Abbildung 26: **Identifizierung von Drug Targets mittels Thermal shift assay.**

Bioaktive Substanzen binden direkt und indirekt an verschiedene Proteine in der Zelle, was zu einer Veränderung der Stabilität führt. Nach der Zugabe einer Substanz auf die Zellen werden alle Proteine extrahiert und mittels Thermal Shift assay bezüglich ihrer Schmelzkurve überprüft. Direkte und indirekte Zielproteine zeigen eine veränderte Schmelzkurve, während die von allen anderen Proteinen unverändert bleibt (Quelle: (Savitski et al., 2014)).

Hierzu werden Zellen mit einer Substanz behandelt und die Kontrollzellen bleiben unbehandelt. Im nächsten Schritt werden beide Ansätze in 10 Aliquots geteilt und mit unterschiedlichen Temperaturen inkubiert. Durch die temperaturabhängige Denaturierung von Proteinen nimmt die Menge an extrahierten Proteinen mit zunehmender Temperatur ab (Asial et al., 2013). Die löslichen Proteine werden dann tryptisch verdaut und jede der 10 verschiedenen Proben mit Isotope-coded isobaric mass tags markiert (Werner et al., 2014). Nach der Mischung und LC-MS/MS Messung der Proben findet die Identifizierung und Quantifizierung per MS/MS statt. Für beide Proben können, mit den Temperaturdatenpunkten, Schmelzkurven dargestellt werden. Sind die Kontrollkurve und die Inhibitorcurve identisch, bleibt das Protein unbeeinflusst vom Inhibitor. Stabilisiert die verwendete Substanz das Protein ist die Denaturierung bei höheren Temperaturen herabgesetzt, was zu einer nach rechts verschobenen Schmelzkurve führt. Diese Proteine stellen potentielle *Drug Targets* oder Off-Targets dar.

Der entscheidende Vorteil des *Thermal Shift Assays*, im Vergleich zur Identifizierung von *Drug Targets* mittels AP-MS ist, dass die Inhibitoren nicht immobilisiert werden müssen. Die aufwendige Synthese von Substanzen mit einem Linker und einer zusätzlichen funktionellen Gruppen zum Immobilisieren an eine Matrix fällt damit weg. Jedoch müssen die Substanzen, die mittels *Thermal Shift Assays* getestet werden, eine ausreichende Löslichkeit im Zelllysate aufweisen. Außerdem müssen alle potentiellen Bindepartner des Inhibitors durch die Interaktion mit dem Inhibitor stabilisiert werden. Findet keine Stabilisierung statt, wird das Protein nicht als potentieller Bindepartner identifiziert.

3.4 Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung neuer Strategien und verbesserter Methoden für die massenspektrometrische Analyse von Proteininteraktionen. Hierbei wurden Protein-Protein-Interaktionen und Interaktionen von Proteinen mit niedermolekularen Substanzen analysiert.

Für die Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen wurde eine Kombination aus Co-IP und chemischem Quervernetzen mit anschließender Massenspektrometrie gewählt (Kapitel 3.2.3). Die Analyse eines komplexen Interaktoms ist mittels Co-IP und MS sehr gut möglich, jedoch erhält man dadurch keine Information, welche Proteine direkt miteinander interagieren. Das Ziel war somit, durch das Quervernetzen eines komplexen Interaktoms und der folgenden Identifizierung der quervernetzten Peptide, ein Interaktionsnetzwerk (Topology Mapping) zu erstellen. Als Modellsystem wurden der Mediator-Komplex und dessen Interaktionspartner gewählt.

Die Untersuchung der Interaktionen von Protein mit niedermolekularen Substanzen wurde im Rahmen der Klinischen Forschergruppe 216 durchgeführt. Ziel war es molekulare Zielstrukturen von verschiedenen Substanzen zu finden, die Apoptose in Zellen des Multiplen Myeloms induzieren. Hierzu wurde ein chemoproteomischer Workflow etabliert und validiert. Biotinylierte Substanzen wurden an eine Matrix immobilisiert, die Zielproteine durch eine Affinitätsreinigung aus einem Zelllysat angereichert und mittels LC-MS/MS identifiziert (Kapitel 3.3.1). Nach der erfolgreichen Identifizierung von potentiellen Zielproteinen wurden diese durch Folgeexperimente validiert.

4 Material & Methoden

4.1 Chemikalien

Alle Chemikalien, die in dieser Arbeit verwendet wurden sind zusammen mit der Herstellerinformation in Tabelle 2 aufgelistet.

Tabelle 2: Auflistung aller Chemikalien mit Hersteller

Chemikalie	Hersteller
1,4-Dioxan	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
3,3-Thiodipropionsäure	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Aceton \geq 99.5 %	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Acetonitril (MS grade)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Ameisensäure (98%)	Fluka-Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Ammoniumhydrogencarbonat	Fluka-Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Anti-DNA PKCs Primärantikörper	Abcam (Cambridge, Vereinigtes
Anti-HA Primärantikörper	Cell Signaling (Cambridge, Vereinigtes Königreich)
Anti-FLAG Primärantikörper	Cell Signaling (Cambridge, Vereinigtes Königreich)
Anti-Mouse Sekundärantikörper	Cell Signaling (Cambridge, Vereinigtes Königreich)
Anti-Rabbit Sekundärantikörper	Cell Signaling (Cambridge, Vereinigtes Königreich)
Argon	Linde (München, Deutschland)
BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Bis(sulfosuccinimidyl)suberat	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Borsäure	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)

Bradford-Reagenz	SERVA Electrophoresis GmbH (Heidelberg, Deutschland)
Chloroform	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Chloroperbenzoesäure	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Clarity™ Western ECL Blotting Substrates	BIO-RAD Laboratories (Hercules, USA)
complete Protease inhibitor Tablette (EDTA frei)	F. Hoffmann-La Roche AG (Basel, Schweiz)
Coomassie (SimplyBlue Safestain)	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Diethylether	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Dimethylsulfoxid	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Dionex™ Protein Mixture Digest	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Disuccinimidyl Sulfoxid (DSSO)	selbst synthetisiert
Dithiothreitol (10 x RA reagent)	Life technologies (Carlsbad, USA)
Elastase	Promega (Fichtburg, USA)
Entwicklerlösung-Kit	BIO-RAD Laboratories (Hercules, USA)
Essigsäure	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Essigsäureethylester	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Ethanolamin	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Faltenfilter	Hartenstein
Formaldehyd	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Formaldehyd C ¹³	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Glucose	SERVA Electrophoresis GmbH (Heidelberg, Deutschland)
Glutaraldehyd	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)

Material und Methoden

Glycerol	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Glycin HCl	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
H ₂ ¹⁸ O (97 %)	euriso-top (Saint-Aubin Cedex,
Harnstoff	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Hexan	Fluka-Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Hygromycin	SERVA Electrophoresis GmbH (Heidelberg, Deutschland)
Iodacetamid	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Isopropanol	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Kaliumacetat	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Methanol	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Magnesiumchlorid	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Mouse (G3A1) mAb IgG1 Isotype Control #5415	Cell Signaling (Cambridge, Vereinigtes Königreich)
N,N-Dicyclohexylcarbodiimid	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
N,N-Diisopropylethylamin	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
N-hydroxy-succinimid	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Natriumdeoxycholat	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Natriumchlorid	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Natriumdodecylsulfat	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Nonidet P-40 (NP40)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
NPL4, Nuclear protein localization protein 4 homolog	Petra Hänzelmann (AG Schindelin, RVZ)

NuPAGE™ LDS Sample Buffer	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
p97N, Subdomäne des humanen Proteins	Petra Hänzelmann (AG Schindelin, RVZ)
Pefabloc	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Pepton	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Pierce™ Protein A/G Magnetic Beads	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Ponceau-Färbelösung	SERVA Electrophoresis GmbH (Heidelberg, Deutschland)
Proteinmarker (Novex Sharp Pre-Stained)	Invitrogen (Carlsbad, USA)
Magermilchpulver (skim milk powder)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Magnetische Anti-HA Beads	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Magnetische Anti-FLAG Beads	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Magnetische Streptavidin Beads	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Sulfid S1	selbst synthetisiert
Trifluoressigsäure	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Tris·HCl	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Trypsin (Gold, MS-Grade)	Promega (Fichtburg, USA)
Tween 20	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
UBX, Subdomäne des humanen Proteins FAF1	Petra Hänzelmann (AG Schindelin, RVZ)
UFD1, Ubiquitin fusion degradation protein 1	Petra Hänzelmann (AG Schindelin, RVZ)
Yeast Extract	SERVA Electrophoresis GmbH (Heidelberg, Deutschland)

YPD Agar	SERVA Electrophoresis GmbH (Heidelberg, Deutschland)
Zitronensäure	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)

4.2 Puffer, Kits und Lösungen

Die Puffer, Kits und Lösungen verschiedener Hersteller, die in dieser Arbeit verwendet wurden, sind zusammen mit der Herstellerinformation oder der Zusammensetzung in Tabelle 3 aufgelistet.

Tabelle 3: Auflistung aller Puffer, Kits und Lösungen und deren Zusammensetzung/Hersteller

Puffer/Kit/Lösungen

Zusammensetzung/Hersteller

Boratpuffer	50 mM Borsäure pH 8.5
Halt™ Protease Inhibitor Cocktail	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
HEPES Puffer	20 mM HEPES, 115 mM NaCl, 1.2 mM CaCl ₂ , 1.2 mM MgCl ₂ , 2.4 mM K ₂ HPO ₄ , 0.5% NP 40 (pH 7.5)
HPLC Laufmittel A	0.1 % FA in H ₂ O
HPLC Laufmittel B	0.1 % FA in 80 % ACN
Lysepuffer (Hefezellen)	20 mM HEPES, 115 mM NaCl, 1.2 mM CaCl ₂ , 1.2 mM MgCl ₂ , 2.4 mM K ₂ HPO ₄ , 0.5% NP 40 (pH 7.5), 0.1 % NP40
Magermilchlösung	5 % Magermilchpulver in PBST Puffer
MOPS-Puffer Laufpuffer (20	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
PBS Puffer	127 mM NaCl, 7 mM Na ₂ HPO ₄ •7H ₂ O, 3 mM NaH ₂ PO ₄ •H ₂ O
PBST Puffer	127 mM NaCl, 7 mM Na ₂ HPO ₄ •7H ₂ O, 3 mM NaH ₂ PO ₄ •H ₂ O, 0.1 % Tween
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)

Pierce™ Crosslink Magnetic IP/Co-IP Kit	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Pierce™ IP Lysis Buffer (INA6 Zellen)	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
SilverXpress™ Silver Staining Kit	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
TBS Puffer	8 g NaCl, 0.2 g KCl, 3 g Tris
TG Puffer (10 x)	BIO-RAD Laboratories (Hercules, USA)
Transferpuffer (1 x TG + 10 % MeOH)	100 mL TG Puffer (10 x), 100 mL MeOH, 800 mL H ₂ O
Tris-HCl Puffer	50 mM Tris-HCl (pH 7.5)
YPD Medium (1L)	20 g Pepton, 10 g Yeast Extract, 950 mL H ₂ O, 50 mL 40 % Glucose

4.3 Geräte, Utensilien und Verbrauchsmaterialien

Die Geräte, Utensilien und Verbrauchsmaterialien verschiedener Hersteller, die in dieser Arbeit verwendet wurden, sind zusammen mit der Herstellerinformation in Tabelle 4 aufgelistet.

Tabelle 4: Auflistung aller Geräte, Utensilien und Verbrauchsmaterialien und deren Hersteller

Geräte/Utensilien/Verbrauchsmaterialien Hersteller

1.5 mL Eppendorfgefäße	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
10 mL Pipetten	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
10 mL Spritze	B Braun (Melsungen, Deutschland)
100 mL Messzylinder	VWR (Radnor, USA)
15 mL Pastikröhrchen	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
50 mL Pastikröhrchen	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
2 L Kolben	Schott AG (Mainz, Deutschland)

Material und Methoden

2 mL Reaktionsgefäß	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
25 mL Pipetten	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
250 mL Messzylinder	VWR (Radnor, USA)
3M Empore™ SPE Extraction Disks	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
500 mL Becherglas	VRW (Radnor, USA)
Agar-Plastikplatten	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Impfösen	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Bis-Tris Gele 4-12%	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Gasbrenner	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Flour ChemQ Chemilumineszenzdetektor	Alpha Innotech (Kasendorf, Deutschland)
Douncing Glasgefäß und Stab	A. Hartenstein GmbH (Würzburg, Deutschland)
Elektrische Pipettierhilfe (accu-jet pro)	BRAND GMBH + CO KG (Wertheim, Deutschland)
Erlenmeyerkolben	Schott AG (Mainz, Deutschland)
Exsikkator	A. Hartenstein GmbH (Würzburg, Deutschland)
Filterpapier	Machery Nagel GmbH & Co. KG (Düren, Deutschland)
Glaskügelchen	A. Hartenstein GmbH (Würzburg, Deutschland)
Handschuhe (Nitril)	VWR (Radnor, USA)
Heizbad B-491	BÜCHI Labortechnik GmbH (Essen, Deutschland)
HPLC-Gefäß	SUN-Sri (Rockwood, USA)
Kolbenschüttler ClimoShaker ISF1-X	Adolf Kühner AG (Basel, Schweiz)

Küvetten	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Mikroplatte, 384 Well	BertholdTech (Bad Wildbad,
Low-binding Eppis 0.5 mL	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Low-binding Eppis 1.5 mL	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Lyophile (Alpha 1-2 LD plus)	Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH (Osterode am Harz, Deutschland)
Magnetständer PureProteome™	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Mörser und Pistill	A. Hartenstein GmbH (Würzburg, Deutschland)
Nanodrop	Thermo Fisher Scientific (Waltham,
nanoHPLC (Easy-nLC 1000)	Thermo Fisher Scientific (Waltham,
Nanospray Flex	Thermo Fisher Scientific (Waltham,
Nanospraynadel	Thermo Fisher Scientific (Waltham,
Nitrilhandschuhe	VWR (Radnor, USA)
Orbitrap Fusion	Thermo Fisher Scientific (Waltham,
Orbitrap Velos Pro	Thermo Fisher Scientific (Waltham,
Parafilm	VWR (Radnor, USA)
Power Pac Basic (Netzteil)	BIO-RAD Laboratories (Hercules, USA)
Pipette 10 µL	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Pipette 100 µL	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Pipette 200 µL	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Pipette 1000 µL	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Pipette 10 mL	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Pipettenspitzen 10 µL	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Pipettenspitzen 200 µL	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)

Pipettenspitzen 1000 µL	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Pipettenspitzen 10 mL	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Pipettenspitzen gelloader tips 10 mL	A. Hartenstein GmbH (Würzburg, Deutschland)
Pipettenspitzen gelloader tips 200 mL	A. Hartenstein GmbH (Würzburg, Deutschland)
Planeten-Kugelmühle PM 100	RETSCH (Haan, Deutschland)
Schüttler (Vortexgenie 2)	A. Hartenstein GmbH (Würzburg, Deutschland)
PVDF-Membran	A. Hartenstein GmbH (Würzburg, Deutschland)
Reinstwasseranlage (Purelab ultra)	ELGA LabWater High (Wycombe (Vereinigtes Königreich))
Rotationsverdampfer (Rotavapor R-215)	BÜCHI Labortechnik GmbH (Essen, Deutschland)
Rotator mit Vortexer RM-2M	A. Hartenstein GmbH (Würzburg, Deutschland)
Rundkolben 250 mL	Lenz Laborglas GmbH & Co. KG (Wertheim, Deutschland)
Schraubdeckel für HPLC-Vials	SUN-Sri (Rockwood, USA)
Scheidetrichter 100 mL	Lenz Laborglas GmbH & Co. KG (Wertheim, Deutschland)
Schwingmühle MM400	RETSCH (Haan, Deutschland)
Skalpell	A. Hartenstein GmbH (Würzburg, Deutschland)
Stage Tip Zentrifuge	Sonation GmbH (Biberach, Deutschland)
Sterilbank	BDK Luft- und Reinraumtechnik GmbH (Sonnenbühl-Genkingen, Deutschland)
Stickstoffgefäß	KGW Isotherm (Karlsruhe, Deutschland)

Material und Methoden

TriStar LB 941 Multimode Mikroplattenleser	BertholdTech BertholdTech (Bad Wildbad, Deutschland)
Tropftrichter 50 mL	Lenz Laborglas GmbH & Co. KG (Wertheim, Deutschland)
Ultrazentrifuge Avanti-J26XP	Beckman-Coulter (Brea, USA)
Ultrazentrifugeneinsätze	Beckman-Coulter (Brea, USA)
Vaccum Controller V-850	BÜCHI Labortechnik GmbH (Essen, Deutschland)
Vakuumpkonzentrator (Concentrator plus)	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Vacuum Pump V-700	BÜCHI Labortechnik GmbH (Essen, Deutschland)
Vakuumpumpe RC5	VACUUBRAND GMBH + CO KG (Wertheim, Deutschland)
Wärmeschrank	Memmert GmbH + Co. KG (Schwabach, Deutschland)
Wischtücher	Kimberly Clark (Texas, USA)
XCell II™ Blot Module	Thermo Fisher Scientific (Waltham,
XCell SureLock® Mini-Cell	Thermo Fisher Scientific (Waltham,
Zentrifuge 5415R (1.5-2 mL Röhrchen)	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Zentrifuge 5810R (15 mL Röhrchen)	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Zentrifugenröhrchen	Beckman-Coulter (Brea, USA)

4.4 Software

Für die Prozessierung, Auswertung und grafische Darstellung der Daten in dieser Arbeit, wurden die Programme aus Tabelle 5 verwendet.

Tabelle 5: Liste der Programme mit Hersteller, die in dieser Arbeit verwendet wurden.

Programm	Hersteller
ChemDraw	PerkinElmer (Waltham, USA)
CorelDraw Graphics Suite X8	Corel GmbH (München, Deutschland)
Endnote	Thomson Reuters (New York City, USA)
GPMAW	Lighthouse data (Odense, Dänemark)
IDCalc	Michael J. MacCoss (Uni Washington)
ImageJ	National Institutes of Health
Mascot Distiller	Matrix Science Inc. (London, Vereinigtes Königreich)
Maxquant	Prof. Jürgen Cox (MPI Martinsried)
MS Office (Excel, Word, Powerpoint)	Microsoft (Redmont, USA)
Nanodrop 2000	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Scaffold	Proteome Software (Portland, USA)
Spotfire	TIBCO Software Inc. (Palo Alto, USA)
StavroX	Michael Goetze (Uni Halle-Wittenberg)
Thermo XCalibur Qualbrowser	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)

4.5 Methoden

4.5.1 Interaktionen von Proteinen mit Proteinen

4.5.1.1 Crosslinking von NPL4 und UFD1 mit BS3

Die Proteine NPL4 und UFD1 wurden von Petra Hänzelmann (AG Schindelin, RVZ) überexprimiert und in einer 1:1 Mischung mit der Konzentration von 19.6 mg/mL in 1 x PBS Puffer zur Verfügung gestellt. Für das chemische Quervernetzen wurde 1 mg des Crosslinker BS3 in 35 μ L HEPES Puffer gelöst, um eine 50 mM Stocklösung zu erhalten. Für alle Versuche wurden 2 μ L der Proteinstocklösung mit 7 μ L HEPES Puffer verdünnt und mit 2 μ L 50 mM BS3 für 30 min bei RT quervernetzt. Das restliche BS3 wurde mit 2 μ L 10 x TG Puffer für 15 min zum Abreagieren gebracht. Die Proteine wurden mit 6 μ L 4 x LDS und 2 μ L DTT 500 mM bei 70 °C denaturiert und reduziert. Anschließend folgte die Alkylierung mit einer finalen Konzentration von 120 mM IAA für 20 min im Dunkeln. Die Probe wurde mit 60 μ L 1 x LDS verdünnt und je 20 μ L wurden auf insgesamt 4 Proteinspuren verteilt. Die Gelelektrophorese wurde wie bei Kapitel 4.5.2.8 beschrieben durchgeführt. Die XL-Banden wurden ausgeschnitten und für die anschließende Messung mit 0.1 μ g Trypsin verdaut.

4.5.1.2 Anzucht und Ernte von Hefezellen

Die Hefestämme mit affinitätsmarkierten Proteinen wurden von Henriette Uthe (AG Schlosser) transformiert und für die Quervernetzungsversuche zur Verfügung gestellt. Zunächst wurden aus der Glycerolstocklösung (Lagerung -80 °C) Zellen für die 3 mL Vorkultur in YPD Medium entnommen. Nach 12 h wurde mit der Vorkultur eine 100 mL Hauptkultur angeimpft (OD 0.1 - 0.2) und bis zu einer Optischen Dichte (OD) von 1 oder 2 vermehrt. Die Zellen wurden anschließend bei 20.000 x g und 4 °C für 20 min zentrifugiert und bis zum weiteren Gebrauch bei -80°C gelagert. Für den Cryoaufschluss wurden die pelletierten Hefezellen in eine Plastikspritze gefüllt und in ein mit fl. Stickstoff gefülltes 50 mL Reaktionsgefäß gedrückt. Nach dem Abgießen des restlichen Stickstoffes wurden die Hefezellen in Spaghettiform bei -80 °C bis zum Cryoaufschluss gelagert (Kapitel 4.5.1.4).

4.5.1.3 Aufschluss der Hefezellen mit Glaskügelchen

Die Hefezellen wurden nach der Ernte in einem 50 mL Reaktionsgefäß bei -80 °C gelagert. Für den Aufschluss der Zellen wurde das Hefepellet in 350 µL Lysepuffer (Tris + PMSF + Roche Proteaseinhibitor) aufgetaut und in ein 1.5 mL Reaktionsgefäß überführt. Bis zum Flüssigkeitsrand wurden nun Glaskügelchen zugegeben und die Zellen 6-mal für 30 sek bei 30 Hz in einer Schwingmühle aufgeschlossen. Zwischendurch wurde das Zellysate für 30 sek auf Eis gekühlt. Die Konzentration an NP40 wurde nun auf 1 % erhöht und das entstandene Lysat von den Glaskügelchen getrennt und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Um die verbleibenden Zelltrümmer zu beseitigen wurde der Ansatz bei 4 °C und 16.000 x g für 20 min zentrifugiert. Das entstandene Proteinlysate wurde für weitere Experimente verwendet.

4.5.1.4 Cryoaufschluss von Hefezellen

Hefezellen, die in Form von Spaghetties bei -80 °C gelagert wurden, dienten als Ausgangsmaterial für die Zerkleinerung in der Planetenmühle. Für einen Aufschluss wurden 10 g Hefezellen abgewogen und in einen mit Stickstoff vorgekühlten 125 mL Mahlbecher mit 5 Stahlkugeln gegeben. Mit der Sicherheitsmetallvorrichtung wurde der Metalldeckel und der Mahlbecher verschlossen. Weiterhin wurde der geschlossene Mahlbecher mit einer Metallspinne in der Planetenmühle fixiert. Der Cryoaufschluss wurde 8-mal mit Mahlprogramm 1 durchgeführt (500 rpm, 3 min, 1 min Intervall). Zwischen jedem Zyklus wurde der Mahlbecher für 3-5 Minuten in fl. Stickstoff gekühlt, um ein Auftauen der Probe zu verhindern. Nach dem Aufschluss wurde der Becher geöffnet und das Pulver mit einem gekühlten Stahllöffel in ein gekühltes 50 mL Falcon überführt. Das Cryopulver wurde im -80 °C Gefrierschrank gelagert. Für die Co-Immunpräzipitation wurde pro Probe 1 g Cryopulver abgewogen und mit 5 mL Lysepuffer unter leichtem Schütteln zum Schmelzen gebracht. Die erhaltene Suspension wurde anschließend mit einem Dounce-Homogenisator 4-mal auf Eis weiter aufgeschlossen. Um die Zelltrümmer vom Proteinlysate zu trennen, wurde das Lysate für 20 min bei 20.000 x g und 4°C zentrifugiert.

4.5.1.5 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels BCA Protein Assay Kit

Zunächst wurde mit Bovinem Serum Albumin (BSA) eine Standardkurve gemäß den Anweisungen des Herstellers erstellt (Abbildung 27). Die Lysatproben wurden in einer

Küvette 1:10 mit IP lysis buffer in einem Gesamtvolumen von 100 μ L verdünnt. Abschließend wurden 2 mL fertig gemischtes BCA Reagenz auf die Proben gegeben und bei 37 $^{\circ}$ C für 30 min inkubiert. Nach weiteren 10 min Inkubation bei RT wurde die Messung am Spektralphotometer mit der Küvetteneinstellung durchgeführt. Als Blank dienten 100 μ L IP lysis buffer mit 2 mL H₂O.

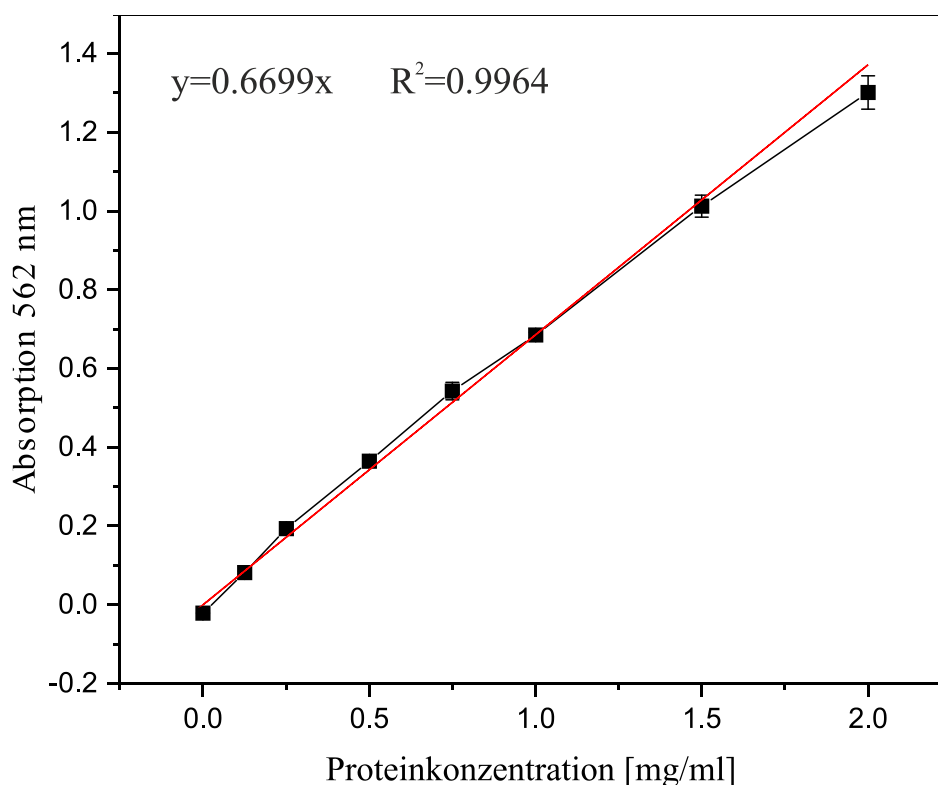


Abbildung 27: **Konzentrationsreihe, die mit Bovinem Serum Albumin (BSA) erstellt wurde und die zugehörige Standardkurve.**

Jede Konzentration wurde bei einer Absorption bei 562 nm gemessen. Das Bestimmtheitsmaß der Regressionsgerade mit der Gleichung $y=0.6699x$ beträgt 0.9964.

4.5.1.6 Co-Immunpräzipitation mit HA-markierten Untereinheiten aus einem Hefelysat

Zunächst wurde die Proteinkonzentration des Lysates mittels BCA Protein Assay Kit überprüft und je nach Versuch ein entsprechendes Volumen verwendet. Für die IP wurden magnetische Anti-FLAG oder Anti-HA Beads auf RT äquilibriert und 2-mal mit dem entsprechenden Lysepuffer ohne Proteaseinhibitor gewaschen. Die Menge an Beads für Western Blots war 10 μ L und für MS Experimente 50-100 μ L Beadsuspension. Ebenso wurde das Volumen an Lysat an das Beadvolumen angepasst. Für Western Blots wurden 300 μ L und für MS-Experimente 1-5 mL Lysat verwendet. Die

Immunpräzipitation wurde im Kühlraum bei 4 °C auf einem Rotator mit Programm C2-12 für 2-3 h durchgeführt. Anschließend wurden die Beads 4 bis 9-mal mit 1 mL Lysepuffer ohne Proteaseinhibitor gewaschen. Gebundene Proteine wurden für 15 min bei 37 °C und 400 RPM mit 26 bis 360 µL x LDS Puffer eluiert. Zur weiteren Denaturierung wurden die Proben mit DTT bei 70 °C gekocht und anschließend mit 120 mM Iodacetamid für 20 min im Dunkeln alkyliert. Für MS-Experimente wurde je 1 µL für den Western Blot oder das Silbergel verwendet. Bei großen Elutionsvolumina (100 bis 360 µL) wurde eine Acetonfällung über Nacht durchgeführt.

4.5.1.7 Co-Immunpräzipitation der DNA-PK aus INA6 Zelllysate

Die Immobilisierung der DNA-PK- und Kontrollantikörper an die A/G Magnetbeads sowie das folgende Crosslinken, die Zelllyse und die Immunpräzipitation wurden von Daniela Brünnert (AG Bargou) durchgeführt. Hierbei wurden die Bindung und das Quervernetzen der Antikörper gemäß der Herstellerbeschreibung durchgeführt. Die INA6 Zellen wurden wie in Kapitel 4.5.2.4 beschrieben aufgeschlossen. Für die eigentliche Co-Immunpräzipitation wurden jeweils 25 µL der Beadsuspension der Kontroll- und der anti-DNA-PK- Beads mit 2 mL INA6 Zelllysate für 2 h über-Kopf bei RT gedreht und alle 10-15 min sanft geschüttelt, um die Beads in Lösung zu halten. Danach wurden die Beads mit einem Magneten gesammelt, das Proteinlysate verworfen und die Beads 2-mal mit 1 mL HEPES Puffer mit 0.1 % NP40 gewaschen. Gebundene Proteine wurden mit 50 µL Elutionspuffer für 5 min bei RT von den Beads eluiert. Das Eluat wurde mit Hilfe des Magneten von den Beads getrennt und 30 µL der Proteinmischung mittels SDS-PAGE (Kapitel 4.5.2.8) aufgetrennt.

4.5.1.8 Crosslinking auf den Beads

Nach der Co-Immunpräzipitation und mehreren Waschschritten wurden die auf den Beads angereicherten Proteine mit verschiedenen Konzentrationen Glutaraldehyd oder BS3 quervernetzt. Aufgrund der schnelleren Reaktion wurde das Quervernetzen mit Glutaraldehyd nur für 5 min auf Eis und das Crosslinken mit BS3 wurde für 2 h bei 4 °C auf dem Rotator im Kühlraum durchgeführt. Überschüssiges GA oder BS3 wurde 2-mal für 5 min mit 1 mL Tris-HCl (pH 7.5) zum Abreagieren gebracht.

4.5.1.9 Verdau auf den Beads

Auf den Beads angereicherte Proteine wurden mit 100 μ L einer Verdauungslösung (2 M Harnstoff, 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.5 μ g Trypsin) für 30 min bei 27 °C und 800 RPM gespalten. Das Lysat wurde mit dem Magnetständer von den Beads getrennt, in ein neues 0.5 mL Low-Bind Reaktionsgefäß überführt und über Nacht bei RT verdaut. Die entstandenen Peptide wurden anschließend reduziert, alkyliert und mittels Stage Tips entsalzt (Kapitel 4.5.2.7).

4.5.1.10 Western Blot

Nach der Gelelektrophorese wurden die 4-12% Bis-Tris Gele direkt für den Transfer auf eine PVDF-Membran genutzt. Im ersten Schritt wurden 4 Schwämmchen und 2 rechteckige Kartonstückchen in Transferpuffer eingeweicht. Davon wurden 2 Schwämmchen und ein Kartonstückchen auf der Unterseite des XCell II™ Blot Module platziert und die aktivierte PVDF-Membran darauf gelegt (Abbildung 28). Das Gel und die restlichen Schwämmchen und Kartonstückchen wurden darauf geschichtet und die Luftblasen zwischen Membran und Gel entfernt. Die so erstellte Transfereinheit wurde in der XCell SureLock® Mini-Cell Blotkammer mit Transferpuffer aufgefüllt und so ausgerichtet, dass die Proteine vom Gel auf die Membran übertragen wurden. Der Transfer wurde entweder bei 30 V für 1 h oder mit 15 V über Nacht durchgeführt. Nach dem Transfer wurde das Gel, zur Kontrolle, mit Coomassie angefärbt.

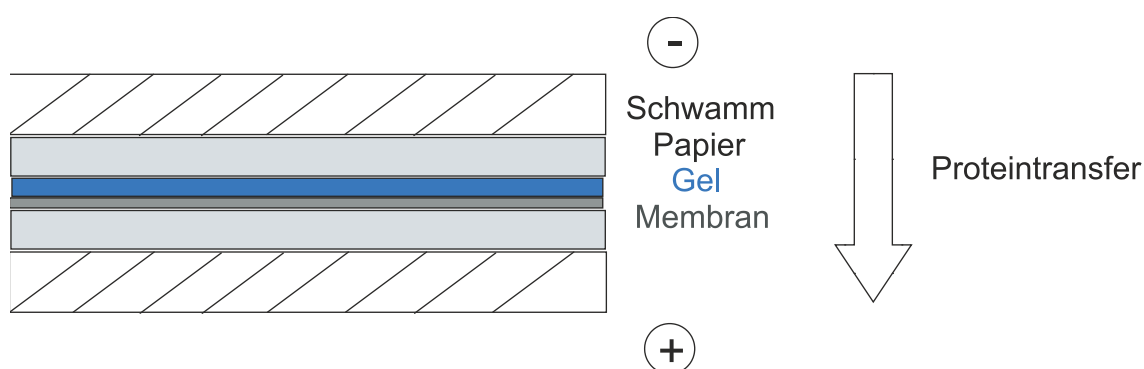


Abbildung 28: Schematische Darstellung des Aufbaus der Transfereinheit, die für den Tankblot verwendet wurde.

Durch die Anlagerung von anionischen Tensiden wird auf allen Proteinen eine einheitliche negative Ladung erzeugt. Durch das Anlegen einer Spannung werden die aufgetrennten Proteine vom Gel auf die Membran übertragen.

Die geblottete Membran wurde zunächst für 30 min in 1 x PBST Puffer mit 5 % Magermilch geblockt, um unspezifische Bindungen an die Membran zu verhindern. Danach folgte die Inkubation des ersten Antikörpers (anti-HA (SIGMA), anti-FLAG (Cell Signalling) oder anti-DNA-PK (Abcam); 1 h; 1:1000 verdünnt), der in 1 x PBST Puffer mit 5 % Magermilch gelöst war. Nach 3 Waschschritten für je 5 min mit 1 x PBST Puffer wurde der zweite Antikörper (anti-Kaninchen oder anti-Maus; 1 h; 1:1000 verdünnt) auf die Membran gegeben. Abschließend wurde die Membran 3-mal für 10 min in 1 x PBST Puffer gewaschen. Für die Detektion des Western Blots wurde die Membran mit H₂O gewaschen und mit 1 mL Entwicklerlösung aus dem Clarity ECLTM Western Blot Kit auf einer Klarsichtfolie inkubiert. Die Detektion der Chemilumineszenzsignale wurde an einem Chemilumineszenzdetektor von Alpha Innotech für 2-5 min bei hoher Auflösung durchgeführt. Die PVDF-Membran wurde nach der Detektion mit Ponceau angefärbt.

4.5.1.11 Silberfärbung

Die verwendeten Bis-Tris Gele wurden mit dem SilverXpress Kit angefärbt. Zunächst wurde das Gel mit 200 mL 50 % MeOH und 10 % Essigsäure für 10 min fixiert. Es folgte die Sensibilisierung mit 2-mal je 100 mL 50 % MeOH und Glutaraldehyd (5 mL Sensitizer) für 30 min. Nach 2 Waschschritten (5 min) mit je 200 mL H₂O wurde das Gel mit 100 mL Silberlösung (Färbemittel A (5 mL Silbernitrat) und Färbemittel B (5 mL Ammoniak NaOH)) für 15 min angefärbt. Es folgten 2 weitere Waschschrritte wie oben beschrieben. Die Entwicklung des Gels wurde mit 100 mL Entwicklerlösung (5 mL Entwickler (Formaldehyd) in 95 mL H₂O) durchgeführt. Um die Entwicklung des Gels zu stoppen wurden 5 mL der Stopplösung (Zitronensäure) zugegeben. Abschließend wurde das Gel 3-mal mit 100 mL H₂O für jeweils 10 min gewaschen und im Kühlschrank gelagert.

4.5.1.12 Synthese von Disuccinimidyl Sulfoxid (DSSO)

DSSO wurde wie in Kao et al. 2011 beschrieben synthetisiert (Abbildung 29). Im ersten Schritt wurde das Sulfid S1 synthetisiert: 3,3-Thiodipropionsäure (2.50 g; 14.0 mmol) wurde mit N-hydroxy-succinimid (3.30 g; 28.6 mmol) in einem Rundkolben in 1,4-Dioxan (60 mL) gemischt. Die Reaktionsmischung wurde mit einem Rührfisch durchmischt während eine Lösung von N,N-Dicyclohexylcarbodiimid (5.79 g; 28.1

mmol) in Dioxan (20 mL) über einen Tropftrichter unter Argon innerhalb von 12 h zugegeben wurde. Nach der Reaktion wurde der unlösliche Harnstoff mittels Filter und Büchnertrichter von der flüssigen Fraktion getrennt. Letztere wurde anschließend im Rotationsverdampfer eingedunstet. Der weiße Rückstand wurde mit kaltem Diethylether und kaltem Hexan gewaschen. Der gewaschene Feststoff (Sulfid S1) wurde im Exsikkator getrocknet und ohne weitere Reinigung verwendet.

Sulfid S1 (0.600 g; 1.61 mmol) in Chloroform (CHCl₃, 30 mL) wurde bei 0 °C mit einer Lösung von m-Chlorperbenzoesäure (0.371 g; 1.61 mmol) in CHCl₃ (10 mL) gemischt. Das Produkt wurde gefiltert und mit kaltem CHCl₃ (10 mL) und kaltem MeOH (10 mL) gewaschen. Das Filtrat wurde für 1 h auf -10 °C gekühlt und erneut mit kaltem CHCl₃ und MeOH gewaschen und im Exsikkator bei reduziertem Druck getrocknet und ohne weitere Reinigung verwendet.

Die qualitative Überprüfung wurde mittels direkter Messung über eine Nanospray Nadel an einer LTQ durchgeführt.

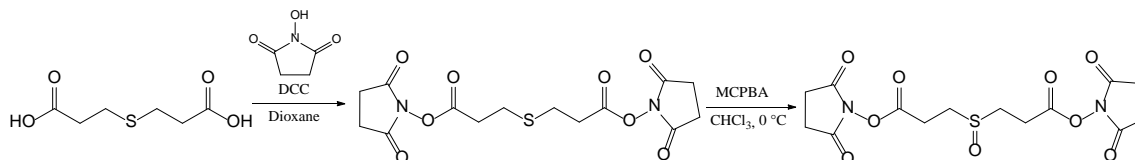


Abbildung 29: Reaktionsschema der Synthese von Disuccinimidylsulfoxid.

Im ersten Schritt wurde 3,3'-Thiodipropionsäure mit N-Hydroxysuccinimid und Dicyclohexylcarbodiimid in Dioxan zum Sulfid S-1 synthetisiert. Im zweiten Schritt wurde Sulfid S-1 mit meta-Chlorperbenzoesäure in Chloroform zu DSSO oxidiert (Modifiziert nach (Kao et al., 2011)).

Zur qualitativen Überprüfung des Reaktionsproduktes wurde die Substanz DSSO in 50 % ACN mit 0.1 % FA gelöst und an der LTQ per direct infusion gemessen. Für das Massenspektrum in Abbildung A. 36 wurden die Spektren von 1 min Messzeit zusammengefasst. Es ist deutlich zu sehen, dass DSSO mit dem größten Peak das Hauptprodukt ist (m/z 411.04). Weiterhin ist zu sehen, dass auch das Edukt S-1 (m/z 395.04) und eine doppelt oxidierte Form (m/z 427.08) nach der Synthese vorliegen.

4.5.1.13 LTQ Messungen mit der Nanospraynadel

Die verwendeten niedermolekularen Substanzen oder nicht komplexe Proben zur Methodvalidierung wurden mit einer Nanospraynadel an einer LTQ gemessen. Hierzu wurde 1 μL der jeweiligen Lösung mit je 50 μL H_2O und ACN versehen und mit Ameisensäure auf 0.1 % angesäuert. Von dieser Lösung wurden etwa 10 μL in die Nanospraynadel pipettiert und in der dafür vorgesehenen Quelle platziert und ausgerichtet. Mit Hilfe der Spritzenvorrichtung wurde Druck auf die Nadel ausgeübt, sodass die Probe aus der Nadel fließen konnte. Gleichzeitig wurden die Massenspektren der jeweiligen Substanzen für 1 Minute aufgezeichnet. Die verwendete Quelle (Nanospray Flex) wurde mit einer Spannung von 2.11 kV und einer Kapillartemperatur von 199.99 °C betrieben.

4.5.1.14 Crosslinking von Cytochrom C mit DSSO

Das Crosslinking mit Cytochrom C bovine heart wurde mit einer 200 μM Stocklösung in 1x PBS (pH 7.5) und einer 20 mM Stocklösung von DSSO in DMSO durchgeführt. Um einen 10-fachen Überschuss an DSSO zu erreichen, wurden 20 μL an Cytochrom C mit 2 μL DSSO gemischt. Anschließend wurde das Cytochrome C bei RT für eine Stunde auf dem Schüttler Stufe 1 mit DSSO quervernetzt. Überschüssiges DSSO wurde nach der Reaktion mit 178 μL einer Lösung von 200 mM ABC zum Abreagieren gebracht. Für den tryptischen Verdau des quervernetzten Proteins wurden 0.5 μg Trypsin in 50 μL 0.1 mM ABC zugegeben und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Von den entstandenen Peptiden, die in 250 μL Endvolumen gelöst waren, wurden 2 μL entnommen und im Vakuumkonzentrator eingeeengt. Die eingeeengten Peptide wurden für die Messung in 20 μL 2 % ACN und 0.1 % FA aufgenommen und 8 μL der Probe wurde für die Messung injiziert (Kao et al., 2011).

4.5.1.15 NanoLC-MS/MS Analyse für Proben mit quervernetzten Peptiden

Die Messung der Proben mit quervernetzten Peptiden wurde wie in Kapitel 4.5.2.10 beschrieben durchgeführt. Zusätzlich wurde für manche Messungen die Mindestladung für die Auswahl von MS^1 -Spektren auf +4 erhöht.

4.5.1.16 Datenbanksuche von quervernetzten Peptiden mit StavroX

Die massenspektrometischen Rohdaten wurden für die Analyse mit der Software StavroX in das mgf-Format (mascot generic file) umgewandelt. Die mgf-Datei wurde anschließend zusammen mit einer Textdatei in die Software geladen, die alle zu untersuchenden Proteine im FASTA-Format beinhaltet. Als Enzym wurde Trypsin mit 3 möglichen ausgelassenen Schnittstellen ausgewählt. Die einzige feste Modifikation war die Alkylierung von Cysteinen. Als variable Modifikation wurde die Oxidation von Methionen und Pyroglutaminsäure am N-Terminus angegeben. Der verwendete Crosslinker war BS3, der mit den Seitenketten von Lysin reagiert. Die Massengenauigkeit des Precursors wurde auf 3 ppm und die der Fragmentationen auf 10 ppm festgelegt. Das untere Massenlimit betrug 200 Da und das obere 6000 Da. Als Fragmentationen wurden b- und y-Ionen ausgewählt. Die minimale FDR für quervernetzte Peptide wurde auf 5 % festgelegt.

4.5.1.17 Crosslinking von UBX und p97N mit DSSO

Die überexprimierten Proteine UBX und p97N wurden von Petra Hänzelmann (AG Schindelin, RVZ) zur Verfügung gestellt. Beide Proteine lagen bereits in einem 1:1 Verhältnis und einer Konzentration von 18 mg/mL in 1 x PBS Puffer vor. Für das Quervernetzen der Proteine, mit anschließender Analyse im Gel, wurden 2 µL der Proteinstocklösung mit 0.5 - 2 µL einer 10 mM DSSO Stocklösung (in DMSO) versehen und mit 1 x PBS Puffer auf 13 µL Endvolumen aufgefüllt. Die Quervernetzungsreaktion wurde für 1 h auf einem Schüttler bei Stufe 2 durchgeführt. Anschließend wurde das restliche DSSO mit 13 µL einer 1 M ABC-Lösung gequenchet. Das Endvolumen von 26 µL wurde mit 10 µL 4 x LDS Puffer und 4 µL DTT 500 mM versehen und für 10 min bei 70 °C gekocht. Weiterhin wurden die Proben für die MS-Messungen mit einer finalen Konzentration von 120 mM IAA für 20 min im Dunkeln alkyliert. Für jede Geltasche wurden 10 µL des Ansatzes mit 10 µL 1 x LDS verdünnt. Die Gelelektrophorese wurde wie in Kapitel 4.5.2.8 beschrieben durchgeführt. Die Gelbanden wurden entweder mit 0.1 µg Trypsin oder Elastase verdaut und mit der Orbitrap Velos Pro gemessen. Hierzu wurden 18 µL der Probe für die Messung über den Autosampler injiziert.

4.5.1.18 MS³-Methode für das DSSO Crosslinking

Für die Messung von Peptiden, die mit DSSO quervernetzt wurden, wurde eine angepasste MS³-Methode verwendet. Ein Messzyklus setzte sich aus den in Tabelle 6

beschriebenen Scans zusammen. Zunächst wurde ein Precursorscan (MS^1) mit einer Auflösung von 30000 durchgeführt. Der intensivste Peak aus dem MS^1 wurde mittels CID fragmentiert und mit einer Auflösung von 7500 in der Orbitrap gemessen (MS^2). Aus diesem Scan wurden die beiden intensivsten Peaks nacheinander mit CID fragmentiert und die Fragmente wurden in der LTQ gemessen (2-mal MS^3).

Anschließend wurde der zweitintensivste Peak aus dem MS^1 (Tabelle 6 Scan 5) mit CID bei einer Auflösung von 7500 fragmentiert. Wiederum wurden die beiden intensivsten Peaks aus diesem Scan mit CID fragmentiert und in der LTQ gemessen (2-mal MS^3).

Tabelle 6: Verwendeter Scanzzyklus, der für die Detektion von quervernetzten Peptiden mit DSSO verwendet wurde.

Scan-Nr.	MS-Ebene	Detektor	Auflösung	Fragmentierung	Bezugsscan
1	MS^1	Orbitrap	30000	-	-
2	MS^2	Orbitrap	7500	CID	Most intense Peak aus Scan 1
3	MS^3	LTQ	min. 500	CID	Most intense Peak aus Scan 2
4	MS^3	LTQ	min. 500	CID	2 nd most intense Peak aus Scan 2
5	MS^2	Orbitrap	7500	CID	2 nd most intense Peak aus Scan 1
6	MS^3	LTQ	min. 500	CID	Most intense Peak aus Scan 5
7	MS^3	LTQ	min. 500	CID	2 nd most intense Peak aus Scan 5

4.5.1.19 Datenbanksuche für quervernetzte Peptide mit DSSO

Die Rohdaten, die mit der MS³-Methode aus Kapitel 4.5.1.18 erzeugt wurden, wurden von Dr. Jens T. Vanselow (AG Schlosser, RVZ) mit einem Skript umgeschrieben. Somit konnten die MS³-Spektren als Fragmentationenspektren (MS²) über den Mascot Distiller gegen eine kleine selbsterstellte Datenbank gesucht werden. Hierzu wurde der Mascot Distiller 2.4 mit folgenden Parametern verwendet (Tabelle 7): Massentoleranz der Peptide 10 ppm; MS/MS Massentoleranz 0.6 Da; Trypsin mit 3 ausgelassenen Spaltstellen oder keine bei Elastase; feste Modifikationen: Carbamidomethylierung (C); variable Modifikationen: Acetyl (Protein N-term), DSSO inter A (K), DSSO inter S (K), DSSO inter T (K), Gln->pyro-Glu (N-term Q), Oxidation (M).

Tabelle 7: Liste der verwendeten festen und variablen Modifikationen mit Masse und elementarer Zusammensetzung.

Modifikation	Masse	Zusammensetzung
Acetyl (Protein N-term)	42.0106 Da	C ₂ H ₂ O
Carbamidomethyl (C)	57.0215 Da	C ₂ H ₃ NO
DSSO inter A (K)	54.0106 Da	C ₃ H ₂ O
DSSO inter S (K)	103.9932 Da	C ₃ H ₄ O ₂ S
DSSO inter T (K)	85.9826 Da	C ₃ H ₂ OS
Gln->pyro-Glu (N-term Q)	-17.0266 Da	- H ₃ N
Oxidation (M)	15.9949 Da	O

4.5.1.20 Markierung der C-Termini von Peptiden mit ¹⁸O bei pH 8

Für die Markierung der C-Termini von Peptiden, wurden 10 pmol des Proteins β -Galactosidase (β -Gal; bereits red. und alkyliert) durch Gelelektrophorese in eine Gelmatrix gebracht (Kapitel 4.5.2.8). Ein 10 μ L Aliquot mit 0.1 μ g/ μ L Trypsin wurde im Vakuumkonzentrator eingengt und erneut mit 10 μ L 50 mM Essigsäure in H₂¹⁸O aufgenommen. Mit einer Lösung von 0.1 M ABC in H₂¹⁸O wurde das Trypsin Aliquot auf 100 μ L aufgefüllt und für den weiteren Verdau verwendet. Hierzu wurden 10 μ L Trypsin in 0.1 M ABC zu einer getrockneten β -Gal Gelbande gegeben und mit 30 μ L 0.1 M ABC

in H_2^{18}O für den Verdau über Nacht aufgefüllt. Nach dem Verdau wurde die Reaktion mit 0.5 μL Ameisensäure auf pH 3 angesäuert, um das restliche Trypsin zu inaktivieren.

4.5.1.21 Markierung der C-Termini von Peptiden mit ^{18}O bei pH 8 und pH 6

Für die erste Markierungsreaktion bei pH 8 wurde das Aliquot wie in Kapitel 4.5.1.20 beschrieben vorbereitet. Die getrockneten Gelbanden mit 10 pmol β -Gal wurden wie in Kapitel 4.5.1.20 beschrieben behandelt. Die markierten Peptide wurden in ein neues 0.5 mL Lowbind Reaktionsgefäß überführt und die Gelstücke mit 10 μL 0.1 M ABC in H_2^{18}O für 30 min auf dem Schüttler extrahiert. Das Extrakt wurde im 0.5 mL Reaktionsgefäß vereint und mit 0.5 μL Ameisensäure angesäuert (pH 3) und in der Lyophille getrocknet. Für die zweite Markierung wurde zu einem Aliquot Trypsin 100 μL 50 mM Zitronensäure (pH 6) gegeben und in der Lyophille eingetrocknet. Das getrocknete Trypsin wurde mit 100 μL H_2^{18}O in Lösung gebracht. Von dieser Lösung wurden 10 μL und weitere 20 μL H_2^{18}O auf die bereits markierten Peptide gegeben und die Peptide ein weiteres Mal bei pH 6 für 120 min bei 37°C und 1200 rpm markiert. Nach der Ansäuerung der Peptide mit 0.5 μL Ameisensäure (pH 3) wurde die Messung direkt aus H_2^{18}O durchgeführt oder die Probe mittels StageTips entsalzt (siehe 4.5.2.7).

4.5.1.22 Inaktivierung von Trypsin mit Pefabloc nach der ^{18}O -Markierung

Nach der Markierungsreaktion wie in Kapitel 4.5.1.21 beschrieben, wurde das restliche Trypsin mit 5 μg Pefabloc (in 1 μL ^{18}O -Wasser gelöst) für 15 min bei 500 RPM und RT inaktiviert und mit FA angesäuert. Die Probe wurde anschließend mittels StageTips entsalzt und für die Messung in 22 μL 2% ACN mit 0.1% FA aufgenommen (H_2^{16}O).

4.5.2 Interaktionen von Protein mit niedermolekularen Verbindungen

Um die Interaktionspartner verschiedener niedermolekularer Verbindungen zu identifizieren, wurden diese an magnetische Streptavidinbeads immobilisiert. Als Kontrolle wurden unbeladene Streptavidinbeads benutzt. Beide Proben wurden parallel mit INA6 Zellysat inkubiert, gewaschen und die Proteine mit LDS Puffer eluiert. Die quantitative Information beider Proben wurde in der Auswertung dazu genutzt, um zwischen spezifisch an dem Inhibitor gebundene Proteine von unspezifisch an den Beads gebundene Proteine zu unterscheiden.

4.5.2.1 Immobilisierung der biotinylierten Verbindungen

Die niedermolekularen Verbindungen wurden aufgrund ihrer hydrophoben Eigenschaften in DMSO gelöst. Für die Immobilisierung wurden die Verbindungen und die magnetischen Beads zunächst auf Raumtemperatur äquilibriert. Anschließend wurden für jede Probe 50 - 100 μ L an Beaduspension entnommen und mit einer 1:1 Mischung von DMSO und 50 mM Borat Puffer pH 8.5 gewaschen. Um die magnetischen Beads mit den biotinylierten Verbindungen zu sättigen, wurden 500 nmol der Substanzen in 400 μ L einer 1:1 Mischung von DMSO und 50 mM Borat Puffer pH 8.5 über Nacht bei Raumtemperatur rotiert. Die Kontrollbeads wurden gleichermaßen ohne Inhibitor behandelt. Der Überstand wurde am nächsten Morgen verworfen und die Beads 2-mal mit 1 mL 50 % DMSO gewaschen. Beim zweiten Waschen wurden die Beads in neue 2 mL Reaktionsgefäße transferiert und 2-mal mit 500 μ L Pierce IP Lysis Buffer gewaschen.

4.5.2.2 Anzucht von INA6-Zellen

INA6-Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ in RPMI-Medium mit 2 ng/mL Interleukin-6 kultiviert. Dem Medium wurde außerdem 10 % FBS, 100 U/mL Penicillin, 100 μ g/mL Streptomycin, 1 mM Natriumpyruvat und 2 mM Glutamin zugegeben. Die Anzucht aller INA6-Zellen, die in dieser Arbeit verwendet wurden, wurde von Dr. Daniela Brännert (AG Bargou) durchgeführt. Startbedingungen waren 100.000 Zellen, die für ca. eine Woche auf die gewünschte Zellzahl vermehrt wurden.

4.5.2.3 SILAC Labeling von INA6 Zellen

Für die Markierung von INA6-Zellen mit Lys6 und Arg10 wurde das Medium RPMI-1640 mit 10 % dialysiertem FBS und 200 mM L-Glutamine verwendet. Für die Markierung mit schwerem Lysin und Arginin wurden 12.05 mg/50 mL Arg10 und 2 mg/50 mL Lys6 zugegeben. Um die metabolische Konversion von Arginin zu Prolin zu verhindern wurden zusätzlich 2 mg/50 mL Prolin verwendet. Die INA6-Zellen wurden mindestens 7 Tage im SILAC Medium herangezogen, um eine vollständige Markierung zu erreichen. Die Markierung der Kontrolle mit leichtem Lysin und Arginin wurde mit leichten Aminosäuren in gleicher Weise durchgeführt. Die Markierung der Zellen wurde von Dr. Daniela Brännert (AG Bargou) durchgeführt.

4.5.2.4 Zellyse von INA6 Zellen

INA6-Zellen ($5 \cdot 10^7$) wurden mit 2 mL Pierce IP Lysis Buffer und 20 μ L Halt Protease Inhibitor Cocktail aufgeschlossen. Hierzu wurden die Zellen über einen Zeitraum von 10 Minuten jede Minute auf einem Schüttler durchmischt und zwischendurch auf Eis abgekühlt. Das entstandene Zelllysate wurde in einer auf 4 °C vorgekühlten Zentrifuge 5 min bei 16.000 x g von den festen Bestandteilen getrennt. Weiterhin wurde die Proteinkonzentration mittels BCA-Assay (Pierce) ermittelt.

4.5.2.5 Anreicherung der Zielproteine

Mit Inhibitor beladene magnetische Beads und die Beadkontrolle wurden mit 3-5 mg INA6 Proteinlysate versehen und 2-3 h oder über Nacht bei 4 °C kopfüber rotiert. Danach wurde das Zelllysate entnommen und die Beads 4-mal mit 1 mL HEPES-Puffer (0.5 % NP40) gewaschen. Die gebundenen Proteine wurden mit 360 μ L 1 x LDS Probenpuffer eluiert und mit 40 μ L 500 mM DTT für 10 min bei 70 °C reduziert. Weiterhin wurden die Proben für die MS-Messungen mit einer finalen Konzentration von 120 mM Iodacetamid für 20 min im Dunkeln alkyliert. Mit einem Magnetständer wurden die Eluate von den magnetischen Beads getrennt. Die Fällung der Proteine im Eluat wurde mit dem 4-fachen Probenvolumen an Aceton über Nacht bei -20 °C durchgeführt. Die gefällten Proteinpellets wurden 3-mal mit 1 mL 80 % Aceton gewaschen.

4.5.2.6 Verdau von Proteinen in Lösung

Die gefällten Proteine wurden in 50 μ L 0.5 % Natriumdeoxycholat (SDC) und 0.1 M Ammoniumhydrogencarbonat (pH 8) gelöst und mit Trypsin bei 37 °C über Nacht verdaut (Trypsin-zu-Protein Verhältnis: 1:200). Danach wurden 60 μ L Ethylacetat und 2.4 μ L 25 % TFA zugegeben. Das protonierte SDC löst sich nun im Essigsäureethylester und kann einfach abgetrennt werden (Masuda et al., 2008). Reste an Essigsäureethylester wurden mit dem Vakuumkonzentrator entfernt und die entstandenen Peptide mittels C18 Stage Tips entsalzt.

4.5.2.7 Entsalzung von Proben mit Stage Tips

In eine gelbe 200 μ L Pipettenspitze wurden 3 Scheiben 3M Empore™ SPE Extraction Disks platziert. Zunächst wurde das C18-Material mit 50 μ L Methanol aktiviert und

anschließend mit 50 μL 60 % ACN und 0.3 % TFA gewaschen (Stage Tip Zentrifuge), gefolgt von einer Äquilibration mit 2-mal 50 μL 0.3 % TFA in H_2O (Stage Tip Zentrifuge). Für das Entsalzen der Probe wurden zunächst weitere 50 μL 0.3 % TFA in H_2O auf die C18 Scheiben vorgelegt und anschließend die Probe dazu pipettiert, um durch die Verdünnung zu verhindern, dass Reste an Essigsäureethylester die Peptide direkt beim Laden auf das C18-Material eluieren. Die geladenen Peptide wurden 2-mal mit 50 μL 2 % ACN und 0.3 % TFA in H_2O gewaschen (Stage Tip Zentrifuge) und danach mit 2-mal 20 μL 60 % Acetonitril und 0.3 % TFA bei 2.000 x g für 5 min in 0.5 low-bind Reaktionsgefäße eluiert. Das Elutionsvolumen wurde anschließend in der Vakuumzentrifuge zur Trockene eingengt. Für die MS-Messung wurden die getrockneten Proben in 2 % ACN und 0.1 % FA aufgenommen, geschüttelt, 5 min im Ultraschallbad resolubilisiert und in ein HPLC-Gefäß transferiert.

4.5.2.8 SDS-PAGE

Die Proben wurden mit 1 x LDS Probenpuffer versehen und mittels 4-12% Bis-Tris Gelen und MOPS Puffer bei 220 V für 50 min aufgetrennt. Nach der Auftrennung wurden die Gele 3-mal mit H_2O gewaschen und für 1 h mit Simply Blue Safe Stain angefärbt. Das Entfärben der Gele wurde ebenfalls für 1 h mit H_2O durchgeführt. Die Gele wurden bis zur Vorbereitung für die MS-Messung bei 4 °C gelagert.

4.5.2.9 Verdau von Proteinen im Gel

Die Gelspur einer Probe wurde in 15 Banden geschnitten und in 0.5 mL Low-Bind Reaktionsgefäße aufgeteilt. Jede Bande wurde zudem mit einem Skalpell in kleinere Teilstücke geschnitten. Die Proben wurden dann mit 400 μL einer Lösung aus 30 % ACN und 0.1 M ABC (pH 8) für 10 min auf einem Schüttler Stufe 1 entfärbt. Ein erneuter Waschschrift wurde gleichermaßen mit 400 μL 0.1 M ABC (pH 8) durchgeführt. Die entfärbten Gelstücke konnten mit 400 μL ACN geschrumpft und mit dem Vakuumkonzentrator getrocknet werden. Die Gelbanden wurden mit 0.1 μg Trypsin in 0.1 M Ammoniumhydrogencarbonat (pH 8) bei 37 °C über Nacht verdaut. Nachdem der Überstand in ein HPLC-Gefäß überführt wurde, wurden die Peptide aus den Gelstücken mit 10 μL 5 % Ameisensäure für 30 min auf einem Schüttler Stufe 1 extrahiert und im selben HPLC-Gefäß vereint.

4.5.2.10 NanoLC-MS/MS Analyse

Die Proben wurden mit einer Orbitrap Fusion oder einer Orbitrap Velos Pro gemessen, die mit einer EASY-Spray Ionenquelle gekoppelt an eine EASY-nLC 1000 verbunden ist. Die Peptide wurden auf eine TRAP-Säule geladen (2 cm x 75 µm ID, PepMap C18, 3 µm Partikel, 100 Å Porengröße) und mit einer EASY-Spray analytischen Säule (75 µm ID, PepMap C18, 2 µm Partikel, 100 Å Porengröße, Umkehrsäulenmaterial) mit einem 200 nL/min Fluss und einem linearen Gradienten von 3 % bis 32 % Acetonitril 0.1 % FA aufgetrennt.

Die Proben, die in Lösung verdaut wurden, wurden auf einer 50 cm analytischen Säule mit einem 180 min Gradienten auf einer Fusion Orbitrap analysiert (MS Scanauflösung von 60,000, MS/MS Scanauflösung 7,500, HCD Fragmentierung, Top Speed Methode mit max. 3 sek Zyklusdauer).

In-Gel Proben wurden mit einer 25 cm Säule und einem 30 min Gradienten auf einer Orbitrap Fusion (MS Scanauflösung von 60,000, MS/MS Scanauflösung 7,500, HCD Fragmentierung, Top Speed Methode mit max. 3 sek Zyklusdauer) oder mit einem Orbitrap Velos Instrument mit einer MS Scanauflösung von 30.000 gemessen. Orbitrap Velos Pro MS/MS Scans wurden entweder mit der Orbitrap (Auflösung 7,500, HCD Fragmentierung, Top 5 Methode) oder in der Ionenfalle gemessen (CID Fragmentierung, Top 15 Methode).

Einfach geladene Vorläufermoleküle wurden nicht für MS/MS Spektren ausgewählt und es wurde eine dynamische Ausschlussliste angewandt. EASY-IC (Fusion) oder Lock-Mass (Velos) wurden für die interne Kalibrierung während allen Läufen verwendet.

4.5.2.11 MS Datenanalyse

Für die Datenprozessierung der Rohdaten, die Datenbanksuche und die Quantifizierung wurde Maxquant Version 1.5.3.30 oder höher benutzt (Cox and Mann, 2008). Gesucht wurde gegen die *H. sapiens* Proteomdatenbank (UniProt) und zusätzlich gegen eine Datenbank mit bekannten Kontaminierungen. Weiterhin wurde die Suche auf den tryptischen Verdau und drei mögliche Schneidefehler angepasst.

Die Identifizierung von Proteinen erfolgte mittels False-Discovery Rate (< 1% FDR Auf Protein- und Peptidebene). Zusätzlich zu den Maxquant Standardeinstellungen wurde die Suche gegen folgende variable Modifikationen durchgeführt: Acetylierung des Protein N-Terminus, Gln zu pyro-Glu (N-term. Gln) und Oxidation (Met). Für die Proteinquantifizierung wurden die LFQ Intensitäten genutzt. Proteingruppen mit weniger als 2 identifizierten razor/unique Peptiden wurden verworfen. Experimente zu denen ein In-Lösungs- und ein In-Gel Verdau durchgeführt wurde, wurden bei der Auswertung als technische Replikate zusammengefasst.

Zur weiteren Datenanalyse wurde ein hausintern entwickeltes R-Skript benutzt. Fehlende LFQ Intensitäten in den Kontrollproben wurden mit Werten nahe der Basislinie ersetzt (z.B. mit Werten von einer Normalverteilung mit einem Mittelwert von dem 1 % Quantil der log₁₀-transformierten LFQ Intensitäten (der Inhibitor- und der zugehörigen Kontrollprobe) und einer Standardabweichung von 0.05. Um die signifikant angereicherten Proteine innerhalb der Replikate zu identifizieren wurde das R-Paket Limma benutzt. Weitere Kriterien waren: Signifikante Anreicherung in mindestens 2 Replikaten und ein Benjamini-Hochberg angepasster p-value von 0.02 oder weniger, was einem q-value von 2% (FDR) entspricht.

Um zwei verschiedene Anreicherungsexperimente mit mehreren Replikaten zu vergleichen, wurden die log₂-Proteinverhältnisse beider Versuche jeweils standardisiert (Z-Score, Gleichung 4) und gegeneinander aufgetragen.

$$Z = \frac{x - \mu}{\sigma} \quad (4)$$

Mit: μ Median

σ Standardabweichung

Hierzu wurden von allen Medianen der log₂-Proteinverhältnisse (x) (Inhibitor/Kontrolle (mit n Replikaten > 1)) der Median der log₂-Proteinverhältnisse aller Daten (μ) abgezogen und durch die Standardabweichung (σ) geteilt. Fehlende Z-Scores wurden für die graphische Darstellung durch 0 ersetzt. Die beiden Z-Scores wurden anschließend gegeneinander geplottet.

Für die Interpro-Domänen-Anreicherung wurde der *Fisher's exact test* mit folgenden Kriterien angewendet: Signifikant angereicherte Proteine ($q < 0.02$ und $n > 1$ und Median \log_2 Proteinverhältnis > 0); Unspezifisch angereicherte Proteine ($q \geq 0.02$ und $n > 1$).

4.5.2.12 MS-Datenanalyse von SILAC Experimenten

Die Analyse der Daten aus den SILAC Experimenten wurde mit entsprechenden Änderungen wie in Kapitel 4.5.2.11 beschrieben durchgeführt.

Die Quantifizierung wurde anhand der erzeugten schweren und leichten Peptidpaare erreicht. Hierzu wurde Lys6 und Arg10 als Quantifizierungsoption in Maxquant ausgewählt. Die maximale Anzahl an Markierungen wurde auf drei begrenzt.

4.5.2.13 DNA-PK Kinaseassay

Der Kinaseassay wurde wie vom Hersteller beschrieben verwendet. Hierzu wurde zunächst eine Verdünnungsreihe der verwendeten Inhibitoren in der 384-Well Platte angesetzt. Die Verdünnungen wurden in 1x Kinasepuffer angesetzt und die finale DMSO-Konzentration betrug 1 % in jedem Behandlungswell.

Als nächstes wurde der Substrat/ATP-Mix angesetzt. Dazu wurden 50 μL 4 x Kinasepuffer mit 50 μL 100 μM ATP (10X) und 100 μL Substrat (1 mg/mL) gemischt. Anschließend wurde die Kinaselösung mit 98 μL H_2O , 35 μL 4 x Kinasepuffer und 7 μL DNA-PK (100 ng/ μL) erzeugt. Für jede Kinasereaktion wurden 2 μL der Kinaselösung, 1 μL der entsprechenden Inhibitorverdünnung und 2 μL des Substrat/ATP-Mix gemischt. Als Positivkontrolle wurde die Kinase ohne den Einfluss von Inhibitor verwendet. Für die Negativkontrolle wurden die Kinase und der Inhibitor weggelassen. Das Endvolumen in jedem Behandlungswell betrug 5 μL .

Das Reaktionsvolumen wurde zunächst für 2 min im TriStar LB 941 Multimode Mikroplattenleser geschüttelt und für 60 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden in jedes Well 5 μL ADP-Glo Reagenz pipettiert, erneut 2 min geschüttelt und für 60 min bei RT inkubiert. Um die Kinaseaktivität zu detektieren wurden 10 μL Kinasedetektionsreagenz zu jedem Ansatz pipettiert, für 2 min geschüttelt und für 60 min bei RT inkubiert. Die Messung der Chemilumineszenz wurde mit einem TriStar LB 941

für 0.5 sek durchgeführt. Alle gemessenen Inhibitorkonzentrationen wurden mindestens in 3-facher Bestimmung durchgeführt. Für die Auswertung wurde zunächst der Nullwert der Negativkontrolle von allen Werten abgezogen. Im nächsten Schritt wurden alle Inhibitorkonzentrationen auf den 100 % Wert der Positivkontrolle normiert.

5 Ergebnisse und Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zum einen Protein-Protein Interaktionen (Kapitel 5.1) und zum anderen Interaktionen von niedermolekularen Substanzen mit Proteinen (Kapitel 5.2) analysiert.

Die Versuche bezüglich der Protein-Protein Interaktionen wurden mit dem Ziel durchgeführt, neue bzw. verbesserte Methoden und Strategien für das sogenannte Topology Mapping zu entwickeln, um direkte von indirekten Interaktionen voneinander unterscheiden zu können. Als Methode hierfür wurde das Quervernetzen von Proteinen gewählt und verschiedene Strategien evaluiert. Als Modellsysteme wurden rekombinante Proteine mit geringer Probenkomplexität und bekannter Interaktion, aber auch komplexe Proben aus der Co-IP eines Proteinkomplexes (Mediatorkomplex) mit möglichen neuen, unbekanntem Interaktionen verwendet.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden die potentiellen zellulären Zielstrukturen von verschiedenen Verbindungen identifiziert, die einen wachstumshemmenden Effekt auf MM-Zellen haben. Hierfür wurden die Verbindungen an Beads immobilisiert und die potentiellen *Drug Targets* aus einem komplexen MM-Zelllysat angereichert. Diese Versuche wurden im Rahmen der Klinischen Forschergruppe 216 durchgeführt.

5.1 Analyse von Protein-Protein Interaktionen

Die Kombination von Co-IP und Massenspektrometrie ist eine leistungsfähige Methode, um Protein-Protein-Interaktionen zu untersuchen (Bauer and Kuster, 2003). Neben der Identifizierung von stabilen Interaktionen können, durch eine schonende Probenvorbereitung, auch schwache und transiente Interaktionen untersucht werden (Uthe et al., 2017). Die entscheidende Limitation dieser Strategie ist es, dass man nicht zwischen direkten und indirekten Interaktionen unterscheiden kann. Gerade diese Information ist wichtig, um die Rollen der einzelnen Interaktionspartner nachvollziehen zu können. Eine Lösung hierfür ist die Kombination von Co-IP mit der Quervernetzung der Proteine und anschließender Massenspektrometrie. Das Resultat ist ein sogenanntes Topology Mapping (Liu and Heck, 2015), bei dem die gefundenen Interaktionspartner als direkte und indirekte Interaktoren von anderen Proteinen oder Proteinmodulen zugeordnet

werden können (Abbildung 30). Der Nachweis von Peptiden, die miteinander quervernetzt wurden, beinhaltet zum einen die Information, dass zwei Proteine miteinander interagieren und zum anderen mit welchen Bereichen innerhalb der Proteine die Interaktion stattfindet.

Neben den genannten Vorteilen des chemischen Quervernetzens gibt es auch einige Limitationen (Kalkhof and Sinz, 2008), die im Rahmen dieser Arbeit genauer untersucht wurden. Für das Problem der eingeschränkten Datenbanksuche und der niedrigen Abundanz von quervernetzten Peptiden wurden jeweils Lösungsansätze entwickelt und versucht, diese ebenfalls im Labor zu etablieren (Kapitel 5.1.2 und 5.1.3). Ein weiterer Ansatz, um Proteininteraktionen zu untersuchen, ist die Verschiebung von quervernetzten Proteinen während der SDS-PAGE. Da in diesem Versuch die Identifizierung der Interaktionen nicht mit den quervernetzten Peptiden durchgeführt wird, können reaktivere Crosslinker wie Glutaraldehyd verwendet werden, die keine definierte Modifikation erzeugen und somit inkompatibel für eine Datenbanksuche sind ((Subbotin and Chait, 2014) Kapitel 5.1.4.).

Topology Mapping des Mediatorkomplex

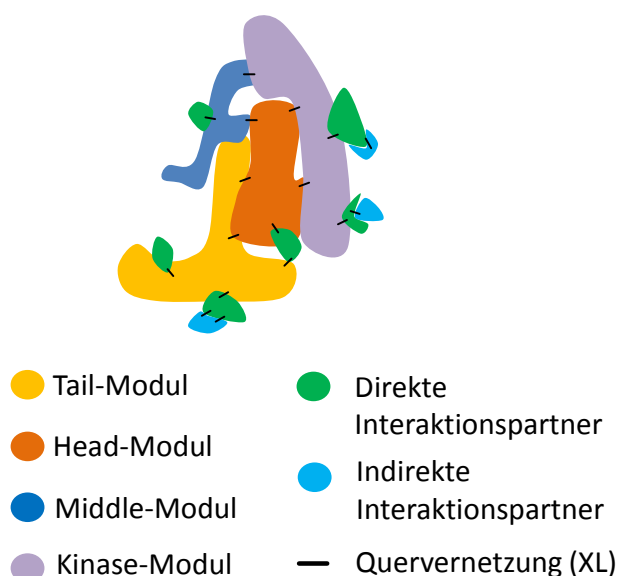


Abbildung 30: **Topology Mapping des Mediatorkomplexes mit Hilfe von chemischen Quervernetzungen.**

Durch die Kombination von Co-IP und Crosslinking können Proteininteraktionen von Proteinkomplexen mit Interaktionspartnern den einzelnen Untereinheiten zugeordnet werden. Hierbei kann zwischen direkten und indirekten Interaktionen unterschieden werden (Modifiziert nach (Tsai et al., 2014)).

5.1.1 Quervernetzung von Proteinen mit BS3

Für die Etablierung des Quervernetzens von Proteinen wurde der kommerziell verfügbare Crosslinker Bis(sulfosuccinimidyl)suberat (BS3) verwendet, der in vielen Forschungslaboren zum Einsatz kommt (Rappsilber, 2011). Er ist einer der gängigsten Crosslinker. BS3 ist eine wasserlösliche, homobifunktionale Substanz, die mit den aminreaktiven NHS-Estern bei einem pH-Wert von 7-9 mit den primären Aminen von Lysinseitenketten reagiert (Abbildung 31). Im Vergleich zu Formaldehyd oder Glutaraldehyd, die mit mehreren funktionellen Gruppen von Proteinen reagieren können, erhält man hauptsächlich quervernetzte Lysine mit einer definierten Linkermasse von 138.068 Da zwischen den vernetzten Peptiden. Diese definierte Modifikation kann in Programmen zur Auswertung von Crosslink-Daten wie StavroX ausgewählt werden.

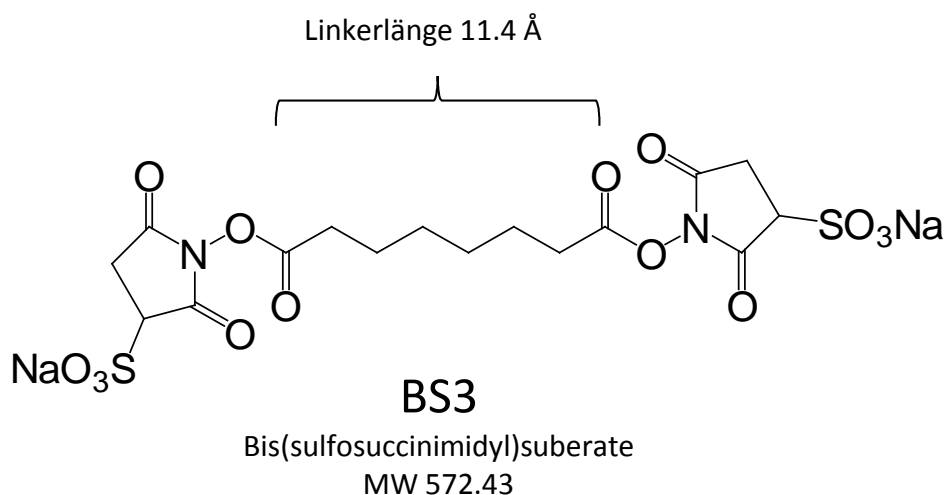


Abbildung 31: **Strukturformel von Bis(sulfosuccinimidyl)suberat (BS3).**

BS3 reagiert hauptsächlich mit den primären Aminen der Seitenketten von Lysin. Aufgrund der wasserlöslichen Sulphatgruppen ist keine Verwendung von DMSO nötig.

Die Reaktion mit Lysinen ist vorteilhaft, da Lysin eine häufig vorkommende Aminosäure ist. Somit gibt es innerhalb von Proteinen viele Stellen für potentielle Quervernetzungen. Die Einschränkung der Reaktivität im Bezug auf die Spezifität bringt zudem den Vorteil, dass die Probenkomplexität relativ niedrig bleibt.

In Kombination mit einem tryptischen Verdau kann das jedoch bei manchen Quervernetzungen zu Problemen führen, da an quervernetzten Lysinen nicht gespalten werden kann und die Peptide somit sehr lang werden können. Trypsin spaltet die Proteine

C-terminal nach Lysin und Arginin, es bleibt also die Möglichkeit, mindestens an jedem Arginin zu spalten, falls alle Lysine modifiziert wurden. Die Hydrophobizität der Peptide nimmt mit der Länge zu, was dazu führen kann, dass Peptide zu spät von der Säule eluieren und somit nicht mehr detektiert werden. Außerdem verteilt sich bei langen Peptiden die Intensität der MS^2 -Ionen auf sehr viele einzelne Ionen, was dazu führt, dass manche Fragmentationen im Rauschen verschwinden und nicht mehr über die Datenbanksuche identifiziert werden können. Weiterhin geht durch das Quervernetzen die positive Ladung auf der Lysinseitenkette verloren. Insgesamt betrachtet müssen quervernetzte Peptide jedoch eine Ladung von +4 haben, da sie zwei N-Termini und zwei basische Reste an den C-Termini durch die Aminosäureseitenketten aufweisen.

Ein weiterer kritischer Punkt ist, dass NHS-Ester bei einem pH von 7.5 auch zum Teil mit den Seitenketten von Serin und Tyrosin reagieren (Swaim et al., 2004). Dazu kommt, dass NHS-Ester im wässrigen Milieu hydrolysieren, wodurch Crosslinker verloren geht und die Probenkomplexität weiter gesteigert wird. Reagiert ein BS3 mit einem Ester mit einem primären Amin einer Lysinseitenkette und mit dem anderen Ester mit Wasser, so erhält man eine sogenannte Dead-End Modifizierung, die keinerlei Interaktionsinformation beinhaltet (Tabelle 1).

Um die verbleibenden Linkermoleküle am Ende der Quervernetzungsreaktion zu quenchen, können nukleophile Substanzen wie NH_4HCO_3 oder TRIS verwendet werden. Dies führt jedoch zur Amidierung am Linker, was zur steigenden Probenkomplexität beiträgt (Kalkhof and Sinz, 2008). Die quervernetzten Peptide, die für die Identifizierung von Protein-Protein Interaktionen interessant sind, stellen somit eine niedrig abundante Spezies innerhalb einer sehr komplexen Probe dar. Deswegen ist sinnvoll, diese Peptide mit entsprechenden Methoden anzureichern, um mit der anschließenden massenspektrometrischen Detektion an die Sequenzinformation zu gelangen. Gängige Methoden hierfür sind die Size Exclusion Chromatography und die Ion Exchange Chromatography. Da es sich bei diesen beiden chromatographischen Methoden um eine Art Fraktionierung handelt, muss jedoch überprüft werden, ob die Messung der Fraktion mit den quervernetzten Peptiden ein Vorteil im Vergleich zur direkten Messung der gesamten Probe bringt. Die Anreicherung muss somit einen deutlichen Vorteil mit sich bringen, der dem Probenverlust durch die Chromatographie überwiegt.

5.1.1.1 Quervernetzung von überexprimiertem UFD1 und NPL4 mit BS3

Um das Quervernetzen von Proteinen mit der Substanz BS3 im Labor zu etablieren, wurde getestet, ob zwei Proteine, die bekannte Interaktionspartner sind, miteinander verlinkt werden können. Die beiden Proteine UFD1 und NPL4 wurden von Petra Hänzelmann (AG Schindelin, RVZ) in *E. Coli* überexprimiert und in großen Mengen zur Verfügung gestellt. Die Verwendung von großen Proteinmengen als Startmaterial beim Crosslinken ist notwendig, da nicht alle Proteine quervernetzt werden (Robinson et al., 2015). Je größer die eingesetzte Menge an Protein, desto mehr quervernetzte Peptide können letztendlich detektiert werden. Bei den Proteinen UFD1 und NPL4 handelt es sich um Interaktionspartner, die zusammen ein Heterodimer mit einer Stöchiometrie von 1:1 bilden (Meyer et al., 2000). Dieses Dimer ist ein wichtiger Proteinadapter, der mit der ATPase p97 interagiert und somit viele unterschiedliche Prozesse wie die Regulation des Zellzyklus, die Signalübertragung und die Apoptose steuert (Abbildung 32, (Dreveny et al., 2004)). Die N-terminale Domäne von UFD1 weist gewisse Ähnlichkeiten mit der von p97 auf und hat zwei Bindungsstellen für Poly- und Monoubiquitin. Die C-terminale Domäne ist sehr flexibel (Park et al., 2005). Über die Struktur von NPL4 ist weniger bekannt, jedoch konnte bereits die N-terminale ubiquitin-like und die C-terminale (zink finger) Domäne mit NMR gelöst werden (Isaacson et al., 2007).

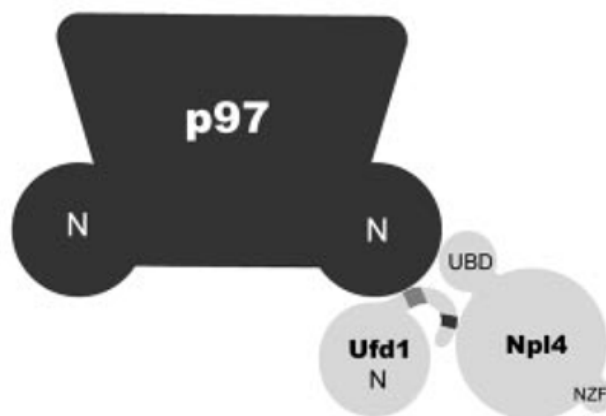


Abbildung 32: Schematische Darstellung der Interaktionen von NPL4 und UFD1.

UFD1 und NPL4 formen ein Heterodimer, das mit p97 interagiert. UFD1 interagiert über die C-terminale Domäne mit NPL4 (Quelle: (Bruderer et al., 2004)).

Das Nuclear protein localization protein 4 homolog (NPL4) ist 68.1 kDa und der Ubiquitin recognition factor in ER-associated degradation protein 1 (UFD1) ist 36.6 kDa schwer (Abbildung 33). Für die Quervernetzung wurde ein 1:1 Gemisch der Proteine mit der Konzentration 3.92 mg/mL und 9 mM BS3 verwendet. Die Reaktion wurde für 30 min bei RT in HEPES-Puffer durchgeführt. Die Überprüfung auf eine erfolgreiche Quervernetzung wurde zunächst visuell mittels SDS-PAGE und der Färbung der Proteine mit Coomassie durchgeführt (siehe Kapitel 4.5.1.1).

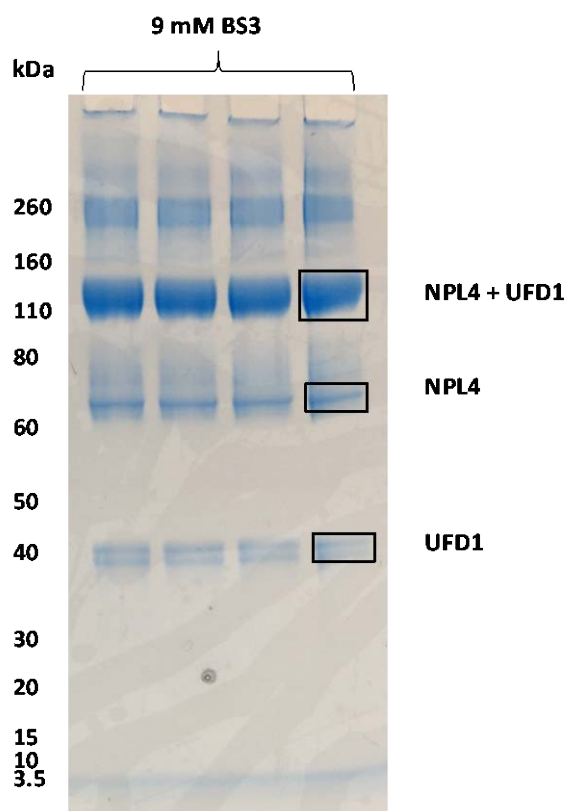


Abbildung 33: Coomassie Gel der quervernetzten Proteine UFD1 und NPL4.

Die beiden Proteine UFD1 und NPL4 wurden mit 9 mM BS3 für 30 min bei RT quervernetzt. Anschließend wurden die Proteine reduziert, alkyliert und mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Für die MS-Messung wurde die Bande ausgeschnitten, in der beide Proteine miteinander quervernetzt wurden.

Neben den beiden Proteinbanden von NPL4 und UFD1, die nur noch recht schwach angefärbt wurden, ist eine deutliche Bande auf der Höhe von 110 kDa zu sehen (Abbildung 33). Diese Bande passt zur Masse des Dimers mit 107 kDa und zeigt die gute Quervernetzungseffizienz durch BS3. Im Bereich von 200-300 kDa ist ein weiterer Bereich schwach mit Coomassie angefärbt. Hierbei könnte es sich um 2 miteinander verlinkte Heterodimere von UFD1 und NPL4 handeln. Insgesamt betrachtet weist das Gel

leichter gefärbte Bereiche auf der Höhe von 70 kDa bis zur Geltasche auf. Durch die Modifikation der Proteine mit BS3, das am anderen Ende hydrolysiert, können viele verschiedene Proteinspezies von NPL4 mit verschiedenen Massen entstehen. Diese verteilen sich bei der SDS-PAGE über einen größeren Gelbereich. Im Falle von NPL4 gibt es 36 Lysine und den N-terminus, die theoretisch mit BS3 reagieren können. Hydrolysiert das andere Ende des Linkers, kommt es zu einer Vielzahl von Dead-End Modifikationen, mit jeweils einer Masse von 156.07 Da. Insgesamt könnte das Protein NPL4 somit 5.77 kDa schwerer sein als die komplett unmodifizierte Version, wenn alle möglichen Modifizierungsstellen eine Dead-End-Modifikation (Tabelle 1) aufweisen.

Die Proteinbande mit den quervernetzten Proteinen, auf der Höhe von ca. 110 kDa, wurde ausgeschnitten, tryptisch verdaut und mittels LC-MS/MS analysiert. Durch das Quervernetzen von Proteinen und dem anschließenden Verdau mit Trypsin entstehen quervernetzte Peptide, die jedoch nur einen Bruchteil an der Gesamtmenge, der zu messenden Peptide darstellen.

Die Rohdaten wurden mit dem Programm StavroX (Götze et al., 2012) ausgewertet und auf quervernetzte Peptide hin untersucht. Durch die Quervernetzung von UFD1 und NPL4 mit BS3 konnten insgesamt 28 verschiedene vernetzte Peptide mittels LC-MS/MS identifiziert werden, die als Distanzeinschränkungen für die strukturelle Aufklärung verwendet werden können (Tabelle 8). Hierbei handelt es sich um 20 intermolekulare (Typ2) Quervernetzungen und 8 intramolekulare (Typ1) Quervernetzungen innerhalb des jeweiligen Proteins. Die interessanten Quervernetzungen des Typs2 zwischen UFD1 und NPL4 sind in Tabelle 8 hervorgehoben.

Die Lysine, die in den jeweiligen Peptiden verlinkt wurden, wurden in Tabelle 8 rot markiert. Der Buchstabe B steht für ein alkyliertes Cystein und das kleine m steht für ein oxidiertes Methionin. Dead-End Quervernetzungen wurden nicht in die Auswertung hineingenommen, da sie keine Informationen für die Interaktion von Proteinen beinhalten. Bei allen detektierten Quervernetzungen, die einen Score von 100 oder mehr haben, liegt die Falsch-positiv-Rate bei 2 % oder weniger (Götze et al., 2012). Die Authentizität jeder Quervernetzung kann anhand des MS²-Spektrums mit den Fragmentionen manuell überprüft werden (siehe Anhang).

Das Programm bietet außer einer Liste mit den quervernetzten Peptiden auch eine spezielle Ansicht der MS²-Spektren (Abbildung 34). In diesem Programmfenster können die Fragmentationenspektren genauer überprüft werden.

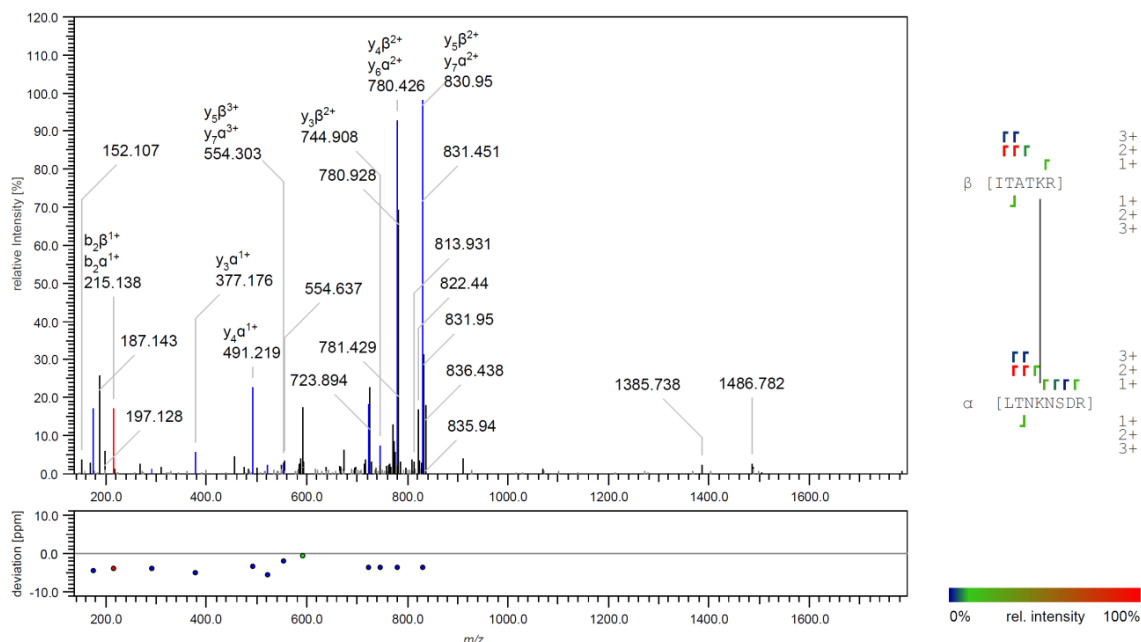


Abbildung 34: Ansicht des MS²-Spektrums der Peptide ITATKR und LTNKNSDR, die in Tabelle 8 mit der Nr. 4 aufgelistet sind.

Zu sehen ist eine intramolekulare Quervernetzung (Typ2) von NPL4 und UFD1. Neben dem Fragmentationenspektrum sind die Peptidsequenzen mit den jeweiligen b- und y-Ionen markiert. Die Farbe der Markierung steht für die relative Intensität der einzelnen Ionen. Unter dem Spektrum ist die Massengenauigkeit der Fragmente in ppm angegeben.

Die Anzahl der gefundenen Fragmente von beiden quervernetzten Peptiden, die rechts in Abbildung 34 zu sehen ist, gibt Aufschluss über den Stellenwert des gefundenen MS²-Spektrums. Je besser die theoretische Precursormasse mit Fragmentationenspektren belegt werden kann, desto wahrscheinlicher ist es, dass die gefundene Quervernetzung echt ist. Zudem ist unter dem Spektrum die Massengenauigkeit jedes Fragments angegeben. Bei dem aufgeführten Beispiel aus Abbildung 34 handelt es sich um die beiden Peptide ITATKR und LTNKNSDR, die in Tabelle 8 mit der Nr. 4 gekennzeichnet wurden. Die Fragmentionen der Peptide weisen eine gute Sequenzabdeckung auf.

Tabelle 8: Liste der Peptide von NPL4 und UFD1, die mit BS3 verlinkt wurden.

Die Rohdaten der LC-MS/MS Messung von der quervernetzten Bande aus Abbildung 33 wurden mit der Software StavroX analysiert. Intermolekulare Quervernetzungen wurden als Typ 2 und Intramolekulare Quervernetzungen wurden als Typ 1 deklariert. Die quervernetzten Lysine sind in rot markiert. Der Buchstabe B steht für ein alkyliertes Cystein und das kleine m steht für ein oxidiertes Methionin.

Nr.	Score	m/z	z	Pr.1	Peptid 1	Pr.2	Peptid 2	Typ
1	206	959.4	+4	UFD1	VMET K PD K AVSIIIE BDMNVDFDAPLG YKEPER	-	-	1
2	203	1190.1	+2	UFD1	SDVE K GG K IIMPPS ALDQLSR	-	-	1
3	196	1137.6	+2	NPL4	KLTGGAD K G K FV ALENISBK	-	-	1
4	179	591.9	+3	NPL4	ITATKR	UFD1	LTNKNSD	2
5	175	1111.5	+3	NPL4	I KSGBEGHLPWPN GIBT K BQPSAITLN R	-	-	1
6	170	413.7	+2	UFD1	LDG K K K	-	-	1
7	169	1271.9	+3	UFD1	BFSVSMLAGPNDR SDVE K GG K IIMPPS ALDQLSR	-	-	1
8	163	680.6	+3	UFD1	NSRPLV K	UFD1	K VEEDEAG GR	2
9	160	547.0	+3	NPL4	K GT V R	UFD1	NSRPLVK	2
10	155	560.3	+4	NPL4	K GT V R	NPL4	K TGNQHFG YLYGR	2
11	151	726.6	+4	UFD1	K VEEDEAGGR	UFD1	GVEPSPSPIK PGDI K R	2
12	150	447.4	+4	NPL4	K GT V R	UFD1	K VEEDEA G GR	2
13	150	746.7	+3	NPL4	K GT V R	NPL4	K TGNQHFG YLYGR	2
14	148	604.6	+3	NPL4	ITAT K R	NPL4	VQSPDG V K R	2

Ergebnisse und Diskussion

15	141	604.6	+3	NPL4	RITAT K	NPL4	VQSPDGV K R	2
16	141	534.9	+3	UFD1	AFSGSGNRLDG KK KK	-	-	1
17	140	887.1	+4	UFD1	NSRPLVKK	NPL4	NKDTYFLS SEEBITAG DFQNK	2
18	138	765.1	+4	UFD1	NSRPLVKK	NPL4	DEBLLPBK DAPELGY	2
19	136	725.3	+3	UFD1	LTN K NSDR	UFD1	K VEEDEAG GR	2
20	135	604.6	+3	NPL4	VQSPDGV K	NPL4	RITAT K R	2
21	135	736.3	+6	NPL4	QDG K IYR	NPL4	HGPLG K BV HBVPLEPFD EDYLNHLEP PVK	2
22	132	1161.6	+2	UFD1	LNITYPmLF K LTN K NSDR	-	-	1
23	130	764.7	+3	NPL4	K LTGGADK	NPL4	G KFVALENI SBK	2
24	128	596.3	+3	NPL4	K GTVR	UFD1	K VEEDEA G GR	2
25	128	916.5	+2	NPL4	SLNLL K	NPL4	TGEITASSN K	2
26	122	1069.1	+3	NPL4	DEBLLP BK	NPL4	EFGFQNNGF SVYINR NK	2
27	122	692.0	+3	NPL4	SLNLL K	NPL4	NKTGEITAS S N K	2
28	118	802.1	+4	NPL4	DEBLLP BK	NPL4	EFGFQNNGF SVYINR NK	2

Zur besseren Visualisierung der Quervernetzungen von UFD1 und NPL4 wurden die Daten aus Tabelle 8 ins CSV-Format umgewandelt und mit dem Cross-link Viewer xiNET (Combe et al., 2015) dargestellt (Abbildung 35). Intramolekulare Quervernetzungen (Typ1) sind in lila, intermolekulare (Typ2) Quervernetzungen in türkis dargestellt. Bei den 8 intramolekularen Quervernetzungen innerhalb eines Peptides (Tabelle 8 Nr. 1-3, 6-7, 16, 22) sind, mit einer Ausnahme, Lysine miteinander quervernetzt, die maximal 3 Aminosäuren zwischen der Quervernetzung aufweisen. Da die reaktiven Lysinreste nah beieinanderliegen ist es sehr wahrscheinlich, dass diese miteinander vernetzt werden können. Ausnahmen stellen vor allem die Quervernetzungen mit der Nr. 26, 19 und 10 dar (Tabelle 8), die einen Abstand von 350, 206 und 77 Aminosäuren haben. Aufgrund der Sekundärstruktur von Proteinen ist es generell möglich, dass sich Seitenketten von Aminosäuren relativ nahe kommen, obwohl sie von der Sequenz her nicht in Reichweite für eine Quervernetzung liegen. Der Vergleich dieser Quervernetzungsdaten mit Daten aus der Literatur ist nur begrenzt möglich, da die Strukturen der Gesamtlängenproteine nicht vorliegen.

Betrachtet man die intermolekularen Quervernetzungen zwischen UFD1 und NPL4, so stellt man fest, dass es insgesamt fünf verschiedene Quervernetzungen gibt (Tabelle 8 Nr. 4, 9, 12, 17 und 18 (Nr. 24 ist der gleiche Crosslink wie Nr. 12)), die sich auf 2 Bereiche aufteilen lassen (Abbildung 35). Außerdem ist die Quervernetzung Nr 9 sehr ähnlich wie Nr.12 und Nr. 24, da sich die beiden Lysine auf UFD1 direkt nebeneinander befinden. Die intermolekularen Quervernetzungen des Typs 2 aus Tabelle 8 wurden in Abbildung 35 mit türkisen Linien markiert. Die C-terminale Domäne von UFD1 konnte mit 5 Quervernetzungen mit dem mittleren Teil von NPL4 vernetzt werden. Alle Vernetzungen gehen von einem Lysin auf UFD1 aus (Tabelle 8 Nr.9, 12, 17, 18 und 24). Die entsprechenden Vernetzungspunkte hierzu an NPL4 sind von der Sequenz her in der Mitte des Proteins einzuordnen. Dieses Ergebnis passt nicht ganz zum bisher publizierten Strukturmodell, in Bezug auf die C-terminale Stelle von UFD1. Durch trunkierte Proteinabschnitte von UFD1 konnte gezeigt werden, dass die Aminosäuren 258 bis 275 an NPL4 binden (Abbildung 32, (Bruderer et al., 2004)). Das Peptid 281 bis 307 konnte nicht an NPL4 binden. Die detektierte Quervernetzung am C-Terminus von UFD1 (Aminosäure 298) fällt somit in diesen Bereich. Es ist jedoch fraglich, ob das Peptid 281 bis 307 die gleiche Sekundärstruktur aufweist wie das gesamte Protein UFD1. Weiterhin

könnte es sein, dass durch die Bindung der Aminosäuren 258 bis 275 an NPL4, das Lysin 298 in die Nähe von NPL4 gelangt und somit mit NPL4 quervernetzt werden kann.

Die Aminosäuren 258 bis 275 von UFD1, mit der Sequenz IPNYEFKLGKITFIRNSR, beinhalten zwei Lysine, die für die Quervernetzung mit BS3 in Frage kommen. Jedoch muss auch bei der Interaktionsstelle auf NPL4 ein Lysin in Reichweite für eine Quervernetzung sein. Da der genaue Interaktionsbereich des Peptids IPNYEFKLGKITFIRNSR mit NPL4 nicht bekannt ist, lässt sich keine Aussage treffen, ob eine Quervernetzung möglich ist.

Bei NPL4 ist im Bereich der Sequenz von Position 404 bis Position 608 kein Lysin verlinkt worden. In diesem Abschnitt sind fünf Lysine für eine potentielle Quervernetzung vorhanden. Da in diesem Bereich auch keine intramolekularen Quervernetzungen detektiert wurden, könnte es sich um eine Proteindomäne handeln, bei der die Lysine für den Crosslinker BS3, nicht zugänglich sind.

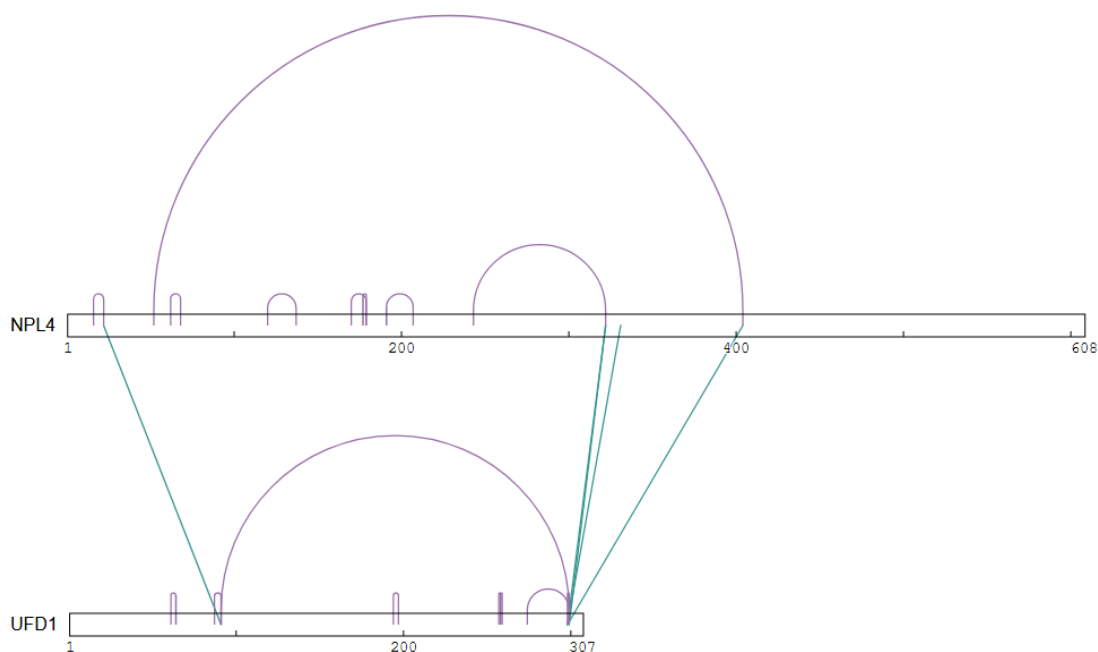


Abbildung 35: **Schematische Darstellung aller Quervernetzungen der beiden Proteine UFD1 und NPL4.**

Die Rohdaten wurden zunächst mit der Software StavroX ausgewertet und anschließend mit dem Cross-link Viewer xiNET dargestellt (Rappsilber Labor). Intramolekulare Quervernetzungen sind in lila, intermolekulare Quervernetzungen in türkis dargestellt.

Eine weitere intermolekulare Quervernetzung zwischen den Peptiden ITATKR und LTNKNSDR befindet sich bei beiden Proteinen an der N-terminalen Domäne. Das MS²-Spektrum, das mit der Software StavroX analysiert wurde, weist eine gute Sequenzabdeckung auf (Abbildung 34). Diese Interaktionsstelle wurde bisher noch nicht in der Literatur beschrieben. Die Bestätigung dieser Ergebnisse durch Replikate und weitere Experimente mit anderen Methoden wie der Röntgenkristallographie oder NMR wären zur weiteren Validierung nötig.

5.1.1.2 Quervernetzung des Mediatorkomplexes mit BS3

Nach der erfolgreichen Etablierung des Quervernetzens von überexprimierten Proteinen (Kapitel 5.1.1.1) mit der Substanz BS3, wurde im nächsten Schritt eine Methode entwickelt, in der die Anreicherung des Mediatorkomplexes aus Hefe mittels Co-IP und das anschließende Quervernetzen miteinander kombiniert wurden. Da der Mediatorkomplex aus 25 Untereinheiten besteht und zusätzlich mit vielen weiteren transkriptionsassoziierten Proteinen interagiert, stellt er ein gutes Versuchsobjekt dar, um das Quervernetzen von Proteinen zu untersuchen. Die Interaktion von überexprimierten Untereinheiten des Mediatorkernkomplexes wurde bereits durch chemisches Quervernetzen mit anschließender LC-MS/MS Analyse untersucht. Hierbei konnte eine entscheidende strukturelle Rolle der Untereinheit Med14 gezeigt werden (Cevher et al., 2014).

Die Aktivität der RNA-Polymerase II (Pol II) wird durch generelle Transkriptionsfaktoren (GTFs), Aktivatoren und Koaktivatoren reguliert (Roeder, 2005). Durch die Interaktion der Pol II mit den GTFs wird der Präinitiationskomplex gebildet, der an Promotorelemente auf der DNA bindet. Die zunächst niedrige Promotoraktivität kann durch Aktivatoren und Koaktivatoren deutlich verstärkt werden. Hierbei spielt der Mediatorkomplex als Koaktivator eine dominierende Rolle, um die Transkription von Genen zu regulieren. Der Mediatorkomplex besteht in Hefezellen aus 25 Untereinheiten, die zusammen 4 verschiedene Module bilden: Kopf-, Mittel-, Schwanz- und Kinase-Modul (Abbildung 36, (Malik and Roeder, 2010)). Das Kopf-, Mittel- und Schwanzmodul sind fester miteinander assoziiert, während das Kinase-Modul optional an den Mediator andockt und zur Repression der Transkription beiträgt (Poss et al., 2013).

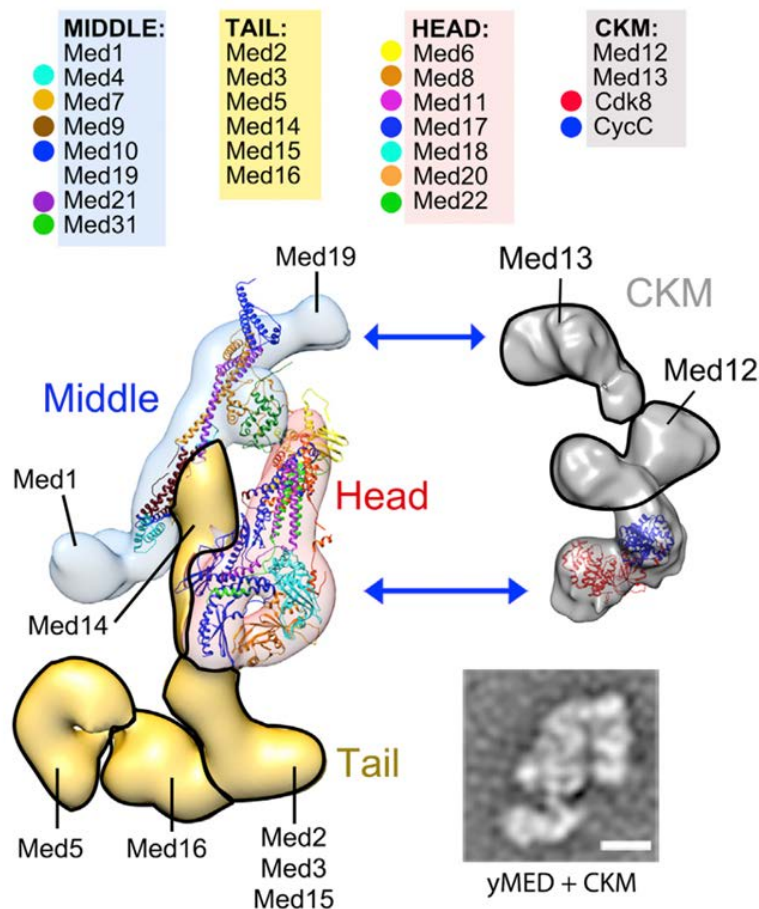


Abbildung 36: **Struktur des Mediator Komplexes in Hefe mit den 4 Modulen und den einzelnen Untereinheiten.**
 Als Grundgerüst dient die cryoEM Struktur, in die die bisher bekannten Röntgenkristallstrukturen eingearbeitet wurden (Quelle: (Tsai et al., 2014)).

Das Ziel dieser Versuche war es, in einer komplexen Probe, wie es bei einer Co-IP der Fall ist, ausreichend quervernetzte Peptide zu detektieren, um ein Interaktionsnetzwerk der interagierenden Proteine zum Mediator Komplex herzustellen (Topology Mapping; siehe Kapitel 3.2.3). Hierzu wurde die Untereinheit Med17 aus dem Kopf-Modul von Henriette Uthe (AG Schlosser) mit einem HA-Affinitätstag markiert, der mittels anti-HA Beads angereichert werden kann. Die Anreicherung der Proteine aus einem Hefezelllysate wurde per Co-immunpräzipitation durchgeführt, was dazu führt, dass selbst nach der Aufreinigung und den Waschschritten sehr viele Proteine unspezifisch an den Anti-HA Beads hängen. Dies führt zu einer hohen Probenkomplexität (Uthe et al., 2017).

Als Startmaterial für die Anreicherung wurde mit 120 mg Gesamtprotein und 100 μ L an magnetischen Beads gearbeitet, um möglichst viel Mediatorkomplex und dessen Interaktionspartner anzureichern. Weiterhin wurde der Schritt des Quervernetzens erst nach der Anreicherung der Proteine auf den Beads durchgeführt, um eine möglichst große Ausbeute an quervernetzten Proteinen zu erzeugen. Die Menge an Mediatorkomplexuntereinheiten ist geringer, im Vergleich zu Versuchen bei denen überexprimierte Proteine verwendet werden, jedoch besteht die Chance, Interaktionspartner zu identifizieren, was bei überexprimierten Proteinen nicht der Fall ist.

Neben der Kontroll-IP (ohne BS3) mit Med17HA (Abbildung 37A, Gelspur 2), wurden in weiteren IPs die Proteine mit 3 verschiedenen Konzentrationen an BS3 auf den Beads quervernetzt (Gelspur 3-5). Die Proteine wurden nach der IP und dem Cross-Linking von den Beads eluiert, reduziert, alkyliert und nach einer Acetonfällung per SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie angefärbt (Abbildung 37). Für die anschließende Identifizierung der quervernetzten Peptide, wurde die Proteinspur 4 ausgewählt, in der die Proteine mit 0.05 % BS3 vernetzt wurden. Die Färbung der Proteine mit Coomassie im oberen Gelbereich war hier, im Vergleich zum Quervernetzen mit 0.01 und 0.1 % BS3 am stärksten, was für die beste Ausbeute an quervernetzten Proteinen steht.

Dieser Bereich ist in der Kontrollspur (Spur 2) nicht angefärbt und sollte somit durch die Quervernetzung von Proteinen entstanden sein. Generell sind bei den Proben, die mit BS3 verlinkt worden sind, auch quervernetzte Proteine über die ganze Gelspur verteilt, jedoch werden diese durch nicht-vernetzte Proteine überlagert, was die Detektion der niedrigabundanten quervernetzten Peptide erschwert. Deswegen wurde nur der obere Gelbereich ab einer Proteingröße von 200 kDa bis zur Geltasche in 5 Banden geschnitten, mit Trypsin verdaut (Kapitel 4.5.2.9) und mittels LC-MS/MS gemessen.

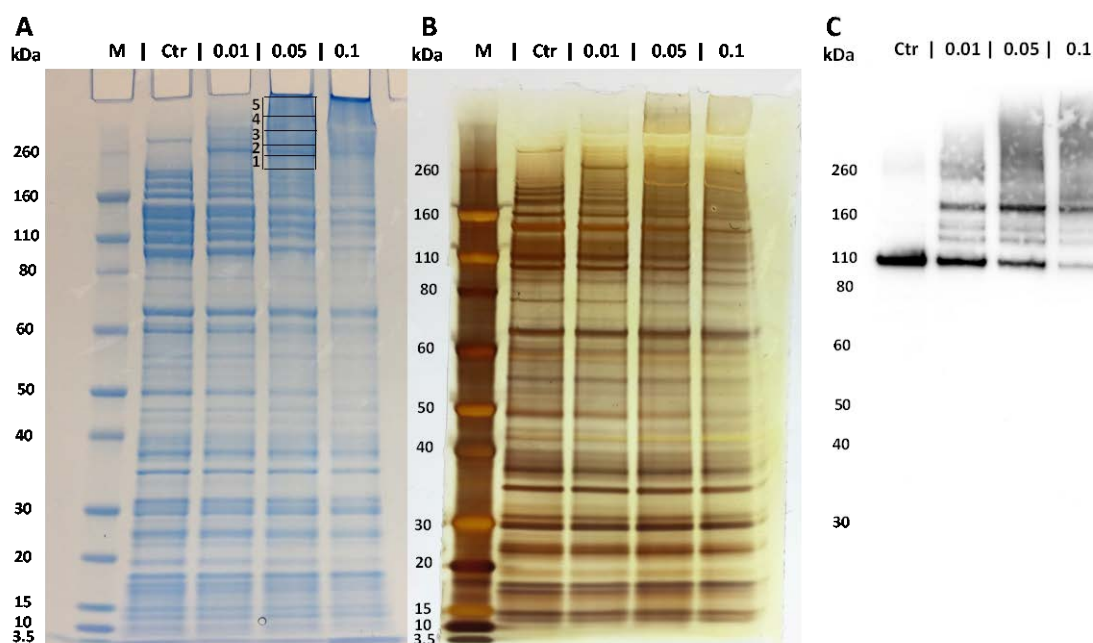


Abbildung 37: **Proteine, die mittels anti-HA Co-Immunpräzipitation aus einem Med17HA-Hefelysat angereichert wurden.**

Verwendet wurden magnetische anti-HA Beads (Pierce) und ein Med17HA markierter Hefestamm. Zusätzlich zur Kontrolle (Gelspur 2) wurden die Proteine nach dem Anreichern, auf den Beads, mit den Konzentrationen 0,01, 0,05 und 0,1 % an BS3 quervernetzt (Gelspuren 3, 4 und 5). Die Proteine wurden nach der SDS-PAGE zum einen mit Coomassie (A) oder Silber (B) bzw. mittels anti-HA Western Blot (C) sichtbar gemacht. Für die MS-Messungen wurde die Gelspur 4 ab einer Höhe 200 kDa bis zur Geltasche in 5 Banden eingeteilt und jede Bande per LC-MS/MS analysiert.

Die Verwendung einer spezifischen Protease wie Trypsin erhöht die Intensität der erzeugten Peptide im Vergleich zu einer unspezifischen Protease, bei der man zwar mehr verschiedene Peptide erhält, aber die einzelnen Intensitäten geringer ausfallen. Außerdem haben die generierten quervernetzten Peptide, theoretisch, mindestens eine 4-fach positive Ladung was die Ionisierung und Fragmentierung mit ETD begünstigt (Syka et al., 2004). Deshalb, wurde eine spezielle Messmethode angewandt, die nur 4-fach geladene Vorläuferionen für die Fragmentierung auswählt. Somit wird die Wahrscheinlichkeit erhöht, dass die niedrigabundanten quervernetzten Peptide selektiert werden. Die Rohdaten wurden mit dem Programm StavroX ausgewertet und auf quervernetzte Peptide hin untersucht (Tabelle 9). In der Suche wurden zunächst nur die 25 Untereinheiten des Mediator Komplexes berücksichtigt, da die Suche nach zusätzlichen 80 Proteinen, die ebenfalls als Interaktionspartner in Frage kommen, für die Software zu aufwendig war und zum Absturz führte.

Tabelle 9: **Liste der Peptide des Mediatorkomplexes, die mit BS3 verlinkt wurden.**

Die Rohdaten der LC-MS/MS Messung von der quervernetzten Bande 5 aus Abbildung 37 wurden mit der Software StavroX analysiert. Intermolekulare Quervernetzungen wurden als Typ 2 und Intramolekulare Quervernetzungen wurden als Typ 1 deklariert. Die quervernetzten Lysine sind in rot markiert. Der Buchstabe B steht für ein alkyliertes Cystein und das kleine m steht für ein oxidiertes Methionin.

Nr.	Scor	m/z	z	Pr.1	Peptid 1	Pr.2	Peptid 2	Typ
1	142	596.5	+4	MED5	K QLGYGK	MED16	F KDLQWLEFAR	2
2	118	674.6	+4	MED15	TING K	MED5	TLEY K LATYGV PGSENKR	2
3	113	900.8	+5	MED7	EIEQVB K	MED17	KIHKDYVLDIVP GSSITETEVERE QPQEN K	2
4	109	468.5	+4	MED15	KIQALR	MED15	YIN K ALR	2
5	109	596.5	+4	MED15	K YINQK	MED16	F KDLQWLEFAR	2
6	108	1298.0	+4	MED12	I K IR	MED14	VPIGLILQRL K D LNLTVSIKIALm NIPKPLNSYHIK NGR	2
7	106	674.6	+4	MED15	TING K	MED5	TLEY K LATYGV PGSENKR	2

Insgesamt wurden 7 Quervernetzungen (Nr. 2 und Nr.7 sind identisch) innerhalb des Mediatorkomplexes gefunden (Tabelle 9). Davon waren 6 zwischen verschiedenen Untereinheiten und eine innerhalb von Untereinheit Med15. Die meisten Vernetzungen wurden zwischen den Untereinheiten Med15, Med16 und Med5 detektiert, die innerhalb des Komplexes Bestandteile des Tail-Moduls sind. Hierzu gehören die Vernetzungen, die mit Nr.1, 2, 4, 5 und 7 in Tabelle 9 aufgelistet sind. Die intramolekulare Quervernetzung in Med15 wurde vom Lysin an Position 344 zum Lysin an Position 348 identifiziert (Tabelle 9 Nr.4).

Die Visualisierung der Quervernetzungen der verschiedenen Mediatoruntereinheiten wurde mit der Software xiNET durchgeführt (Abbildung 38). Auffällig ist hierbei, dass nur eine intramolekulare Quervernetzung detektiert wurde. Befindet sich die Quervernetzung innerhalb eines Peptides kann es die notwendige Ladung von +4 nicht erreichen, die bei der Messung notwendig war, um für die MS²-Selektion ausgewählt zu

werden. Diese Erklärung gilt aber nicht für intramolekulare Quervernetzungen, innerhalb eines Proteins, die nach dem Verdau zu zwei Peptiden führt. Hierbei entstehen zwei vernetzte Peptide, die eine Ladung von +4 aufweisen. Da die Wahrscheinlichkeit hoch ist, dass sich Lysine innerhalb eines Proteins in Reichweite für eine Quervernetzung befinden, hätte man mehr dieser Quervernetzungen erwartet, wie das in Kapitel 5.1.1.1 der Fall war.

Die intermolekulare Vernetzung von Med5 und Med 16, zwischen den Peptiden **KQLGYGK** und **FKDLQWLEFAR** (Tabelle 9 Nr.1) ist identisch mit den bereits publizierten Daten in Robinson et al. 2015 (Abbildung 38). Die beiden Proteine befinden sich nach dem Modell aus Abbildung 36 direkt nebeneinander. Ein weiterer intermolekularer Crosslink von Med 15 zu Med 16 wurde mit den quervernetzten Lysinen an Position 339 (Med15) und Position 276 (Med16) detektiert (Tabelle 9 Nr.5). Er liegt somit bei beiden Proteinen im ersten Drittel, ausgehend vom N-Terminus (Abbildung 38A). Dieses Ergebnis weicht von den publizierten Daten von Robinson et al. 2015 ab (Abbildung 38B). Hier wurden zwar auch Quervernetzungen von Med15 und Med16 detektiert, jedoch liegen diese bei beiden Proteinen im letzten Drittel. Die letzte Quervernetzung innerhalb des Tail-Moduls wurde zwischen den Untereinheiten Med15 und Med5 detektiert. Hier wurden die Lysine an Position 760 und 943 verlinkt, sie liegen somit im letzten Drittel beider Proteine, ausgehend vom N-Terminus. Außerdem wurde diese Quervernetzung 2-mal gemessen (Tabelle 9, Nr.2 und Nr.7). Im Vergleich mit den Daten von Robinson et al. 2015 kann die Quervernetzung zwischen Med 15 und Med5 zwar bestätigt werden, jedoch wurde auch hier ein anderer Crosslink gemessen. Das quervernetzte Lysin auf Med15 befindet sich 20 Aminosäuren weiter Richtung C-Terminus auf dem Peptid **KLSISNAASQQTPR**. Das zugehörige Lysin auf Med5 weicht jedoch stark ab, da es sich in der Nähe des N-Terminus befindet (Abbildung 38).

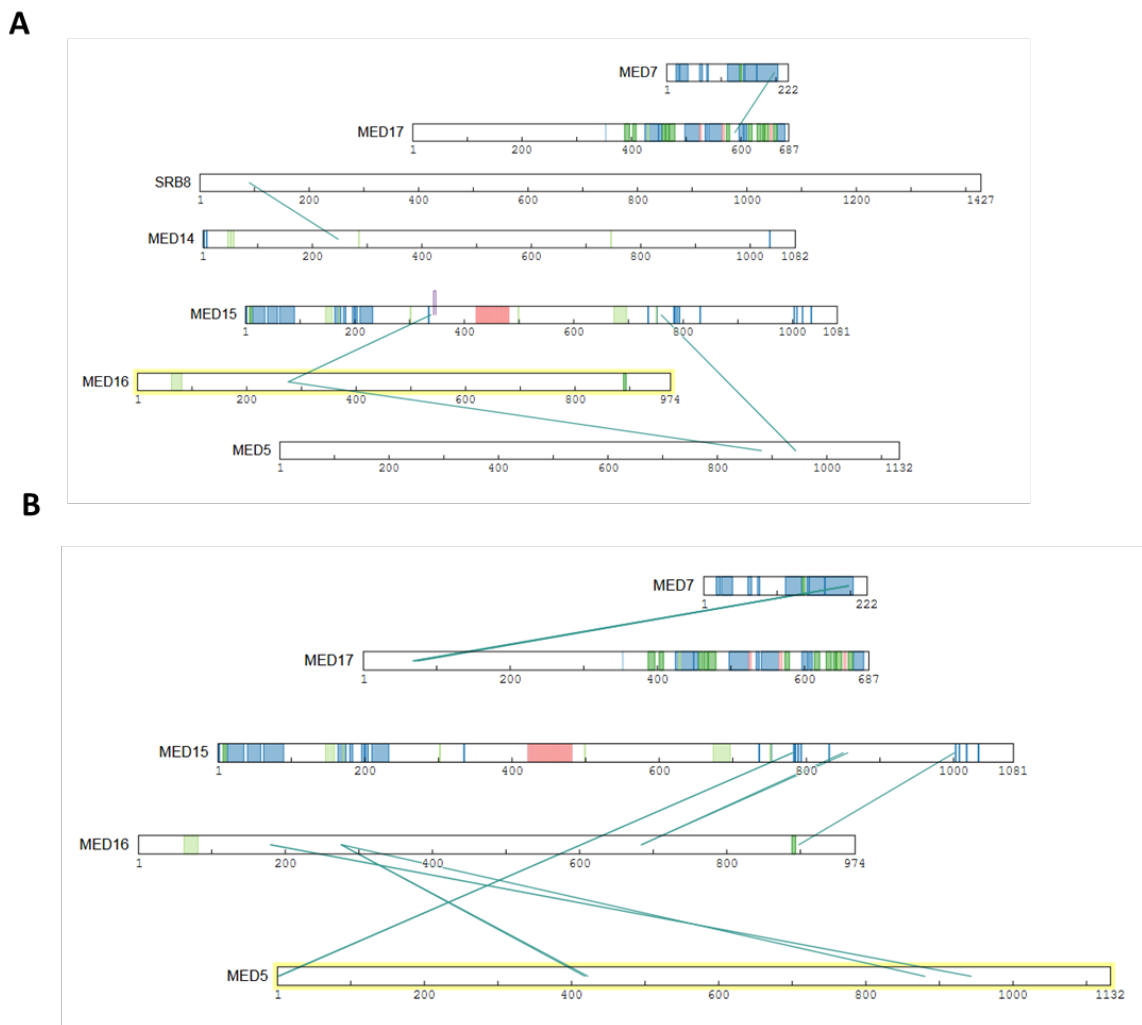


Abbildung 38: Schematische Darstellung aller Quervernetzungen, die in Kombination mit einer Med17HA-IP detektiert wurden (A) und der Vergleich mit Literaturdaten (B; (Robinson et al., 2015)).

Die Rohdaten von der Med17-HA IP wurden zunächst mit der Software StavroX ausgewertet und anschließend mit dem Cross-link Viewer xiNET dargestellt (Rappsilber Labor). Intramolekulare Quervernetzungen sind in lila, intermolekulare Quervernetzungen in türkis dargestellt (A). Im Vergleich dazu wurden die Quervernetzungen zwischen denselben Untereinheiten aus dem Anhang der Publikation von Robinson et al. 2016 ebenfalls mit XiNET dargestellt (B).

Des Weiteren wurde die Interaktion von MED7 aus dem Middle-Modul mit MED17 aus dem Head-Module identifiziert (Tabelle 9 Nr.3). Quervernetzt wurden die Lysine an Position 197 (Med7) und 589 (Med17). Diese Interaktion konnte durch Quervernetzungsversuche im Mediator-Komplex in Hefe anhand einer anderen Quervernetzung gezeigt werden (Robinson et al., 2015). Hierbei wurden die Peptide EIEQVCKQVHDK (Med7, Position 197) und DNDK~~N~~LNK (Med17, Position 75) quervernetzt.

Außerdem wurden die Untereinheit SRB8 (Med12), aus dem Kinasemodul, mit der Untereinheit Med14, aus dem Tail-Modul, mit den Lysinen an Position 91 und Position 247 miteinander verlinkt. Wie das Kinasemodul mit dem Mediator-Kernkomplex interagiert, ist noch nicht vollständig gelöst. Die Interaktion von Med12 und Med14 könnte aber gut zum bisherigen Modell passen (Abbildung 36) und würde die wichtige strukturelle Funktion von Med14 unterstreichen. Nach Tsai et al, 2014 interagiert das Kinasemodul über Med13 mit Med 19 (Middle-Modul) und über Cdk8 mit Proteinen des Headmoduls. Med12 befindet sich in der Mitte des Kinasemoduls und befindet sich so genau auf der Höhe von Med14. Eine mögliche Interaktion ist somit wahrscheinlich. Vergleiche mit den Quervernetzungsstudien von Cevher et al., 2014 und Robinson et al. 2015 sind diesbezüglich nicht möglich, da diese nur das Holoenzym ohne das Kinasemodul untersucht haben.

Im nächsten Schritt wurden die Fragmentationsspektren der vernetzten Peptide evaluiert. Als Beispiel ist in Abbildung 39 das MS/MS Spektrum der beiden Peptide KQLGYGK (MED5) und FKDLQWLEFAR (MED16) zu sehen. Im Massenspektrum sind 18 verschiedene Fragmente zu sehen, was für eine gute Sequenzabdeckung und die hohe Relevanz der Spektrens steht.

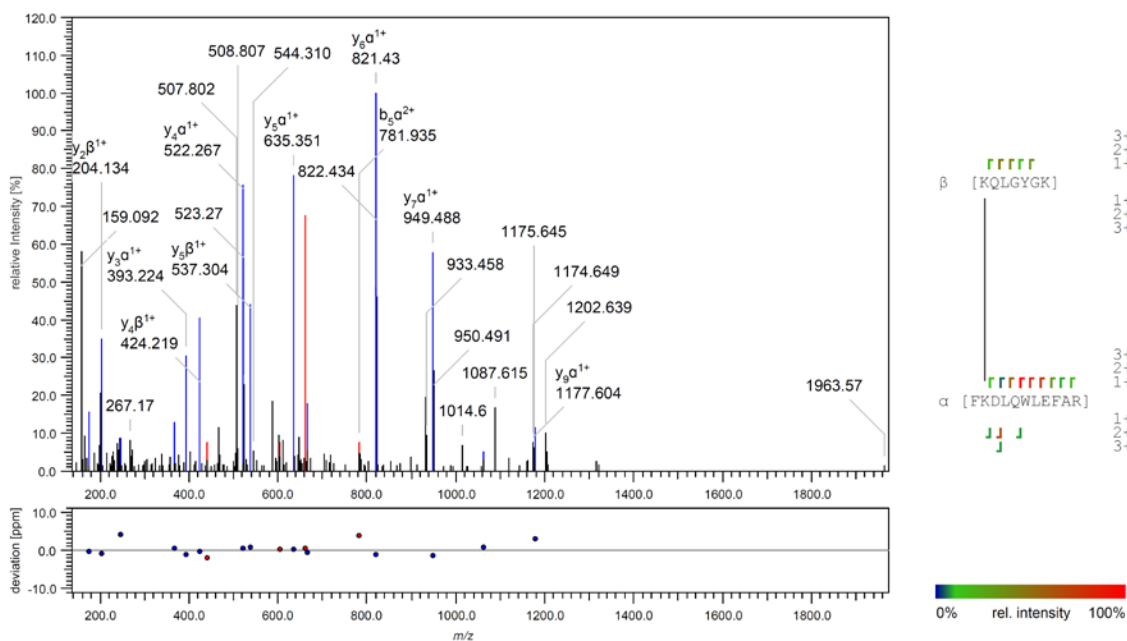


Abbildung 39: Ansicht des MS²-Spektrums der Peptide KQLGYGK und FKDLQWLEFAR, die in Tabelle 9 mit der Nr. 1 aufgelistet sind.

Zu sehen ist eine intermolekulare Quervernetzung (Typ2) von MED5 und MED16. Neben dem Fragmentationsspektrum sind die Peptidsequenzen mit den jeweiligen b- und y-Ionen markiert. Die Farbe der Markierung steht für die relative Intensität der einzelnen Ionen. Unter dem Spektrum ist die Massengenauigkeit der Fragmente in ppm angegeben.

Insgesamt betrachtet fällt die Zahl der detektierten Quervernetzungen mit sieben jedoch sehr gering aus, wenn man sie mit den Daten von Cevher et al., 2014 (278 Quervernetzungen) und Robinson et al. 2015 (277 Quervernetzungen) vergleicht. Der große Unterschied liegt hierbei vor allem in der eingesetzten Proteinmenge und an der Komplexität der Probe. Bei Cevher et al., 2014 wurden die Proteine überexprimiert. In der Arbeit von Robinson et al. 2015, wurde der native Mediator Komplex ohne Überexpression angereichert und durch Quervernetzungen untersucht. Hierzu wurden 3 kg an Hefezellen aus 200 L Kulturmedium als Ausgangsmaterial verwendet (Robinson et al., 2015). Wieviel davon für die Cryo-EM-Versuche und für das Crosslinking verwendet wurden ist nicht bekannt. Da in dieser Arbeit mit 10 g Hefezellen gearbeitet wurde, wurde in Robinson et al. 2015 auf jeden Fall mehr Protein eingesetzt. Weiterhin wurde der Holo Komplex nach der Affinitätsanreicherung zusätzlich mit Ionenaustausch- und Größenausschlusschromatographie gereinigt, was zu einer niedrigen Probenkomplexität führt.

Ein wichtiger Schritt, um die Anzahl der identifizierten Quervernetzungen zu erhöhen, wäre die Anreicherung der quervernetzten Peptide z.B. mittels Ionenaustauschchromatographie (Fritzsche et al., 2012). Hierbei könnten die niedrigabundanten, 4-fach geladenen, XL-Peptide vom Großteil der weniger geladenen Peptide abgetrennt werden und nur diese Fraktion analysiert werden. Außerdem könnte somit auch die Chance bestehen, transiente Interaktionspartner des Mediator Komplexes den einzelnen Untereinheiten zuzuordnen. Da die Interaktionspartner im Vergleich zum Mediator Komplex substöchiometrisch angereichert werden, sind mögliche quervernetzte Peptide noch weniger abundant als die innerhalb des Mediator Komplexes. Der Interaktionspartner mit der besten Stöchiometrie ist die RNA POLII, die bereits 10-fach substöchiometrisch vorliegt (Uthe et al., 2017). Bereits die Suche mit StavroX, bei der alle Untereinheiten des Mediator Komplexes und die Untereinheiten der RNA POLII verwendet wurden, führte zu keiner identifizierten Quervernetzung. Man kann somit ausschließen, dass Quervernetzung mit Interaktionspartnern, die 100-fach geringer vorliegen als der Mediator, mit der verwendeten Proteinmenge detektiert werden können.

5.1.1.3 Fazit zum Quervernetzen von Proteinen mit BS3

Insgesamt betrachtet ist das Quervernetzen von Proteinen mit dem Crosslinker BS3 besonders für überexprimierte oder große Proteinmengen geeignet (Kapitel 5.1.1.1). Die anschließende Auswertung der Daten mit der Software StavroX und die Visualisierung mit xiNET bieten eine benutzerfreundliche Möglichkeit, um XL-Daten zu prozessieren und grafisch darzustellen. Die beiden hauptsächlich limitierenden Faktoren dieser Strategie sind zum einen, dass große Proteinmengen eingesetzt werden müssen, um genügend quervernetzte Peptide zu erhalten. Zum anderen müssen die Fragmentationsspektren der quervernetzten Peptide mit einer speziellen Software wie StavroX analysiert werden, da gemischte Spektren von zwei Peptiden nicht kompatibel sind mit einer Standardsuche. Deswegen kann in einer Suche nur nach 20-30 Proteinen gesucht werden. Die Verwendung einer spezifischen Protease wie Trypsin ist aufgrund der entstehenden geringen Probenkomplexität sinnvoll. Unspezifische Proteasen, die zu mehr Peptiden und somit zu einer höheren Probenkomplexität beitragen, führen zu einer aufwendigeren Datenbanksuche, die von der Software nicht mehr erfolgreich durchgeführt werden kann.

5.1.2 Quervernetzung von Proteinen mit dem CID-spaltbaren Crosslinker Disuccinimidylsulfoxid (DSSO)

Aufgrund der Einschränkungen bei der Suche von gemischten Fragmentationenspektren von zwei quervernetzten Peptiden (n-square Problem), wurde der Crosslinker Disuccinimidylsulfoxid (DSSO) verwendet (Abbildung 40A). DSSO ist, wie BS3, ein homobifunktionaler Crosslinker mit einer Linkerlänge von 10.1 Angström, der mit den primären Aminen von Lysinseitenketten reagiert. Der entscheidende Unterschied bei der Datenauswertung ist jedoch, dass keine gemischten Spektren von zwei Peptiden mit einer speziellen Software analysiert werden müssen. Durch die selektive Spaltung des Linkers am Schwefel bei niedriger Kollisionsenergie (20 % CID), können die Fragmentationenspektren der einzelnen Peptide aus der folgenden MS³-Fragmentierung (30 % CID) für eine einfache Datenbanksuche verwendet werden (Abbildung 40B).

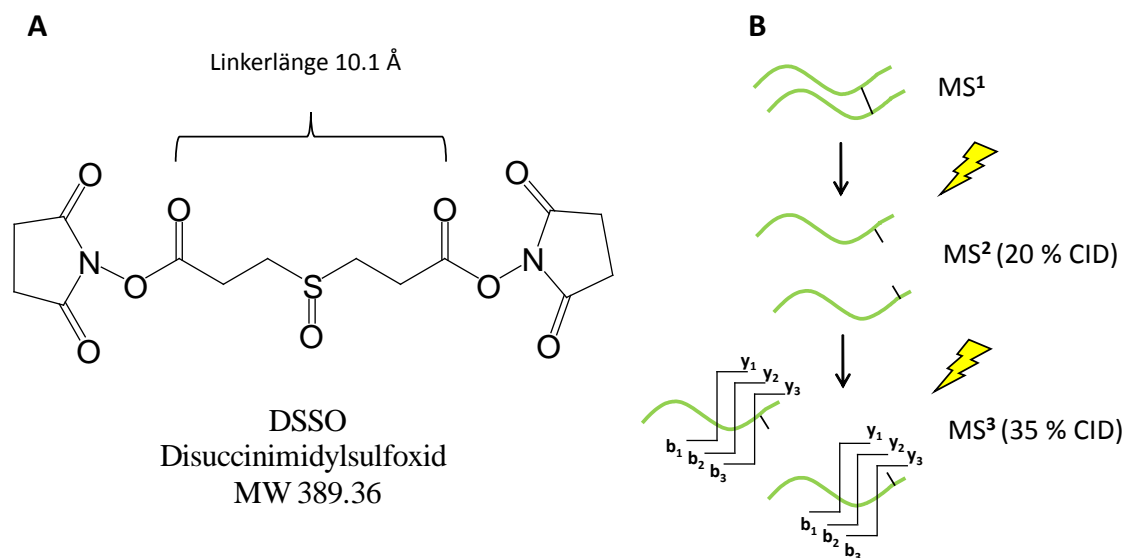


Abbildung 40: **Strukturformel und Fragmentierungsverhalten von Disuccinimidylsulfoxid (DSSO), das für das Quervernetzen von Proteinen verwendet wurde.**

(A) DSSO reagiert hauptsächlich mit den primären Aminen von Lysinseitenketten. (B) Zudem können zwei quervernetzte Peptide (grüne Linien) mit niedriger Kollisionsenergie selektiv an den Schwefel-Kohlenstoffbindungen von DSSO gespalten werden. In einem weiteren Fragmentierungsschritt können die verlinkten Peptide an der Amidbindung gespalten werden. Die MS³-Spektren können dann wie MS²-Spektren für eine Datenbanksuche verwendet werden.

Ziel dieser Strategie war es, das sogenannte n-square Problem zu umgehen, das daraus resultiert, dass jedes Peptid eines Proteins mit jedem anderen Peptid verlinkt werden kann und somit der Suchraum quadratisch mit der Anzahl der Peptide in der Datenbank steigt (Abbildung 41). Außerdem ist die XL-Datenbanksuche somit auf spezifische Proteasen wie Trypsin und wenige Proteine limitiert.

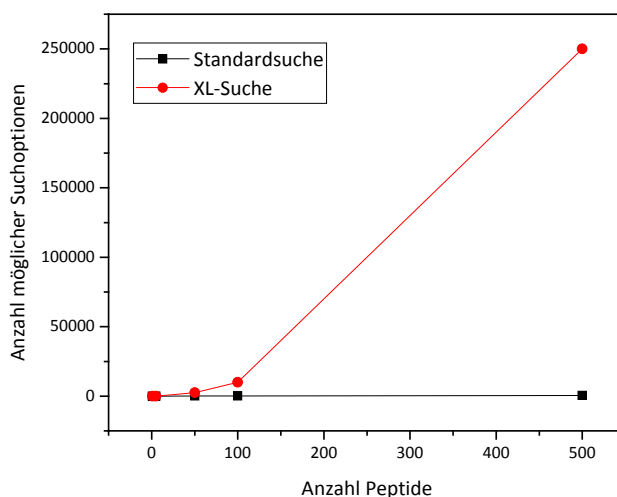


Abbildung 41: **Exemplarischer Vergleich der Suchoptionen in einer Standardsuche und der Suche von quervernetzten Peptiden.**

Die Peptide und deren Suchoptionen stehen bei einer Standardsuche theoretisch in einem linearen Zusammenhang. Bei der Suche von quervernetzten Peptiden liegt jedoch ein quadratischer Zusammenhang vor, was die Anzahl der möglichen Suchoptionen enorm vergrößert.

Durch die selektive Spaltung am Schwefel entsteht für jedes Peptid ein Alken- und ein Sulfensäurerest, die einen Abstand von 48.98 Da im Massenspektrum haben (Abbildung 42A). Insgesamt werden also 4 Peaks detektiert, die zu zwei Peptiden, mit zwei verschiedenen Modifikationen am Lysin, gehören. Zudem ist es möglich, dass Peptide mit einem Sulfensäurerest unter Verlust von H₂O direkt weiter zu einem ungesättigtem Thiol fragmentieren (Abbildung 42D). In einem weiteren Schritt kann dann die Fragmentierung der Peptide stattfinden, welche die Sequenzinformation in Form der Aminosäuren enthält. Quervernetzte Peptide können somit zum einen direkt an einem bestimmten Fragmentierungsmuster im MS² erkannt werden und zum anderen kann die Sequenzinformation der einzelnen Peptide mit der Modifikation gegen eine komplette Datenbank gesucht werden (MS³). Es ist keine spezielle Software, wie StavroX bei der Verwendung der Substanz BS3, notwendig um quervernetzte Peptide zu identifizieren.

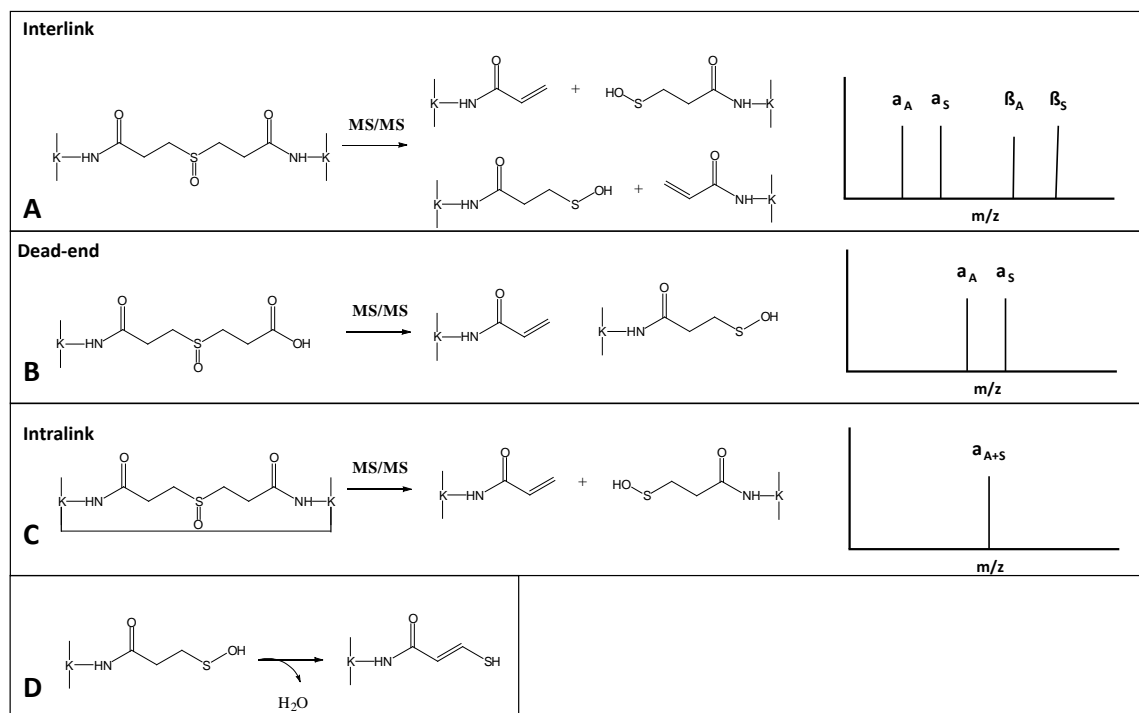


Abbildung 42: **Fragmentierungsvarianten von Disuccinimidylsulfoxid bei niedriger Kollisionsenergie.**

A) Die Spaltung von DSSO, das an beiden Enden mit zwei Lysinseitenketten reagiert hat, führt bei jedem Peptid zu einem Alken- und einem Sulfensäurerest. Das gleiche Peptid, mit den verschiedenen Resten, kann als 2 Peaks mit dem Abstand von 31.97 Da detektiert werden. B) Wenn DSSO mit einem primären Amin von Lysin und der andere Carbonsäureester mit Wasser reagiert, kommt es im MS^2 -Spektrum nur zu 2 Peaks mit dem Abstand von 31.97 Da. C) Reagiert DSSO mit 2 Lysinen innerhalb eines Peptides, kommt es im MS^2 -Spektrum zu einem Peak. D) Der Sulfensäurerest kann durch die Abspaltung von H_2O zu einem ungesättigten Thiol weiterfragmentieren (Modifiziert nach (Kao et al., 2011)).

Da es sich bei dem CID-spaltbaren Crosslinker DSSO auch um eine aminreaktive Substanz handelt, gelten die in Kapitel 5.1.1 diskutierten Vor- und Nachteile. Jedoch müssen weitere Aspekte beachtet werden, da durch die Spaltung des Linkers auf MS^2 -Ebene ein weiterer Fragmentierungsschritt für die Identifizierung notwendig wird. Die Intensität der Fragmentionenspektren wird von Ebene zu Ebene niedriger wodurch Fragmentionen, die wichtig für die Sequenz sind, im Rauschen untergehen können. Da quervernetzte Peptide meist im MS^1 -Scan bereits eine niedrige Intensität haben, stellt dies ein ernstzunehmendes Problem dar.

Mit einer unspezifischen Protease (z.B. Elastase) könnte verhindert werden, dass quervernetzte Peptide zu lang werden. Kürzere Peptide erzeugen weniger Fragmente im MS^2 -Spektrum, die eine höhere Intensität haben. Somit erhöht sich die Spektrenintensität. Jedoch bringt dieser Ansatz auch einen Nachteil im Hinblick auf die erzeugten Fragmentionen. Da nach einem Verdau mit Elastase nicht jedes Peptid am C-Terminus

eine positive Ladung aufweist, wie es beim Verdau mit Trypsin der Fall ist, fehlt die y-Ionenserie im Spektrum.

Wichtig bei der Verwendung von DSSO ist, dass die Sequenzen von beiden quervernetzten Peptiden als MS³-Scan vorliegen. Wie in Abbildung 42A gezeigt, entstehen nach der Spaltung von zwei quervernetzten Peptiden vier Fragmentationen, wovon zwei jeweils die gleiche Sequenz enthalten. Wird für die Fragmentierung zwei Mal das gleiche Peptid ausgewählt, fehlt die Sequenz des anderen Peptids. Die Verwendung einer Methode, die von jedem MS²-Scan vier MS³-Scans der intensivsten Peaks macht, kann die Wahrscheinlichkeit erhöhen, beide Peptide zu sequenzieren. Diese Einstellung hat jedoch eine Verlängerung des MS-Zyklus zur Folge.

Die Synthese von DSSO wurde, wie in Kao et al. 2011 beschrieben, durchgeführt und DSSO als Hauptsyntheseprodukt identifiziert (Abbildung A. 36). Mittlerweile ist DSSO kommerziell verfügbar, was die Synthese und weitere Aufreinigung nicht länger nötig macht.

5.1.2.1 Quervernetzen von Cytochrom C mit DSSO

Für die Methodenetablierung der Quervernetzung mit DSSO wurde, wie in Kao et al. 2011, das kommerziell verfügbare bovine Cytochrom C verwendet, damit nach dem tryptischen Verdau genau die gleichen Peptide entstehen. Die resultierenden Ergebnisse können somit direkt miteinander verglichen werden.

Die Quervernetzungsreaktion wurde mit 200 µM Cytochrom C in 1 x PBS Puffer bei pH 7.5 und einem 10-fach Überschuss an DSSO für 2 h bei RT durchgeführt. Nach dem Precursorscan wurde ein MS²-Spektrum mit reduzierter Kollisionsenergie (20 % CID) durchgeführt, um die mit DSSO quervernetzten Peptide selektiv am Crosslinker zu spalten. Die Spaltung erfolgt in der Mitte von DSSO an der Kohlenstoff-Schwefel-Bindung. Es entsteht somit ein charakteristisches Muster an Peaks, das sich jeweils aus dem Peptid und dem Linker mit Alkenrest oder dem Thiol bzw. Sulfensäurerest zusammensetzt (Abbildung 43A). Die Fragmente dieser Spektren wurden für eine weitere Fragmentierung mit erhöhter Kollisionsenergie (35 % CID) ausgewählt (Abbildung 43 B und C). Die MS³-Spektren beinhalten somit die Sequenzinformationen, die sonst in den MS²-Spektren zu finden sind. Durch den Massenunterschied bestimmter Fragmente im

MS³-Spektrum zur ursprünglichen Peptidsequenz, kann die genaue Stelle des Crosslinks bis auf die Aminosäure genau bestimmt werden (Abbildung 43). In den LC-MS/MS-Messungen wurde die Anzahl der MS³-Spektren auf 2-4 Spektren der intensivsten Massenpeaks im MS²-Spektrum festgelegt. Vergleicht man das theoretische Spektrum aus Abbildung 42A mit dem gemessenen aus Abbildung 43A, ist ein deutlicher Unterschied im Hinblick auf die Intensität der verschiedenen Ionen zu erkennen. Dies kann ein Problem bei der Identifizierung der Peptide per MS³-Scan darstellen, da nur die zwei intensivsten Peaks ausgewählt werden. Sind die beiden Peaks vom gleichen Peptid, fehlt die Sequenz des anderen Peptids und die genaue Quervernetzung kann nicht bestimmt werden.

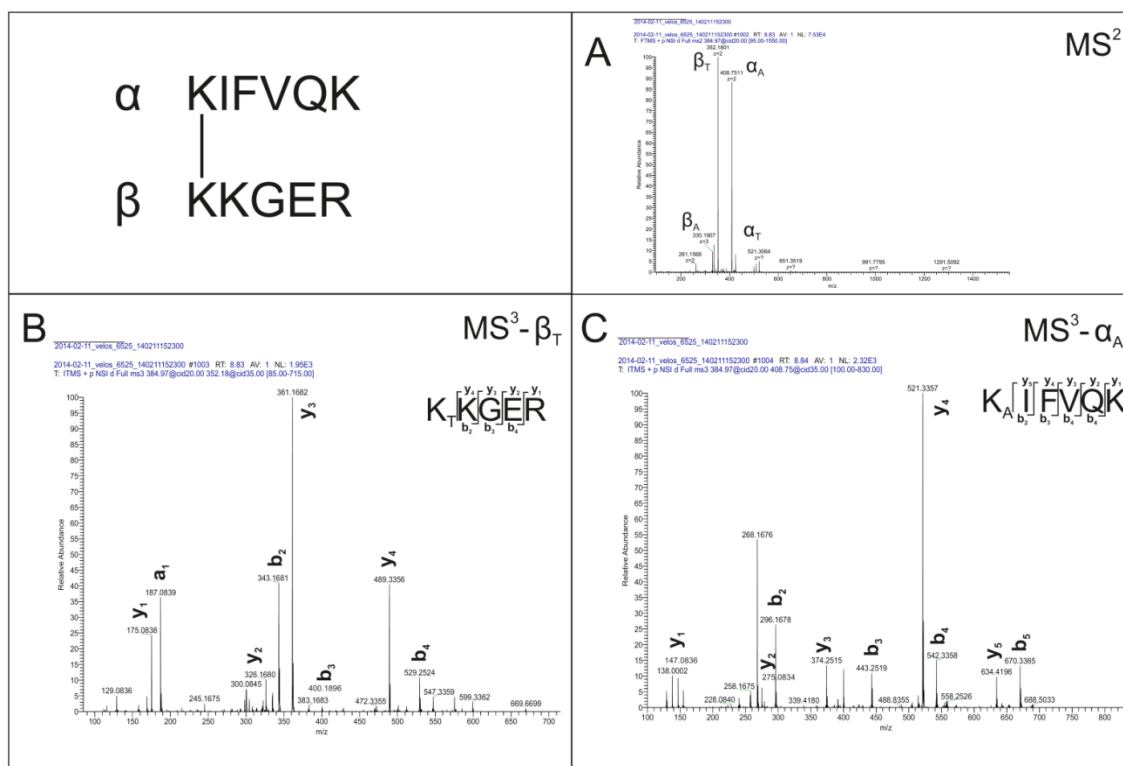


Abbildung 43: MSⁿ-Analyse von zwei Peptiden aus Cytochrom C, die mit DSSO quervernetzt wurden.

A) Das MS/MS-Spektrum von $[\alpha\text{-}\beta]^{4+}$ (m/z 384.97) in dem 2 Fragmentenpaare zu sehen sind: α_A (m/z 408.7511)/ β_T (m/z 352.1801) und α_T (m/z 424.7369)/ β_A (m/z 336.1942). B) MS³-Spektrum von β_T (m/z 352.1801) in dem die Ionen y_1 - y_4 und b_2 - b_4 detektiert wurden, welche die komplette Sequenzinformation von K_T KGER enthalten. C) MS³-Spektrum von α_A (m/z 408.7511) in dem die Ionen y_1 - y_4 und b_2 - b_4 detektiert wurden, welche die komplette Sequenzinformation von K_A IFVQK enthalten. Peptid α ist mit einem Alkenrest modifiziert, Peptid β mit einem Thiolrest.

Als Kollisionsenergie für die selektive Spaltung des Linkers wurde 20% CID gewählt. Wird zu wenig Energie gewählt wird der Precursor nicht vollständig fragmentiert. Verwendet man zu viel Energie, würde man die quervernetzten Peptide nicht selektiv am

Linker spalten sondern auch noch am Peptidrückgrad. Ein Großteil der quervernetzten Peptide in Cytochrom C aus Kao et al. 2011 wurden in diesem Versuch bestätigt (Tabelle A. 1).

5.1.2.2 Quervernetzung von UBX und p97N mit DSSO

Nach der erfolgreichen Synthese und Anwendung des Crosslinkers DSSO an Cytochrom C wurde der etablierte Workflow für zwei Proteine verwendet, bei denen die genaue Stelle der Interaktion bereits gezeigt werden konnte (Abbildung 44). Hierzu wurden die UBX-Subdomäne des humanen Proteins FAF1 und die p97N-Subdomäne des humanen Proteins p97 von Petra Hänzelmann (AG Schindelin) in *E. Coli* überexprimiert und in einem 1:1 Gemisch zu Verfügung gestellt.

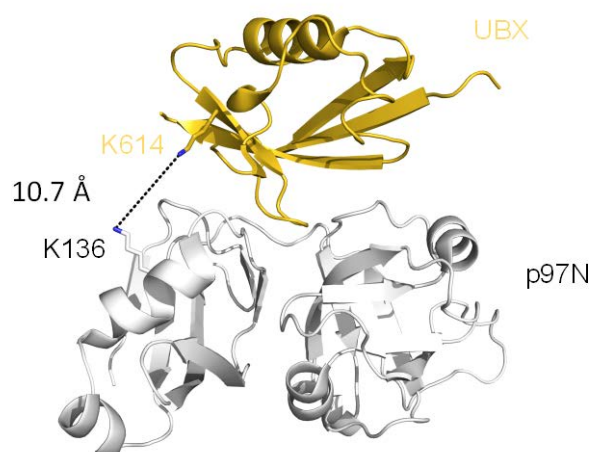


Abbildung 44: **Strukturmodell der Interaktion von p97N und UBX**

Durch die Interaktion von UBX (gold) und p97N (grau) kommen sich die Lysine K614 und K136 so nahe, dass sie theoretisch quervernetzt werden können. Der theoretische Abstand der Lysine beträgt 10,7 Å (Hänzelmann et al., 2011). Die Grafik wurde von Petra Hänzelmann (AG Schindelin) zur Verfügung gestellt.

Die ATPase p97 ist in eine Vielzahl von zellulären Prozessen involviert. Dazu gehören die Regulation der Genexpression, des Zellzyklus und der Apoptose (Vij, 2008; Woodman, 2003). Als molekulares Chaperon ist p97 dafür zuständig, Substratproteine zu falten oder deren Konformation zu ändern. Die Struktur von p97 setzt sich aus zwei miteinander verbundenen AAA-Domänen zusammen, die in hexamerer Form einen Zylinder bilden. Die N-terminale Domäne befindet sich außerhalb des Zylinders und es konnte gezeigt werden, dass sie mit verschiedenen Adapterproteinen interagiert und

dadurch reguliert wird (Kondo et al., 1997; Zhang et al., 2000). Eines dieser interagierenden Adapterproteine ist das Protein FAF1. Über die Subdomäne UBX findet die Interaktion mit der N-terminalen Domäne von p97 statt (Hänzelmann et al., 2011).

Eine Stocklösung von p97N und UBX mit der Konzentration von 9 mg/mL wurde mit 5 mM DSSO (in DMSO) quervernetzt, mittels SDS-PAGE aufgetrennt, mit Coomassie angefärbt und mit Elastase verdaut. Die intensivsten Banden stellen die beiden einzelnen Proteine UBX und p97N dar, was ein Hinweis auf eine schlechte Quervernetzungseffizienz ist. Im Vergleich mit der quervernetzten Proteinbande von NPL4 und UFD1 ist hier ein deutlicher Unterschied zu erkennen (Abbildung 33, Abbildung 45). Neben den beiden sehr intensiven Proteinbanden von UBX (9.9 kDa) und p97N (20.9 kDa), sind weitere Proteinbanden im Bereich von 35 und 160 kDa und die Geltasche mit Coomassie angefärbt (Abbildung 45B). Insgesamt sind somit 8 zusätzliche Proteinbanden durch das Quervernetzen entstanden. Diese Banden sind auf der Höhe von 50, 55, 70, 90 und 130 kDa und sind vermutlich polymere Einheiten von p97N (Hexamer möglich) mit einer Einheit UBX.

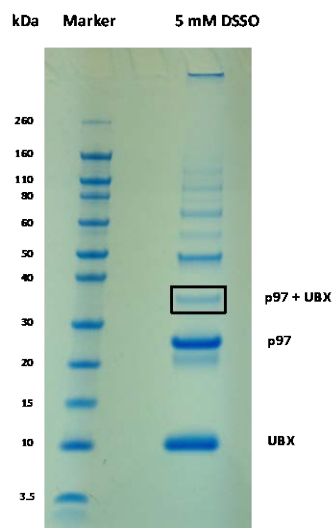


Abbildung 45: **Quervernetzung der beiden Proteine UBX und p97N.**

Die beiden Subdomänen UBX und p97N, die von Dr. Petra Hänzelmann zur Verfügung gestellt wurden, wurden mit 5 mM DSSO für 2 h bei RT quervernetzt. Anschließend wurden die Proteine reduziert, alkyliert und mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Für die MS-Messung wurde die Bande auf der Höhe von 35 kDa ausgeschnitten, in der beide Proteine miteinander quervernetzt wurden.

Um die Interaktion von UBX und p97N genauer zu untersuchen, wurde die Proteinbande an der Stelle 35 kDa ausgeschnitten, da sie vom Molekulargewicht zur Masse des Heterodimers passt. Die relativ schwache Färbung dieser Bande bestätigt die schlechte

Ausbeute an quervernetzten Proteinen. Dies könnte zum einen an einer zu niedrigen DSSO-Konzentration liegen oder daran, dass die Linkerlänge von DSSO zu kurz ist, um eine effiziente Quervernetzung zu erzeugen. Weitere Versuche mit DSSO, das einen längeren Linker hat, könnten zu einer besseren Quervernetzungseffizienz führen.

Die Gelbande wurde mit Elastase verdaut und die entstandenen Peptide mittels LC-MS/MS an einer Orbitrap Velos gemessen. Der Verdau mit Elastase ist bei diesem Versuch möglich, da die MS³-Spektren für eine standardmäßige Datenbanksuche verwendet werden können. Der erhoffte Vorteil ist, dass eine Limitierung durch den Verdau mit einer spezifischen Protease wie Trypsin umgangen werden kann. Die größte Limitierung ist hierbei, dass bei aminreaktiven Crosslinkern fast alle Lysine modifiziert werden und daran nicht mehr gespalten werden kann. Die verbleibende Spaltungsstelle C-terminal von Arginin kann zu sehr langen Peptiden führen, die zu hydrophob werden und somit zu spät von der analytischen Säule eluieren und nicht mehr detektiert werden (Kapitel 3.1.3.2). Die beiden Lysine, die laut Strukturmodell in entsprechender Nähe sind, um miteinander quervernetzt zu werden, sind in rot markiert (Abbildung 46 (Hänzelmann et al., 2011)).

Unter Berücksichtigung der tryptischen Spaltstellen (gelbe AS) entstehen nach dem Verdau zwei vernetzte Peptide, die eine Länge von 46 Aminosäuren haben. Das theoretische Peptid GFPWDEYKLLSTFPRIHVLPIDDTVEGITGNLFEVYLKPYFLEA-YR wurde auf der Homepage pepcalc.com (Innovagen) hinsichtlich der Hydrophobizität überprüft (Hopp and Woods, 1981). Für dieses Peptid wurde eine schlechte Wasserlöslichkeit berechnet (Abbildung A. 38). Der Hydrophobizitätswert wurde zudem mit dem Peptide Analyzing Tool von Thermo Fisher Scientific ermittelt und ergab einen Wert von 73.28. Dieser Wert ist vor allem auf neun aromatische und 13 aliphatische Aminosäurereste zurückzuführen. Das kürzere hydrophobe Peptid GLVLIAFSQYLQ-QCPFDEHVK, aus einer kommerziellen Peptidmischung (DionexTM Protein Mixture Digest), hat ebenfalls eine schlechte Wasserlöslichkeit und eine Hydrophobizität von 49.35. Es eluiert nach 38 min von der analytischen Säule. Bei dem verwendeten LC-Gradienten wird die Säule nach 40 min mit ACN gesäubert und für die nächste Messung reäquilibriert. Es besteht somit die Möglichkeit, dass das längere quervernetzte Peptid mit den Aminosäuren GFPWDEYKLLSTFPRIHVLPIDDTVEGITGNLFEVYLKPYFLEA-

YR in diesem Bereich oder noch später von der Säule eluiert und somit nicht mehr detektiert werden kann. Falls die Detektion doch stattfindet sollte, teilt sich die Gesamtintensität der Vorläuferionen auf die vielen einzelnen Fragmentionen auf, was zu einem schlechten MS²-Spektrum führen würde.

UBX - Subdomäne des humanen Proteins FAF1 (Aminosäure 566-650)

KEENAEPVSKLRIRTPSGEFLERRFLASNKLQIVDFVASKGFPWDEYKLLSTFPRRDVTQLDPNKSLLLEVKLFPEQTL
FLEAKE

p97N - Subdomäne des humanen Proteins p97 (Aminosäure 1-187)

MASGADSKGDDLSTAILKQKNRPNRLIVDEAINEDNSVVSLSQPKMDELQLFRGDTVLLKGGKRRREAVCIVLSDDTTC
SDEKIRMNRVVRNNLRVRLGDVISIQPCPDVKYGKRIVHLVPIDDTVEGITGNLFEVYLKPYFLEAYRPIRKGDIFLVRG
GMRAVEFKVETDPSPYCIVAPDTVIHCEGE

Abbildung 46: **Aminosäuresequenzen der Subdomänen UBX und p97N.**

In rot sind die jeweiligen Lysine markiert, die laut Strukturmodell miteinander quervernetzt werden können. In orange sind jeweils die nächsten C- und N-Terminale tryptischen Spaltstellen markiert. Die resultierenden quervernetzten Peptide hätten somit eine Länge von 46 Aminosäuren und wären schlecht wasserlöslich. Der m/z-Wert bei der Ladung +4 beträgt 1406.2154.

Um diese Limitationen zu umgehen, wurde der Verdau mit Elastase durchgeführt. Insgesamt wurden 14 modifizierte Peptide des Proteins p97N und ein Peptid von UBX identifiziert (Tabelle 10). Diese Peptide weisen die Modifikationen des gespaltenen Linkers in der Form eines Sulfensäure- (S), Alken- (A) oder Thiolrestes (T) auf. Bei sechs der gefundenen Peptide kam es zudem zur Modifikation von zwei Lysinseitenketten mit DSSO (Tabelle 10 Nr.1, 5, 6, 8, 9, 10, 12).

Bei zwei Peptiden handelt es sich um Peptide, die aus dem gleichen MS¹-Scan entstammen. Diese Paare stellen potentiell quervernetzte Peptide dar (Tabelle 10; rot markierte Scans). Beim ersten Peptidpaar aus Scan 1413 und 1414 handelt es sich um das gleiche Peptid, das mit Thiol- und Alkenmodifikation identifiziert wurde. Aufgrund dieser Information könnte es sich um ein Dead-End-modifiziertes Peptid handeln oder um eine Verlinkung von p97N und UBX, bei der das Peptid von UBX fehlt, da es nicht für ein MS²-Spektrum ausgewählt wurde. Die Auswertung des vorigen MS²-Scans zeigte jedoch, dass lediglich die beiden Peaks von Scan 1413 und 1414 zu sehen sind. Es handelt sich somit um ein Dead-End-modifiziertes Peptid, das keine Information für die Interaktion von p97N und UBX beinhaltet (Abbildung 42B). Das gleiche trifft auf die Scans 3249 und 3250 zu, die im vorigen MS²-Spektrum nur ein Peakpärchen aufwiesen.

Der Abstand von 15.9 Da passt zum Wasserverlust des Thiols zur Sulfensäure (Abbildung 42D).

Tabelle 10: Liste der Peptide von UBX und p97N, die mit DSSO modifiziert und mit Elastase verdaut wurden.

Die Rohdaten der LC-MS/MS Messung von der quervernetzten Bande aus Abbildung 45B wurden mit einem Skript modifiziert und die MS³-Spektren für die Datenbanksuche verwendet. Zwei Peptide, die aus aufeinanderfolgenden Massenscans stammen, stellen potentielle quervernetzte Peptide dar. Die modifizierten Lysine wurden in der Liste in rot markiert und die jeweilige Modifikation steht in Klammern dahinter

Nr.	m/z	z	Protein	Peptid	Modifikation	Scan
1	625.8	+2	p97N	ILK(A)QK(T)NRPN	DSSO inter A (K); DSSO	1514
2	489.3	+3	p97N	ILK(T)QKNRPNRL	DSSO inter T (K)	1413
3	478.6	+3	p97N	ILKQK(A)NRPNRL	DSSO inter A (K)	1414
4	489.3	+3	p97N	ILKQK(T)NRPNRL	DSSO inter T (K)	1476
5	590.8	+2	p97N	K(A)QK(T)NRPNR	DSSO inter A (K); DSSO	1237
6	569.3	+2	p97N	LK(A)QK(T)NRPN	DSSO inter A (K); DSSO	1095
7	713.9	+3	p97N	LSDDTCSDEK(T)IRM(O)NRVV	DSSO inter T (K); Oxidation	2351
8	736.8	+2	p97N	PCPDVK(A)YGK(T)RI	DSSO inter A (K); DSSO	3249
9	745.8	+2	p97N	PCPDVK(A)YGK(S)RI	DSSO inter A (K); DSSO	3250
10	736.8	+2	p97N	PCPDVK(A)YGK(T)RI	DSSO inter A (K); DSSO	4038
11	873.9	+2	p97N	SIQPCPDVK(T)YGKRI	DSSO inter T (K)	2807

12	590.3	+3	p97N	SIQPCPDV K (A)Y GK (A)RI	2 x DSSO inter A (K)	3124
13	747.0	+3	p97N	VLSDDTCSDE K (T)IRM(O)NRVV	DSSO inter T (K); Oxidation	2436
14	638.9	+3	UBX	STFPRRDVTQLDPNKS	DSSO inter A	2520

Insgesamt betrachtet konnten somit keine Quervernetzungen zwischen p97N und UBX detektiert werden. Ein Grund hierfür könnte auch die Linkerlänge von DSSO mit 10.1 Å sein (Abbildung 40). Die beiden Lysinseitenketten, die laut Strukturmodell nahe beieinander liegen, haben eine Entfernung von 10.7 Å. Die Linkerlänge reicht somit laut Strukturmodell nicht aus. Die schlechte Ausbeute an quervernetzten Proteinen bestätigt diese Annahme zum Teil, da sie nur sehr schwach ausfällt (Abbildung 45). Die Existenz dieser Bande deutet aber darauf hin, dass eine Quervernetzung möglich ist.

In weiteren Versuchen wurden beide Proteine mit BS3 quervernetzt, der einen längeren Linker aufweist, und mit der Software StavroX ausgewertet (genau wie Kapitel 5.1.1.1). Auch diese Analyse brachte keinen Beweis für die Interaktion von p97N und UBX an bestimmten Aminosäuren. Die fehlende Detektion von quervernetzten Peptiden könnte daran liegen, dass deren Intensität zu niedrig war, um sie zu finden. Gerade bei der Verwendung des CID-spaltbaren Crosslinkers DSSO wird auch noch auf der MS³-Ebene genug Intensität benötigt, um gute Fragmentationsspektren für die Identifizierung der beiden quervernetzten Peptide zu erhalten. Der Verdau mit der unspezifischen Protease Elastase begünstigt diesen Effekt der niedrigen Intensität der Fragmentationen, da nicht jeder C-Terminus, wie beim Verdau mit Trypsin, eine positive Ladung aufweist. Der Vorteil durch bessere Spaltstellen mit Elastase, geht durch die geringere Ladung der Peptide verloren. Zudem werden durch unspezifische Proteasen mehr Peptide aus einem Protein erzeugt, die jeweils eine geringere Intensität aufweisen. Da ein Messzyklus mit dem intensivsten Peak beginnt, können niedrig abundante Peptide mit kleineren Peaks nicht erfasst werden oder gehen im Rauschen unter.

Ein vielversprechender Lösungsansatz, mit der die Spektrenqualität verbessert werden kann, ist der Verdau mit einer unspezifischen Cystein-Protease (z.B. Papain) und einem

Überschuss an Argininamid (unpublizierte Ergebnisse AG Schlosser). Statt der Hydrolyse wird der Peptid-Enzym-Thioester durch den nucleophilen Angriff des N-Terminus des Argininamids gespalten. Somit erhält man, wie bei dem Verdau mit Trypsin, Peptide, die am C- und N-Terminus eine positive Ladung aufweisen. Jedoch erhält man aufgrund der geringen Spezifität von Papain kürzere Peptide. Gleichzeitig würde damit auch das Problem beseitigt, dass quervernetzte Peptide zu lang werden.

5.1.2.3 Fazit zum quervernetzten von Proteinen mit DSSO

Das Quervernetzen von Proteinen mit DSSO bietet eine intelligente Lösung, um XL-Daten für eine normale Datenbanksuche verwenden zu können. Die MS^3 -Spektren der Peptide können problemlos wie MS^2 -Spektren bei einer Suche verwendet werden. Jedoch erzeugen das Spalten des Linkers und die damit verbundenen Messungen auf MS^3 -Ebene weitere Limitationen. Die Messung auf MS^3 -Ebene setzt eine große Menge an quervernetzten Peptiden voraus, um gute Fragmentationsspektren zu erhalten. Ein weiteres Kriterium für gute Fragmentationsspektren ist die positive Ladung an beiden Enden des Peptids, was den Verdau mit Trypsin notwendig macht.

5.1.3 Methodenentwicklung für eine optimierte Precursor-Selektion von quervernetzten Peptiden

Durch das Quervernetzen von Proteinen wird innerhalb der Probe eine komplexe Mischung aus modifizierten und unmodifizierten Peptiden erzeugt. Weiterhin kommt es zu einem erheblichen Verlust an Gesamtprotein durch die Aggregation von Proteinen, die während der Quervernetzungsreaktion verloren gehen. Somit bleibt nur ein geringer Teil an quervernetzten Peptiden, die sehr niedrig abundant innerhalb der komplexen Probe sind (Abbildung 47). Um quervernetzte Peptide gezielt anzureichern, gibt es verschiedene Methoden: Crosslinker mit Affinitätsmarkierung (Petrotchenko et al., 2011), Size Exclusion Chromatography (Leitner et al., 2012) und Ion Exchange Chromatography (Chen et al., 2010).

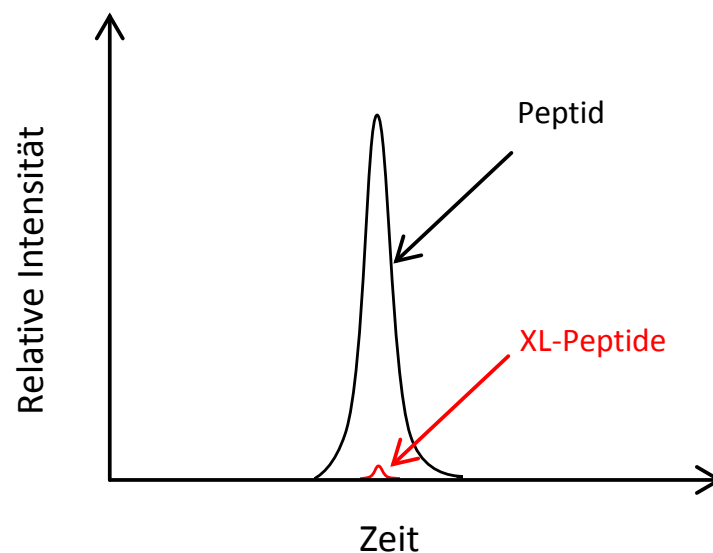


Abbildung 47: **Exemplarischer Vergleich der Intensität aus extrahierten Ionenchromatogrammen von einem Peptid und einem XL-Peptid in einer Probe.**

Durch das Quervernetzen wird eine komplexe Peptidmischung erzeugt, in der die quervernetzten Peptide in geringen Mengen vorliegen.

Eine weitere Möglichkeit, um an die Massenspektren von niedrigabundanten Peptiden zu gelangen ist, während der MS-Messung gezielt nach diesen Peptiden zu suchen. Ein entscheidendes Kriterium dafür ist, dass zwei quervernetzte Peptide zwei C- oder N-Termini enthalten, die spezifisch modifiziert werden können. Peptide mit einer Quervernetzung innerhalb des Peptids und Dead-End-Peptide haben nur einen C- oder N-Terminus und werden somit anders markiert.

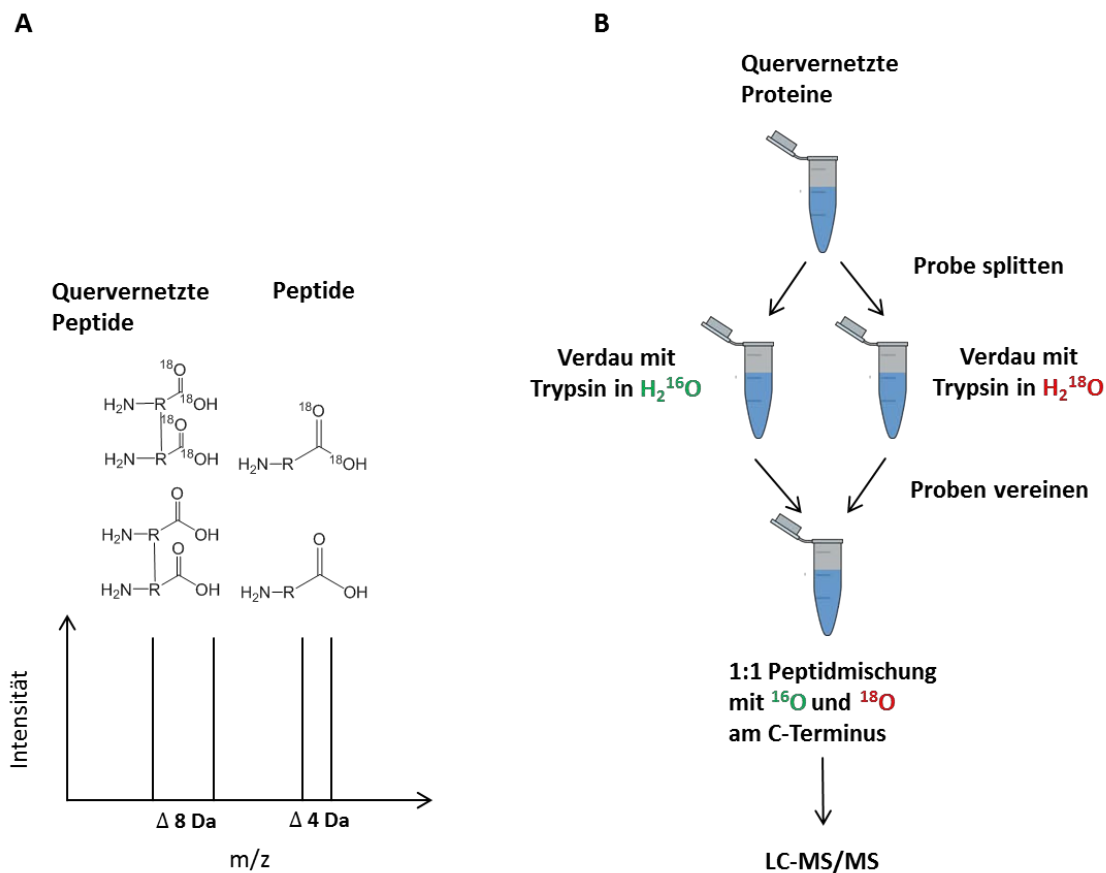


Abbildung 48: Schematische Darstellung der Strategie, um quervernetzte Peptide mit einer spezifischen Massenverschiebung zu suchen.

A) Bei einfachen Peptiden sind nach der Markierungsreaktion zwei Massenpeaks zu sehen, die einen Abstand von 4 Da aufweisen. Quervernetzte Peptide, die zwei Termini haben, können durch ihren spezifischen Unterschied von 8 Da zwischen der markierten und nicht markierten Form, selektiv bei der MS-Messung ausgewählt werden. Peptide mit einer Quervernetzung innerhalb des Peptids und Dead-End-Peptide haben nur einen C-Terminus und werden somit nicht selektiert.

B) Um quervernetzte Peptide gezielt zu suchen, wird die Probe gesplittet und durch einen tryptischen Verdau in H_2^{16}O bzw. H_2^{18}O markiert. Nach der Markierung werden die Proben vereint, wodurch eine 1:1 Mischung aus schwer und leicht markierten Peptiden entsteht. Mittels LC-MS/MS kann dann spezifisch nach den Massenverschiebungen gesucht werden.

Eine Methode zur selektiven Isotopenmarkierung der C-Termini ist das Enzymkatalysierte ^{18}O -Labeling. Das Aufteilen der Probe nach dem Quervernetzen und die anschließende Markierung der C-Termini mit leichtem und schwerem Sauerstoff beim Verdau, führen bei quervernetzten Peptiden zu einem spezifischen Massenunterschied von 8 Da. Mit einer speziellen MS-Methode, die dafür sorgt, dass nur MS^2 -Spektren gemacht werden, wenn ein Massenunterschied von 8 Da erkannt wird, sollte die Identifizierung von niedrig abundanten, quervernetzten Peptiden deutlich erhöht werden (Abbildung 48).

5.1.3.1 Enzymatische Markierung der C-Termini von Proteinen mit ^{18}O -Wasser

Wie bereits in der Einleitung Kapitel 3.1.4.2 beschrieben, kann man Peptide enzymatisch mit ^{18}O markieren. Bei der enzymatischen Markierung von Proteinen mit ^{18}O -Wasser bildet sich zunächst ein intermediärer Enzym-Peptidester, der mit dem schweren H_2^{18}O hydrolysiert und somit das Trypsin und das einfach markierte Peptid freisetzt (Abbildung 17). Im nächsten Schritt kann das bereits markierte Peptid erneut mit Trypsin einen Ester bilden, der wieder mit ^{18}O -Wasser gespalten wird. Das entstandene Peptid enthält zwei ^{18}O -Atome am C-Terminus und ist somit 4 Da schwerer als ein nicht markiertes Peptid. Zwei quervernetzte Peptide, die zwei C-Termini haben weisen nach der Markierung einen Unterschied von 8 Da im Vergleich zu nicht markierten quervernetzten Peptiden auf. Dieser spezifische Unterschied kann für die Selektion während der MS-Messung verwendet werden.

5.1.3.2 Überprüfung des ^{18}O -Markierungsgrades von Peptiden

Beim ^{18}O -Labeling kann es leicht zum Rücktausch des eingebauten ^{18}O durch ^{16}O kommen, wenn die Probe mit ^{16}O in Kontakt kommt. Deswegen wurde der Markierungsgrad von Peptiden durch Trypsin mit zwei schweren Sauerstoffatomen überprüft. Mit dem Softwaretool IDCalc können theoretische, markierte Spektren erzeugt werden, die mit den experimentellen verglichen werden können. Die gemessenen Isotopenmuster wurden mit dem Mascot Distiller ausgewertet. Den Unterschied zwischen einem leichten und einem schweren Peptid ist in Abbildung 49 dargestellt.

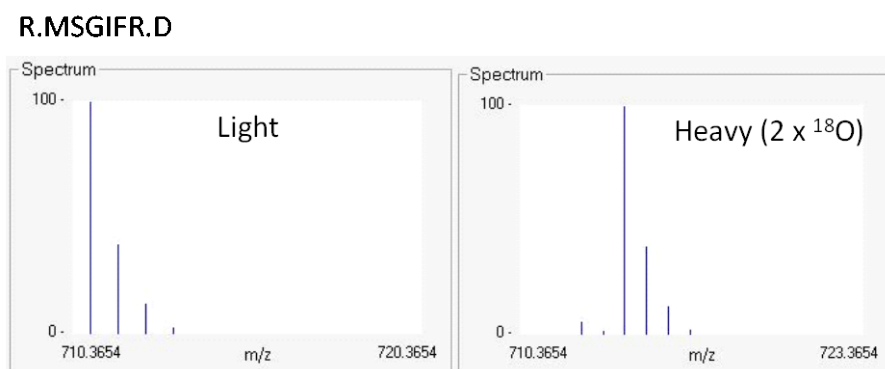


Abbildung 49: Schematische Darstellung der Verschiebung der Masse des Peptides MSGIFR durch den Einbau von zwei schweren Sauerstoffatomen am C-Terminus.

Das Isotopenmuster wurde mit der Software IDCalc berechnet und mit dem gemessenen Isotopenmuster aus dem Mascot Distiller verglichen. Der maximale Markierungsgrad von 97 % mit 2-mal ^{18}O ist im rechten Spektrum zu sehen, da 97% H_2^{18}O verwendet wurde.

5.1.3.3 Markierung der Peptide aus β -Galactosidase mit H_2^{18}O bei pH 8

Um quervernetzte Peptide mittels spezifischer Massenverschiebung während der LC-MS/MS Messung zu suchen, wurde getestet, ob die enzymatische Markierung der C-Termini mit ^{18}O dafür geeignet ist. Ausgangspunkt war das Protein β -Galactosidase, das hierzu in H_2^{18}O bei pH 8 verdaut wurde. Nach der Messung der erzeugten Peptide, wurden die Daten mit dem Mascot Distiller auf den Markierungsgrad hin untersucht. Das angezeigte Isotopenmuster jedes Peptides wurde mit dem Softwaretool IDCalc überprüft und somit der prozentuale Markierungsgrad ermittelt. Da der enzymatische Rücktausch von ^{18}O zu ^{16}O möglich ist, obwohl das restliche Trypsin bei einem niedrigen pH-Wert von 3 inaktiviert wurde, wurden zwei weitere Messungen in 50 % $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ H_2O durchgeführt, um dies zu überprüfen. Nach der Markierung der Proben mit ^{18}O , wurden die Proben für 2, 24 und 72 h in 50 % H_2^{16}O bei pH 3 und 4 °C gelagert und anschließend gemessen. Wie in Abbildung 50 zu sehen ist, wird bei den meisten Peptiden, zum Zeitpunkt 2 h ein Markierungsgrad zwischen 80 und 97 % mit 2-mal ^{18}O am C-Terminus erreicht. Die restlichen sechs Peptide weisen einen Markierungsgrad von 40-80 % mit 2-mal ^{18}O auf. Der mittlere Markierungsgrad aller betrachteten Peptide beträgt 89.5 %. Weiterhin ist zu sehen, dass der Markierungsgrad mit 2-mal ^{18}O am C-Terminus bei allen Peptiden über den Verlauf von 72 h kontinuierlich abnimmt. Der mittlere Rücktausch der gezeigten Peptide beträgt nach 22 h bereits 6.6 %. Nach insgesamt 72 h steigt der mittlere Rücktausch auf 21.4% an.

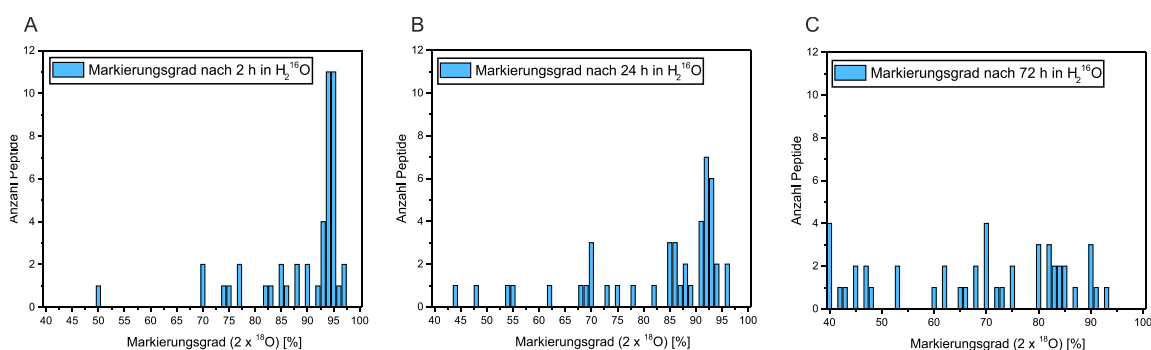


Abbildung 50: **Enzymatische Markierung der C-Termini von tryptischen Peptiden aus β -Galactosidase mit ^{18}O .**

Gezeigt ist der Markierungsgrad der verschiedenen Peptide mit 2-mal ^{18}O am C-Terminus. Der Rücktausch der Markierung, wurde nach der Zugabe von 50 % H_2^{16}O , zu den Zeitpunkten 2 h (A), 24 h (B) und 72 h (C) überprüft. Die Auswertung wurde über das Isotopenmuster im Mascot Distiller und dem Softwaretool IDCalc durchgeführt.

Insgesamt betrachtet konnte gezeigt werden, dass der Einbau von zwei ^{18}O nicht bei allen Peptiden vollständig erfolgt. Während einige Peptide relativ gut markiert wurden, sind

manche Peptide nur zu 50 % markiert. Außerdem wurde bereits gezeigt, dass der Einbau des zweiten ^{18}O bei pH 8 sehr viel langsamer erfolgt (Hajkova et al., 2006). Weiterhin ist zu sehen, dass es im Verlauf von 24 Stunden zu einem starken Rücktausch von ^{18}O in H_2^{16}O kommt, obwohl die Proben angesäuert wurden und Trypsin somit keine Aktivität mehr haben sollte. Selbst nach der vermeintlichen Inaktivierung von Trypsin mit einem niedrigen pH-Wert scheint eine Restaktivität zu verbleiben, die ausreichend ist, um einen stetigen Rücktausch zu katalysieren.

5.1.3.4 Markierung der C-Termini von β -Galactosidase mit ^{18}O bei pH 8 und pH 6

Da die enzymatische Markierung der C-Termini mit ^{18}O bei pH 8 zu keiner vollständigen Markierung geführt hat (siehe Kapitel 5.1.3.3), wurde ein zusätzlicher Markierungsschritt bei pH 6 eingeführt (Loftheim et al., 2010). Die Peptide wurden nach der ersten Markierung ein weiteres Mal bei pH 6 für 2 h markiert und direkt in H_2^{18}O gemessen. Hierzu wurde das flüchtige Ammonium-hydrogencarbonat absublimiert und der zweite Markierungsschritt in Zitronensäurepuffer durchgeführt. Wie in Abbildung 51 zu sehen ist, kann bei den meisten Peptiden eine vollständige Markierung erreicht werden. Ausnahmen sind 2 Peptide, die mit ca. 90 % 2-mal ^{18}O markiert wurden. Bei weiteren 2 Peptiden wurde lediglich eine Markierung von 58 – 67 % mit 2-mal ^{18}O erreicht. Der mittlere Markierungsgrad aller betrachteten Peptide beträgt 95.6 %.

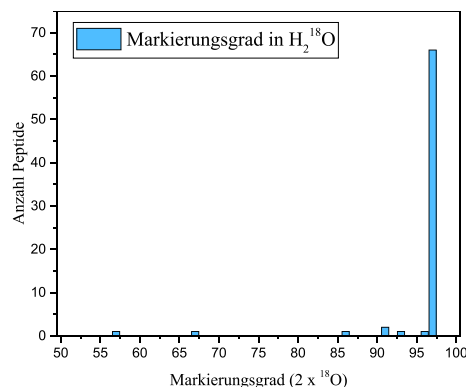


Abbildung 51: **Enzymatische Markierung der C-Termini von tryptischen Peptiden aus β -Galactosidase mit ^{18}O bei pH 8 in ABC Puffer und bei pH 6 in CA Puffer.**

Gezeigt ist der Markierungsgrad aller Peptide mit 2-mal ^{18}O am C-Terminus. Die Auswertung wurde über das Isotopenmuster im Mascot Distiller und dem Softwaretool IDCalC durchgeführt.

Durch die gesteigerte Enzymaktivität bei pH 6 kann somit ein höherer Markierungsgrad erreicht werden (Loftheim et al., 2010).

5.1.3.5 Markierung der C-Termini von β -Galactosidase mit ^{18}O bei pH 8 und pH 6 und Inaktivierung von Trypsin mit Pefabloc

Nachdem der maximale Markierungsgrad für die meisten Peptide mit der 2-fachen Markierung bei pH 8 und pH 6 erreicht werden konnte, wurde im nächsten Schritt versucht, den Rücktausch von ^{18}O in H_2^{16}O zu stoppen. Hierzu wurde der wasserlösliche Serinproteaseinhibitor Pefabloc nach der zweiten Markierung bei pH 6 zugegeben. Dieser Proteaseinhibitor bindet irreversibel an das aktive Zentrum von Trypsin und inaktiviert es dadurch. Überschüssiges Pefabloc und der Zitronensäurepuffer wurde für die MS-Messung mittels StageTips entfernt.

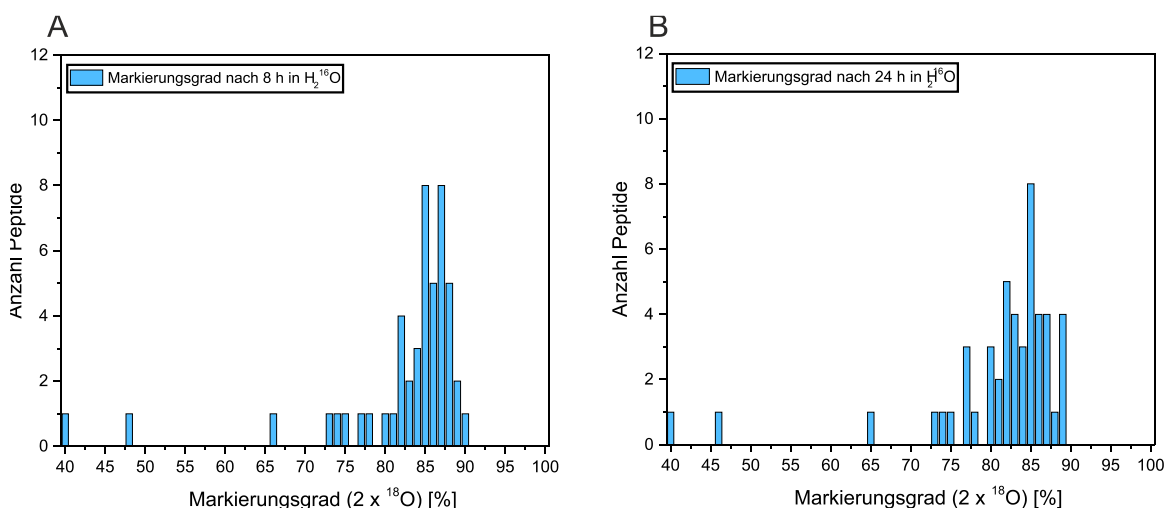


Abbildung 52: **Enzymatische Markierung der C-Termini von tryptischen Peptiden aus β -Galactosidase mit ^{18}O bei pH 8 in ABC Puffer und pH 6 in CA-Puffer mit abschließender Inhibition durch Pefabloc.**

Nach der Markierung wurde das restliche Trypsin durch die Zugabe von Pefabloc inaktiviert. Gezeigt ist der Markierungsgrad aller Peptide mit 2-mal ^{18}O am C-Terminus. Die Auswertung wurde über das Isotopenmuster im Mascot Distiller und dem Softwaretool IDCalC durchgeführt.

Im Vergleich zu Abbildung 50 ist deutlich zu erkennen, dass die Abnahme des Markierungsgrades über die Zeit nur noch in geringem Ausmaße stattfindet (Abbildung 52). Der mittlere Rücktausch der gezeigten Peptide beträgt 1.2 % innerhalb von 16 h. Im Vergleich zu Abbildung 51 beträgt der mittlere Markierungsgrad jedoch nur noch 82.3 %. Außerdem weisen 3 Peptide einen Markierungsgrad zwischen 40 und 65 % auf. Eine vollständige Markierung von über 90 % für alle Peptide, die die Voraussetzung für

weitere Markierungsversuche gewesen wäre, konnte nicht erreicht werden (Abbildung 52).

Aufgrund der nicht erreichten vollständigen Markierung aller Peptide mit 2-mal ^{18}O , konnte die Methode nicht auf das Quervernetzen von Proteinen angewendet werden. Gründe hierfür könnten die zahlreichen Arbeitsschritte sein, die jeweils eine potentielle Fehlerquelle für die Markierung darstellen. Die Probe, die durch die Lyophilie getrocknet wurde, kann vermehrt H_2^{16}O aus der Luftfeuchtigkeit aufnehmen, was zu einem Rücktausch führt. Außerdem führen viele Arbeitsschritte mit verschiedenen Probengefäßen zu einem Probenverlust, der sich aufgrund der geringen Abundanz der quervernetzten Peptide negativ auf die Ergebnisse auswirkt.

Eine mögliche Alternative ist die Markierung der N-Termini von quervernetzten Peptiden mit jeweils zwei Methylgruppen (Boersema et al., 2009). Durch diese reduktive Dimethylierung kann auch eine Massenverschiebung erzeugt werden, wenn ein Teil der Probe mit ^{13}C Formaldehyd reagiert. Bei quervernetzten Peptiden mit zwei N-Termini würde somit eine spezifische Verschiebung von 4 Da entstehen. Dieser Abstand wäre zwar kleiner als beim ^{18}O -Labeling mit 8 Da, was bei längeren Peptiden zu Überlappungen der Isotopenmuster führen kann, jedoch würde man das Problem des Rücktausches umgehen.

5.1.3.6 Vergleich der Peptide mit einem niedrigen Markierungsgrad

Um die Ursache für den niedrigen Markierungsgrad mancher Peptide herauszufinden, wurden alle Peptide, aus den drei Versuchen mit einem Markierungsgrad kleiner als 75 % genauer untersucht (Tabelle 11). Hierbei sind besonders die Aminosäuren interessant, die sich nach der C-terminalen Spaltstelle befinden. Befindet sich die Aminosäure Prolin direkt nach der Spaltstelle, wird das Protein dort nicht gespalten (Olsen et al., 2004). Anhand von Tabelle 11 ist zu sehen, dass sich kein Prolin direkt nach den Schnittstellen befindet, jedoch ist bei fünf von acht Peptiden die hydrophobe Aminosäure Valin oder Leucin C-terminal an der Schnittstelle. Es konnte in einer anderen Veröffentlichung gezeigt werden, dass Trypsin an der Spaltstellen Arginin-Leucin deutlich langsamer spaltet als bei anderen Spaltstellen (Pace and Barrett, 1984). Direkt vergleichen kann man die Ergebnisse zwar nicht, da bei Barrett et al. 2014 das gefaltete Protein verwendet

wurde und in dieser Arbeit das denaturierte Protein im Gel verdaut wurde. Diese Theorie würde auch zu der schlechten Markierung der Peptide mit Valin an der Schnittstelle passen, da sich die Seitenkette von Valin nur um eine CH₂-Einheit von Leucin unterscheidet.

Die drei anderen schlecht markierten Peptide haben eine geladene basische oder saure Aminosäure direkt an der Schnittstelle (Asparaginsäure, Arginin, Lysin). Die eingeschränkte Effizienz von Trypsin an Spaltstellen direkt gefolgt mit geladenen Aminosäuren konnte bereits gezeigt werden (Glatter et al., 2012; Thiede et al., 2000). Insgesamt betrachtet lässt sich die unvollständige Markierung mancher Peptide mit ¹⁸O durch die angrenzenden C-terminalen Aminosäuren erklären (Tabelle 11).

Tabelle 11: Liste der Peptide aus allen drei Markierungsversuchen, die einen Markierungsgrad unter 70 % aufweisen.

Die Peptide sind fett markiert und die Spaltstellen mit einem Punkt gekennzeichnet. Links und rechts von der Spaltstelle wurden jeweils die nächsten drei Aminosäuren aufgelistet. Hydrophobe Aminosäuren direkt nach der C-terminalen Spaltstelle sind mit rot markiert.

Markierungsart	Peptidsequenz	Markierungsgrad [%]
¹⁸ O bei pH8	DPR.WLPAMSER.VTR	50
¹⁸ O bei pH8	TMITDSLAVVLQR.RDW	70
¹⁸ O bei pH8	WIK.SVDPSRPVQYEGGGADTTATDIICPMYAR.VDE	70
¹⁸ O bei pH8 und pH6	FNR.QSGFLSQMWIGDK.KQL	57
¹⁸ O bei pH8 und pH6	AER.VNWLGLGPQENYPDR.LTA	67
¹⁸ O bei pH8 und pH6 + Pefabloc	TLR.LNVENPK.LWS	48
¹⁸ O bei pH8 und pH6 + Pefabloc	DKK.QLLTPLR.DQF	66
¹⁸ O bei pH8 und pH6 + Pefabloc	AER.VNWLGLGPQENYPDR.LTA	40

5.1.3.7 Fazit zur enzymatischen Markierung von Peptiden mit ^{18}O am C-Terminus

Die spezifische Markierung von quervernetzten Peptiden am C-Terminus bietet in der Theorie eine elegante Lösung, um diese niedrigabundanten Spezies direkt während der MS-Messung gezielt zu suchen. In der Praxis scheitert dieser Ansatz jedoch an zwei Limitationen. Zum einen konnte insgesamt keine vollständige Markierung erreicht werden, da der Rücktausch von ^{18}O mit ^{16}O aus der Luftfeuchtigkeit stattfindet. Zum anderen hat die Aminosäuresequenz, die sich nach der Schnittstelle befindet, einen entscheidenden Einfluss auf die Markierungseffizienz. Da in einer komplexen Proteinmischung eine Vielzahl von verschiedenen potentiellen Schnittstellen vorliegen, die auch geladene oder hydrophobe Aminosäuren an der Spaltstelle haben, wird die Markierung mit ^{18}O nie für alle Peptide vollständig ausfallen. Somit ist die Markierungsstrategie eher ungeeignet, um sie für die Identifizierung von quervernetzten Peptiden verwenden zu können.

5.1.4 Identifizierung von quervernetzten Proteinen über SDS-PAGE Profile

Aufgrund der beschriebenen Probleme, die bei der Analyse von XL-Peptiden auftreten, wurde eine Strategie entwickelt, bei der die Identifizierung der quervernetzten Peptide nicht notwendig ist. Dieser neue Ansatz basiert darauf, dass durch das Quervernetzen Proteinaggregate entstehen, die nach der SDS-PAGE im oberen Gelbereich zu sehen sind. Somit sind also auch kleinere Proteine mit einer Größe von z.B. 20 kDa im Gel an der Stelle wo normalerweise Proteine mit 160 kDa zu finden sind. Eine ähnliche Strategie wurde bereits verwendet, um neue Proteininteraktionen innerhalb von Proteinkomplexen zu identifizieren (Heide et al., 2012). Hierbei wurden zwar keine Crosslinker verwendet, dafür aber native Gele ohne Detergens, wodurch Proteininteraktionen während der PAGE bestehen bleiben. Interagiert ein Protein mit einem Komplex, wandert der gesamte Komplex weniger weit im Gel.

Diese indirekte Methode zum Nachweis von quervernetzten Proteinen ermöglicht es zudem, Crosslinker wie Glutaraldehyd zu verwenden, die eine nicht definierte Modifikation innerhalb der Proteine erzeugen. Die Identifizierung und Quantifizierung wird über unmodifizierte Peptide der Proteine erreicht. Die genaue Stelle der Interaktion

kann dadurch nicht bestimmt werden, was beim Topology Mapping aber auch nicht zwingend notwendig ist. Außerdem ist Glutaraldehyd im Vergleich zu Formaldehyd und BS3 reaktiver, wodurch die Möglichkeit besteht, das Proteinlysate innerhalb von 5 min zu vernetzen und damit auch transiente Interaktionspartner zu identifizieren. Außerdem besitzt es keinen langen Linker, wodurch die Anzahl an potentiellen Quervernetzungen etwas eingeschränkt wird. Somit sollte es zu einer schnellen und spezifischen Quervernetzung von Proteinen kommen.

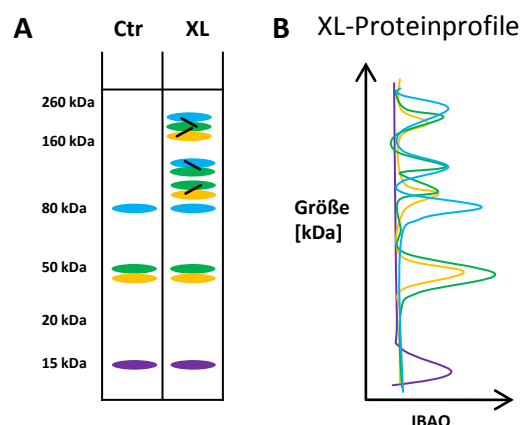


Abbildung 53: **Schematische Darstellung der Auftrennung von Proteinen und quervernetzten Proteinen im Gel und daraus resultierende Intensitätsprofile.**

(A) Schematischer Vergleich von Proteinen, die durch eine Co-IP angereichert wurden und Proteinen die nach der Co-IP zusätzlich quervernetzt wurden. Durch das Quervernetzen kommt es im oberen Gelbereich, im Vergleich zur Kontrolle, zu zusätzlichen Proteinbanden.

(B) Durch die Überlagerung der Intensitätsprofile von allen Proteinen, können Rückschlüsse auf deren Quervernetzung gezogen werden, ohne dass quervernetzte Peptide detektiert werden müssen. Hierzu werden die Proteingrößen gegen die normalisierten Intensitäten in der Form des iBAQ-Wertes aufgetragen.

5.1.4.1 Quervernetzen des Mediator Komplexes auf magnetischen Beads mit Glutaraldehyd

Das Ziel dieses Experimentes war es, das Quervernetzen des Mediator Komplexes und dessen Interaktionspartner mit Glutaraldehyd zu etablieren. Als einfaches Readout wurde die Immunodetektion via Western Blot gewählt.

Um große Mengen an Mediator Komplex zu erhalten, wurden Hefezellen bis zu einer OD von 20 wachsen gelassen. Die Zellen wurden wie in Kapitel 4.5.1.2 und 4.5.1.4 beschrieben geerntet und aufgeschlossen. Anschließend wurde der Mediator Komplex, über die mit 6-mal HA-Peptid markierte Untereinheit Med2, co-immunpräzipitiert (Kapitel 4.5.1.6). Gebundene Proteine wurden von den Beads eluiert, mit SDS-PAGE

aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran übertragen und mittels anti-HA Immundetektion analysiert (Kapitel 4.5.1.10). Die Kontrollspur weist eine intensive Bande auf der Höhe von 70 kDa auf. Hierbei handelt es sich um die markierte Untereinheit Med2-HA mit 54.2 kDa (Abbildung 54). Im Bereich von 50 kDa ist eine weitere Bande mit schwächerer Intensität zu sehen. Diese Bande ist das FC-Fragment, das sich während der Elution von den HA- Beads gelöst hat und vom zweiten Antikörper erkannt wird. In diesem Versuchsansatz wurden, parallel zur Kontrolle, acht verschiedene Konzentrationen an Glutaraldehyd verwendet und damit die angereicherten Proteine auf den Beads quervernetzt. Ab einer Konzentration von 0.05 % Glutaraldehyd (GA) ist eine deutliche Bande auf der Höhe von 200 kDa zu sehen, die mit zunehmender Konzentration an GA wieder nachlässt. Mit welchem Protein die Quervernetzung erzeugt wurde, kann aus den Daten nicht bestimmt werden, da nur das Signal von Med2HA sichtbar ist.

Die weitere Abnahme des Med2HA-Signals, bei Konzentrationen von 0.25% bis 2% GA lässt sich mit einem großen Verlust an Gesamtprotein erklären. Mit Formaldehyd liegt der Verlust an Gesamtprotein bei der Verwendung von 1 % für 30 min bei 90 % (Sutherland et al., 2008). Zudem sind im Gelbereich von 70 kDa bis zur Geltasche leicht angeschwärmte Bereiche zu sehen. Insgesamt betrachtet nimmt die Intensität von Med2-HA mit zunehmender Menge an GA ab. Proteine in der Geltasche sind ebenfalls Proteinaggregate, die zu groß sind um in Acrylamidgel einzudringen.

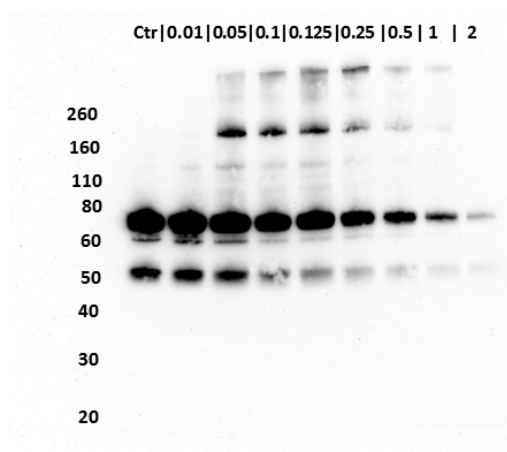


Abbildung 54: **Western Blot Analyse von Med2-HA, das zuvor mit magnetischen anti-HA Beads aus einem Hefe Zellysat angereichert wurde.**

Nach der Anreicherung wurden die Proteine auf den Beads mit 0.01, 0.05, 0.1, 0.125, 0.25 0.5, 1 und 2 % Glutaraldehyd für 5 min auf Eis quervernetzt, mit SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran übertragen. Mittels anti-HA Immundetektion wurden Med2-HA sichtbar gemacht. Im Vergleich zur Kontrolle ist auf der Höhe von 180 kDa bei den verschiedenen GA-Konzentrationen (außer bei 2 %) eine zusätzliche Crosslinkbande zu sehen.

5.1.4.2 XL Profile von Med2-HA und Med18-HA mit Glutaraldehyd

Nachdem das erfolgreiche Quervernetzen des Mediator Komplexes auf den magnetischen Beads per Western Blot gezeigt werden konnte (Kapitel 5.1.4.1), wurde die Menge an Beads und Protein verfünffacht (50 μ L Beads, 10 mg Proteininput), um in einer MS-Messung Interaktionsinformationen über die Untereinheiten des Mediator Komplexes zu erhalten. Die angereicherten Proteine wurden auf den Beads mit GA quervernetzt, gewaschen, eluiert, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie angefärbt. Die kompletten Proteinspuren wurden in 15-30 Banden geschnitten und die Proteine mittels bottom-up Proteomics workflow identifiziert und quantifiziert. Als quantitativer Wert wurde hierbei der iBAQ verwendet (Schwanhäusser et al., 2011). Bei dieser intensitätsbasierten absoluten Quantifizierung werden die aufsummierten Peptidintensitäten für jedes Protein durch die Anzahl der theoretisch möglichen Peptide nach dem Verdau geteilt. Durch diese Normalisierung bleibt der iBAQ, im Vergleich zu den aufsummierten Peptidintensitäten, von der Proteingröße unbeeinflusst.

Die verwendeten Kontrollen zeigen die Auftrennung der verschiedenen Untereinheiten des Mediator Komplexes nach der SDS-PAGE (Abbildung 55A, Abbildung 56A). In beiden Kontrollen ist deutlich zu sehen, dass jedes Protein in einem Bereich von 10 kDa oder mehr auf dem Gel zu detektieren ist. Die Größe der Mediatoruntereinheiten korreliert deutlich mit der Größeninformation des Proteinmarkers (Novex), wobei kleinere Abweichungen von 5 kDa zu beobachten sind (Abbildung 55 Med3, Med17). Im Vergleich zur Kontrolle wurden die Beads bei den XL-Ansätzen mit 0.1 % GA für 5 min auf Eis quervernetzt und restliches GA mit Trispuffer zum Abreagieren gebracht. In den beiden XL-Profilen von Abbildung 55B und Abbildung 56B ist deutlich zu sehen, dass zusätzliche Intensitätsmaxima im Vergleich zu Kontrolle vorhanden sind.

Bei der Co-IP und dem Quervernetzen von Med2-HA sind auf der Höhe von 250 – 350 kDa zusätzliche Intensitätsmaxima der Mediatoruntereinheiten Med5, Med15, Med16 und Med14 zu sehen, die in der Kontrolle fehlen. Da die Größen der einzelnen Untereinheiten von 111 bis 129 kDa reichen, müssen mindestens jeweils zwei der Proteine miteinander vernetzt worden sein, um sich nach der Elektrophorese im Gelbereich von 250 – 350 kDa zu befinden (Abbildung 55). Weiterhin handelt es sich bei allen gefunden Proteinen um Untereinheiten des Tail-Moduls. In Übereinstimmung mit dem aktuellen Modell des

Mediatorkomplexes (Abbildung 36) könnten jeweils die Untereinheiten Med5 mit Med16 und Med14 mit Med15 miteinander vernetzt worden sein. Durch den indirekten Nachweis über das Gelprofil kann der entscheidende Beweis, durch die Identifizierung der quervernetzten Peptide, jedoch nicht erbracht werden.

Zur weiteren Validierung der Funktionalität der Gelprofile, in Kombination mit der Quervernetzung mit Glutaraldehyd, wurden über die Untereinheit Med18HA Proteine aus einem Hefelysats angereichert, aufgetrennt und gemessen (Abbildung 56). Hierbei wurden zusätzliche Intensitätsmaxima im Vergleich zur Kontrolle erzeugt. Der erste Bereich befindet sich bei 34-39 kDa, indem die beiden Untereinheiten Med11 (15 kDa) und Med22 (14 kDa) miteinander vernetzt wurden. Betrachtet man das aktuelle Modell des Mediatorkomplexes fällt auf, dass Med 11 und Med 22 direkt nebeneinander liegen (Abbildung 36, Head Module). Die Quervernetzung ist somit wahrscheinlich (Imasaki et al., 2011), konnte aber nicht durch bereits publizierte Crosslinkdaten bestätigt werden.

Weiterhin sind im Gelbereich von 180 – 270 kDa die Untereinheiten Med11 (15 kDa), Med17 (78.5 kDa), Med18 (34.3 kDa), Med20 (22.9 kDa) und Med22 (13.9 kDa) zu finden. Da die Größen der einzelnen Untereinheiten zu klein ausfallen, um sich nach der Elektrophorese in diesem Gelbereich zu befinden, müssen die Proteine miteinander vernetzt worden sein. Diese Ergebnisse passen ebenfalls zum aktuellen Modell, da Med 17 und Med 18 in der Nähe von Med 11 und Med 22 liegen (Tsai et al., 2014). Addiert man deren Massen (Med 11 (15.1 kDa), Med 17 (78.5 kDa), Med 18 (34.3 kDa) und Med22 (13.9 kDa)) kommt man jedoch nur auf 135 kDa. Es muss also noch ein weiteres interagierendes Protein quervernetzt worden sein.

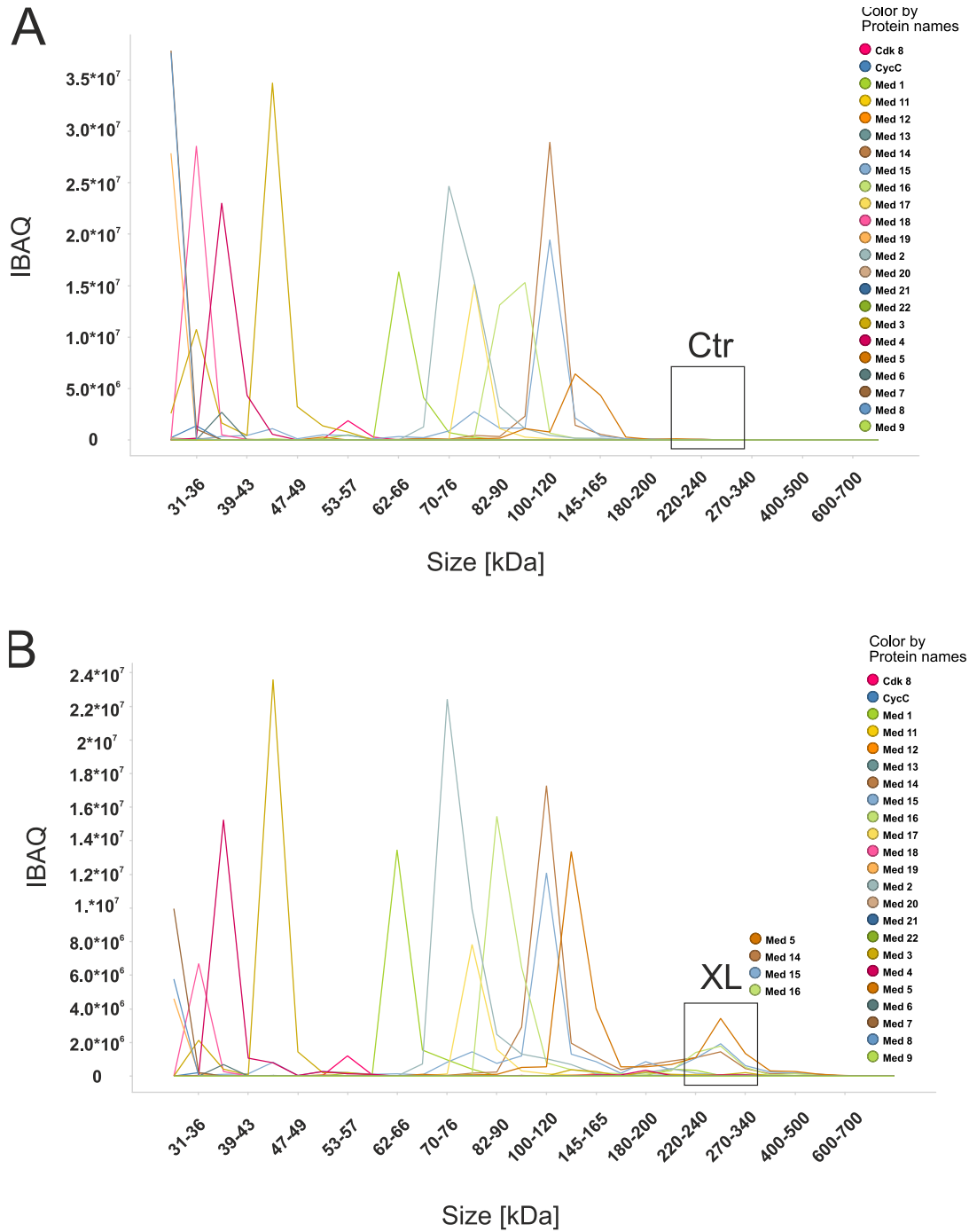


Abbildung 55: **Intensitätsprofile der verschiedenen Untereinheiten des Mediatorkomplexes.**

Die Proteine wurden mit magnetischen anti-HA Beads über Med2-HA co-immunpräzipitiert und über ein Tris-Acetat Gel aufgetrennt. Die Intensitäten, der gemessenen Proteine wurden in Form des iBAQ-Wertes gegen die jeweiligen Gelbanden aufgetragen. A) Intensitätsprofile der Mediatoruntereinheiten, die mit den anti-HA Beads angereichert wurden. B) Intensitätsprofile der Mediatoruntereinheiten, die mit den anti-HA Beads angereichert wurden und auf den Beads zusätzlich mit 0.1 % Glutaraldehyd quervernetzt wurden.

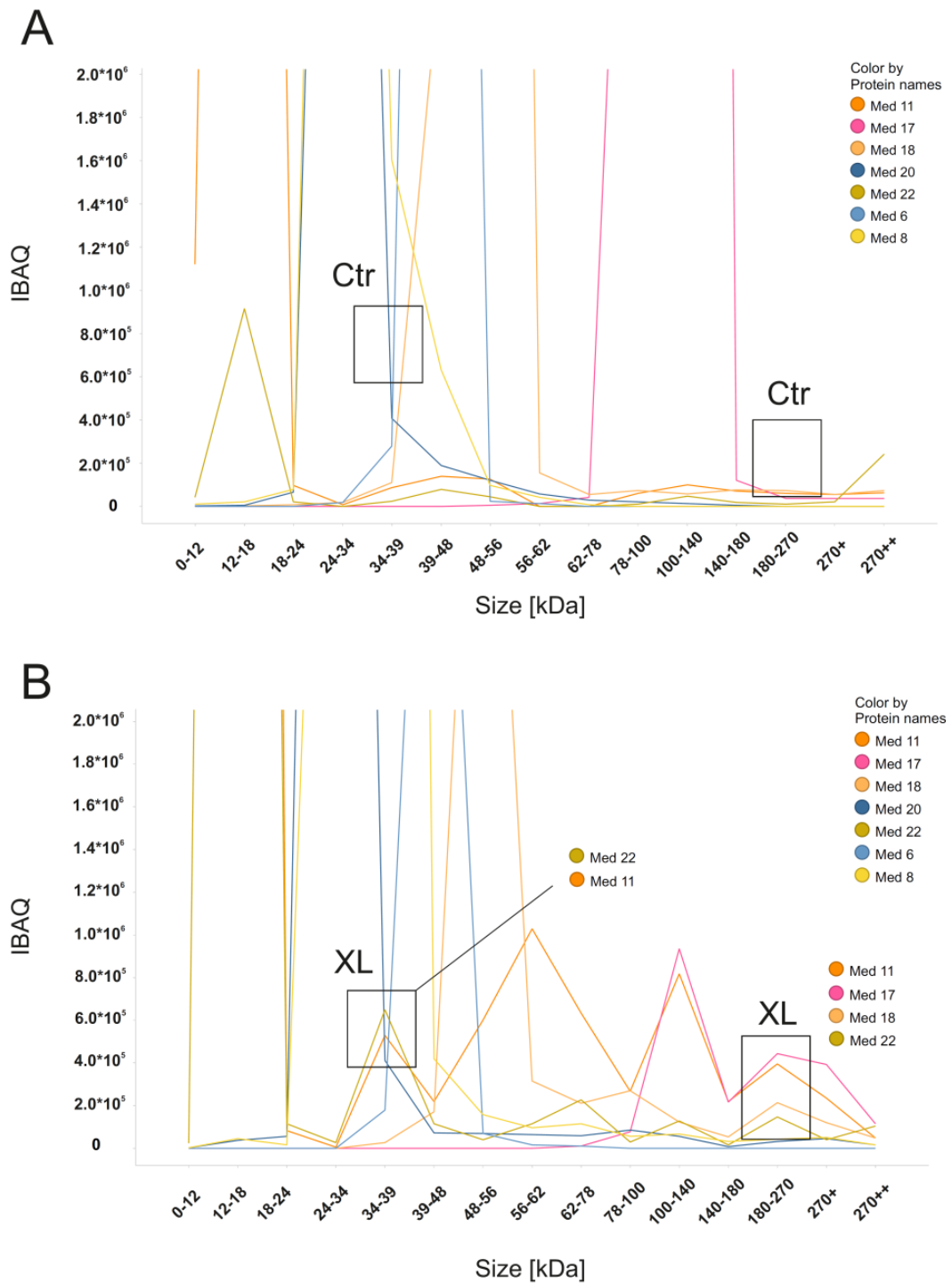


Abbildung 56: **Intensitätsprofil des Head-Moduls des Mediatorkomplexes.**

Die Proteine wurden mit magnetischen anti-HA Beads über Med18-HA co-immunpräzipitiert und über ein Bis-Tris Gel aufgetrennt. Die Intensitäten, der gemessenen Proteine wurden in Form des iBAQ-Wertes gegen die jeweiligen Gelbanden aufgetragen. A) Intensitätsprofile der Mediatoruntereinheiten, die mit den anti-HA Beads angereichert wurden und auf den Beads zusätzlich mit 0.1 % Glutaraldehyd quervernetzt wurden. B) Intensitätsprofile der Mediatoruntereinheiten, die mit den anti-HA Beads angereichert wurden.

5.1.4.3 Fazit zur Identifizierung von quervernetzten Proteinen über SDS-PAGE Profile

Insgesamt betrachtet ist die Auswertung von Quervernetzungsversuchen mittels Gelprofil eine einfache Alternative im Vergleich zur aufwendigeren direkten Identifizierung von zwei quervernetzten Peptiden. Bleibt die Anzahl der Proteine auf etwa 20 begrenzt und liegt bereits eine konkrete Vermutung vor, kann dies als einfacher Beweis herangezogen werden. Der eigentliche limitierende Faktor ist die Trennleistung des Acrylamidgels. Befinden sich z.B. 100 Proteine in einer Gelbande kann nicht mehr eindeutig nachvollzogen werden, welche Proteine miteinander quervernetzt wurden. Eine bessere Auftrennung der Proteine könnte mittels Fraktionierung mit einer RP-Säule mittels HPLC erreicht werden. Hierbei kann ein langer Elutionsgradient gewählt werden, um die Auftrennung zu maximieren.

5.2 Massenspektrometrie-basierte Identifizierung von Drug-tragets

Wie in Kapitel 3.2 beschrieben, gibt es verschiedene Möglichkeiten, um die Interaktionen von Proteinen mit niedermolekularen Substanzen zu untersuchen. In dieser Arbeit wurde ein Ansatz gewählt, in dem die niedermolekularen Verbindungen an magnetische Beads immobilisiert werden, um damit die zellulären Zielproteine aus einem frisch aufgeschlossenen Zelllysat anzureichern (Abbildung 57). Diese Versuche sind mit Co-IP Experimenten vergleichbar und zielen darauf ab, die Zielproteine aus einem *in-vivo* ähnlichen Zustand zu isolieren. An die Beads gebundene Proteine wurden unter denaturierenden Bedingungen eluiert und mittels LC-MS/MS identifiziert. Um unspezifische Bindungen von Proteinen an die Beads von spezifischen Bindungen an den Inhibitor zu unterscheiden, wurde eine Beadkontrolle verwendet und quantitativ verglichen.

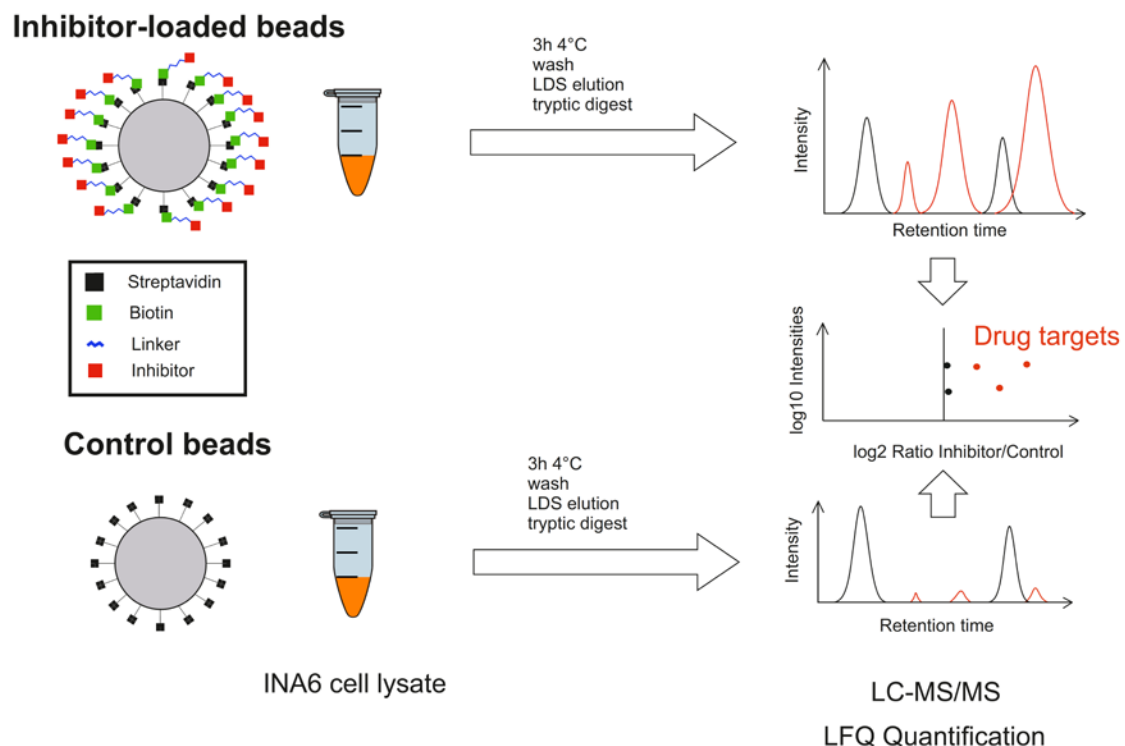


Abbildung 57: Schematische Darstellung des Workflows zur Anreicherung von Zielproteinen mittels Affinitätsaufreinigung.

Zunächst wurden die Streptavidin Beads mit biotinyliertem Inhibitor gesättigt. Als Kontrolle wurden unbeladene Streptavidin Beads verwendet. Beide Proben wurden parallel mit INA 6 Zelllysat inkubiert, gewaschen und die gebundenen Proteine mit LDS eluiert. Nach der Messung mittels LC-MS/MS wurden spezifisch und unspezifisch angereicherte Proteine mittels Label Free Quantifizierung voneinander unterschieden (Quelle: (Bach et al., 2017)).

5.2.1 Überprüfung von unspezifischen Proteinbindungen an den Linker

Die verwendete Strategie (Abbildung 57), um zwischen Proteinen zu unterscheiden, die spezifisch an den Inhibitor binden und Proteinen, die unspezifisch an die Beads binden, weist noch eine weitere Bindemöglichkeit von Proteinen auf. Proteine könnten spezifisch an den Linker, zwischen Biotin und Inhibitor, binden und somit falsch positive Treffer erzeugen. Um diese Bindemöglichkeit zu überprüfen, wurde die Substanz AH441 von Dr. Anna Lehmann (AG Holzgrabe) synthetisiert, die lediglich den Linker und das Biotin für die Immobilisierung aufweist (Abbildung 58).

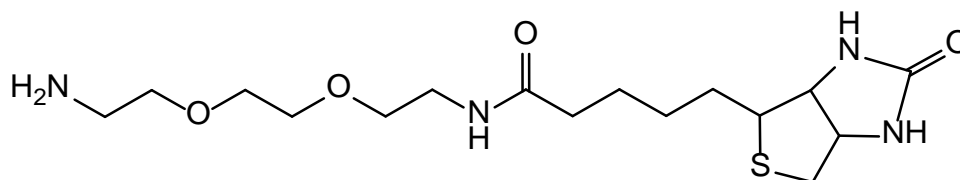


Abbildung 58: Strukturformel des biotinylierten Linkers (AH441), der auf magnetischen Beads immobilisiert und als Linkerkontrolle verwendet wurde.

Mit dieser Kontrolle wurde überprüft, ob Proteine unspezifisch an den Linker binden und somit eine mögliche Fehlerquelle für die folgenden Experimente mit den biotinylierten Inhibitoren darstellen.

Im folgenden Versuch wurden die Proteine identifiziert und quantifiziert, die zum einen an die Beadkontrolle und zum anderen an die Linkerkontrolle gebunden haben. Hierzu wurden beide Proben mit INA6 Zelllysat inkubiert und die angereicherten Proteine nach mehreren Waschschritten eluiert. Nach der Messung der Proben mittels LC-MS/MS wurden die Proteinverhältnisse von Beadkontrolle und Linkerkontrolle gebildet und gegen die Proteinintensitäten aufgetragen (Abbildung 59). Die meisten Proteine, die identifiziert wurden, zeigen ein Verhältnis im Bereich von $\log_2 -2$ und $\log_2 2$. Sie sind weder mit der Beadkontrolle noch mit den Linkerbeads spezifisch angereichert (offene Datenpunkte). Im Bereich von $\log_2 -14$ bis $\log_2 -7$ sind 7 Proteine spezifisch mit der Beadkontrolle angereichert. Hierbei handelt es sich um Carboxylasen, die Biotin als prosthetische Gruppe aufweisen (Tong, 2013). Das Biotin der Carboxylasen bindet an die Streptavidinbeads (Kontrollbeads) aber nicht an die Beads mit der Linkerkontrolle, da hier das Biotin der Linkerkontrolle bereits an Streptavidin gebunden hat. Weiterhin wurde auch ein mitochondriales Protein angereichert, das ein potentieller Interaktionspartner einer Carboxylase ist und somit indirekt durch die Bindung an die Carboxylasen mit

angereichert wurde. Mit der verwendeten Linkerkontrolle sind keine Proteine spezifisch angereichert worden. Falls es zur Anreicherung gekommen wäre, wären diese im Bereich ab $\log_2 2$ und mehr in Abbildung 59 zu sehen. Der verwendete PEG-Linker AH441 ist somit gut geeignet, um ihn für Anreicherungsversuche zu verwenden. Dieses Ergebnis passt zu bereits veröffentlichten Daten, in denen ebenfalls hydrophile Linker verwendet wurden (Shiyama et al., 2004).

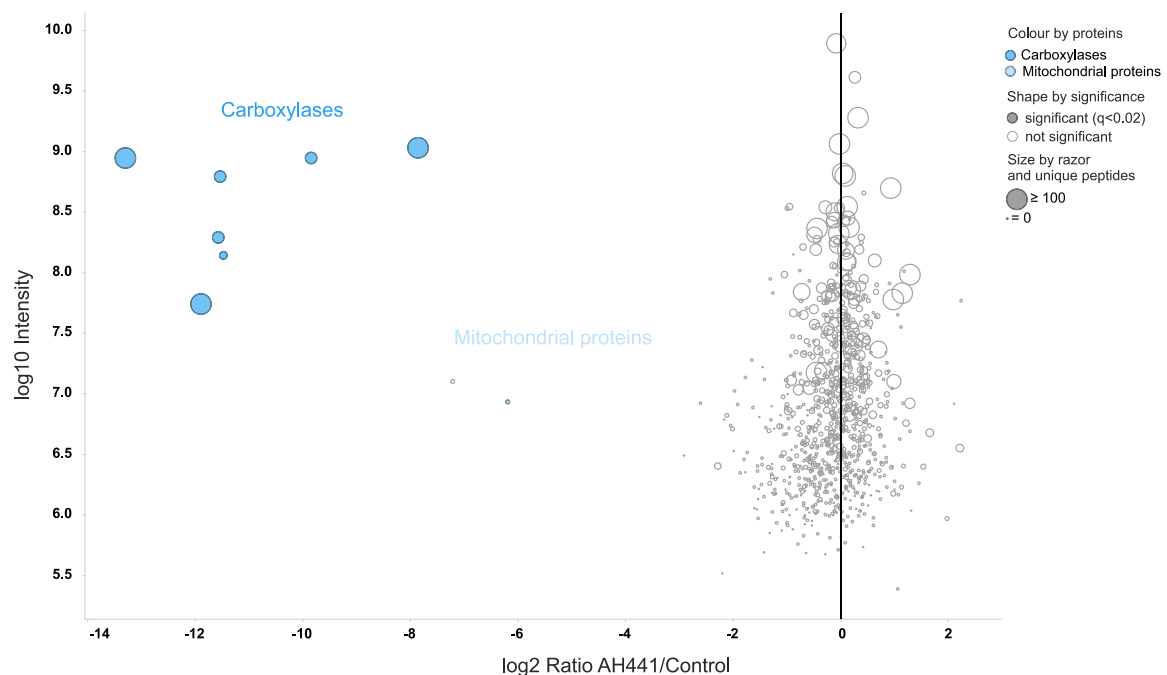


Abbildung 59 Identifizierung von Proteinen, die mit der Linkerkontrolle oder der Beadkontrolle aus einem INA6 Zelllysate angereichert wurden.

Proteine, die im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle signifikant (Benjamini-Hochberg adjusted limma p-value < 0.02) angereichert wurden, sind als geschlossene Kreise markiert. Proteinverhältnisse und -intensitäten sind Medianwerte von 3 biologischen Replikaten (n Replikate > 1). Die Größe der Kreise korreliert mit der Anzahl der identifizierten Peptide (razor and unique). Proteine von demselben Komplex, der gleichen Familie oder derselben Funktion sind mit derselben Farbe markiert. Mit der Beadkontrolle wurden speziell Carboxylasen angereicht, da diese Biotin als prosthetische Gruppe enthalten.

5.2.2 Identifizierung potentieller Targets von α -acyl Aminocarboxamiden

Das Multiple Myelom (MM) ist eine Krebserkrankung, bei der die antikörperbildenden Plasmazellen betroffen sind. Die Entartung der Zellen geschieht dadurch, dass ein Onkogen unter die Kontrolle eines Immunglobulin-Enhancer kommt (Gonzalez et al., 2007). Dies führt zur Produktion von fehlerhaften Antikörpern, Tumorwachstum und der Zerstörung des Knochenmarks. Aufgrund fehlender effektiver Therapien liegt die mittlere

Überlebensrate der Patienten bei 5 bis 10 Jahren (Brenner et al., 2008). Es besteht somit ein großer Bedarf an neuen Therapien, um die Überlebensdauer der Patienten zu verbessern.

Ein möglicher Ansatzpunkt ist die Hitzestressantwort (HSR), die einen wichtigen Schutzmechanismus in Zellen darstellt (Lindquist, 1986). Im normalen Zustand ist der Hitzeschocktranskriptionsfaktor (HSF1) an das Chaperon HSP90 gebunden (Abbildung 60). Bei einer zellulären Stresssituation steigt die Anzahl an ungefalteten Proteinen, die an HSP90 binden und gefaltet werden müssen. HSF1 löst sich darauf von HSP90, trimerisiert, wandert in den Zellkern und wird dort phosphoryliert (Powers and Workman, 2007). In diesem aktiven Zustand bindet HSF1 an die DNA und initiiert die Transkription von Hitzeschockproteinen wie HSP72 (Kim et al., 1999). Ein Angriffspunkt für eine mögliche Therapie ist das Chaperon HSP90, da es in MM-Zellen überexprimiert wird und Proteine faltet, die wichtig für onkogene Signalwege sind (Calderwood et al., 2006). Erste Versuche mit HSP90-Inhibitoren hatten jedoch den Effekt, dass die HSR ausgelöst wurde und HSF1 die Produktion von anderen HSPs wie HSP72 initiiert hat, die die Rolle von HSP90 übernommen haben (Abbildung 60B, (de Billy et al., 2009), (Shah et al., 2015)).

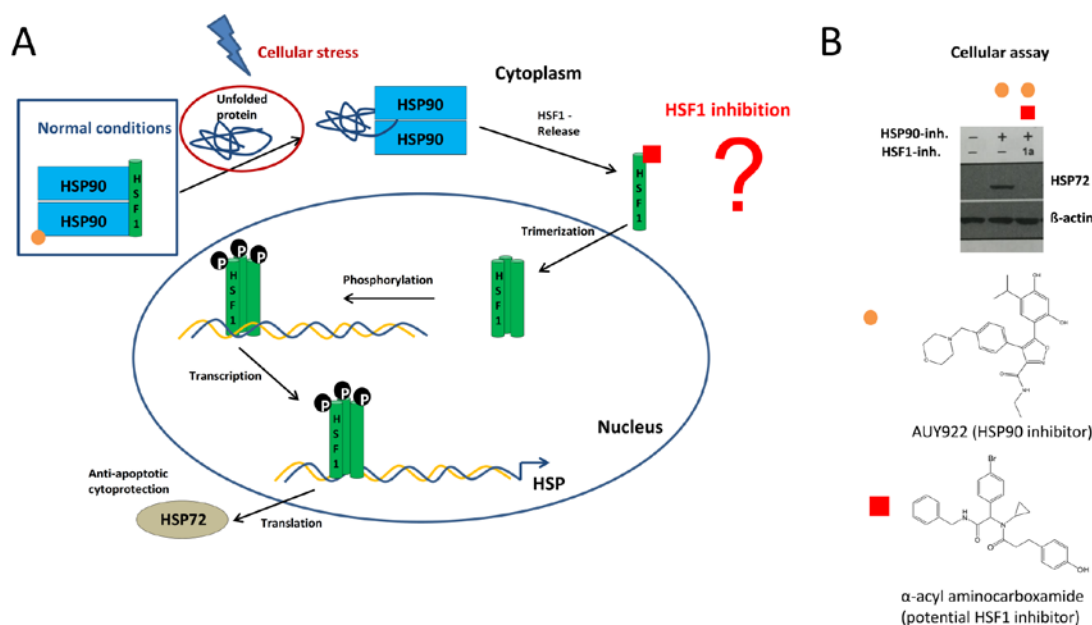


Abbildung 60: Die Hitzestressantwort und potentielle Inhibitoren dafür.

A) Schematische Darstellung der Hitzestressantwort und der daran beteiligten Proteine (Modifiziert nach Powers 2007 und de Billy 2009). (B) Western Blot Ergebnisse der Menge an HSP72 ohne Behandlung (-/-), mit HSP90 Inhibition (+/-) und einer Kombination aus HSP90- und potentieller HSF1-Inhibition durch α -acyl Aminocarboxamide (Quelle CRU216 Antrag für die 2te Förderungsperiode).

Um die Inhibition der HSR über HSP90 zu erreichen, wird somit ein weiterer Ansatzpunkt benötigt, um die HSR komplett auszuschalten. Werden MM-Zellen zusätzlich mit α -acyl Aminocarboxamiden behandelt, führt dies zu einer reduzierten Bildung von HSP72 und letztendlich zum Zelltod (Abbildung 60B). Aufgrund struktureller Ähnlichkeiten zu bekannten potentiellen HSF1-Inhibitoren wurde zunächst angenommen, dass dieser Effekt auf der Inhibition von HSF1 beruht. Mit biotinylierten Derivaten der α -acyl Aminocarboxamide, anschließender Affinitätsaufreinigungen und Massenspektrometrie wurde nun überprüft, was die zellulären Zielstrukturen sind.

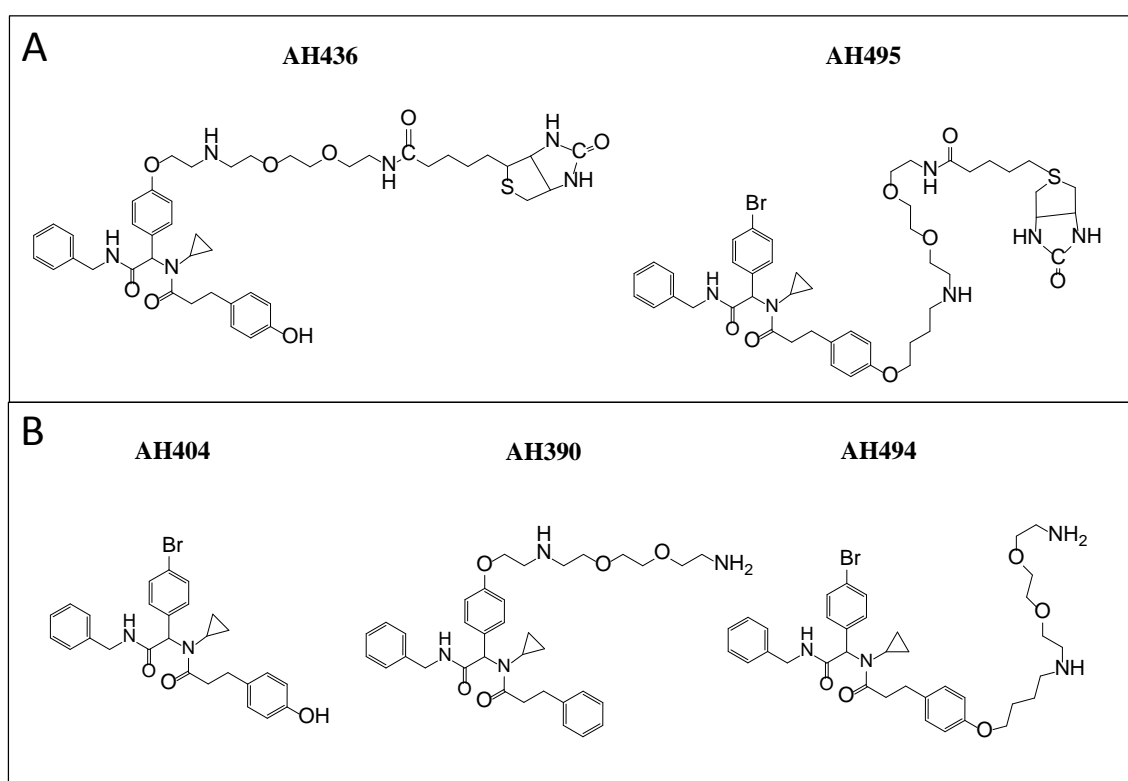


Abbildung 61: **Strukturformeln verschiedener α -acyl Aminocarboxamide.**

A) Biotinylierte α -acyl Aminocarboxamide, die für die Immobilisierung auf magnetische Beads verwendet wurden. . Alle biotinylierten Substanzen zeigten keine oder nur eine geringe Wirkung auf INA6 Zellen. Aufgrund des Biotins könnte die Membrangängigkeit der Substanzen nicht mehr oder eingeschränkt möglich sein und somit bleibt die Wirkung innerhalb der Zelle aus.

B) Die Ausgangssubstanzen AH404, AH390 und AH494 zeigten im Zelltodassay mit INA6 Zellen eine hohe Aktivität. Alle biotinylierten Substanzen zeigten keine oder nur eine geringe Wirkung auf INA6 Zellen.

Nachdem der Machbarkeitsnachweis der verwendeten Strategie aus Abbildung 57 gezeigt werden konnte und die mögliche Fehlerquelle durch Proteinbindungen an den verwendeten Linker ausgeschlossen werden konnte, wurden verschiedene Spezies von α -acyl Aminocarboxamiden über einen Linker mit Biotin markiert. Alle verwendeten α -acyl Aminocarboxamide wurden von Dr. Anna Lehmann (AG Holzgrabe) synthetisiert (Abbildung 61). Die Ausgangssubstanz AH404 und die beiden Moleküle mit Linker (AH390 und AH 495) wurden im Zelltoassay mit INA6 Zellen positiv getestet. Die biotinylierten Substanzen AH436 und AH495 zeigten keinen Effekt mehr auf INA6 Zellen, da die Membrangängigkeit durch das angefügte Biotin vermutlich nicht mehr gegeben ist.

5.2.2.1 Identifizierung zellulärer Targets der Substanz AH436

Der zelluläre Assay für die Aktivität der verwendeten α -acyl Aminocarboxamide ist die Quantifizierung der HSP72-Gehalte nach der Behandlung mit dem HSP90-Inhibitor AUY922. Nach der Inhibition von HSP90 wird die HSR ausgelöst und Hitzeschockproteine wie HSP72 werden vermehrt gebildet. Alle Substanzen aus Abbildung 61 wurden mit INA6-Zellen vorinkubiert und danach mit AUY922 behandelt. Die HSP72-Gehalte wurden von Dr. Daniela Brännert (AG Bargou) quantitativ mittels ELISA überprüft (Abbildung 62). Die Wirksamkeit der α -acyl Aminocarboxamide spiegelt sich in einer reduzierten Induktion von HSP72 wider. Zusätzlich zur Quantifizierung von HSP72 mittels ELISA wurde das Gesamtproteom nach verschiedenen Behandlungen analysiert. Die Induktion von HSP72, HSP90 und weiteren HSPs durch AUY922 konnte hierdurch bestätigt werden (Abbildung A. 46). Die Behandlung mit dem α -acyl Aminocarboxamid AH390 und die Kombinationsbehandlung mit AUY922 und AH367 führten zu keinem spezifischen Effekt auf Proteomebene (Abbildung A. 44, Abbildung A. 48). Die vermehrte Freisetzung von Histonen bei den Inhibitorbehandlungen könnte auf eine eingeleitete Apoptose hindeuten (Chen et al., 2014).

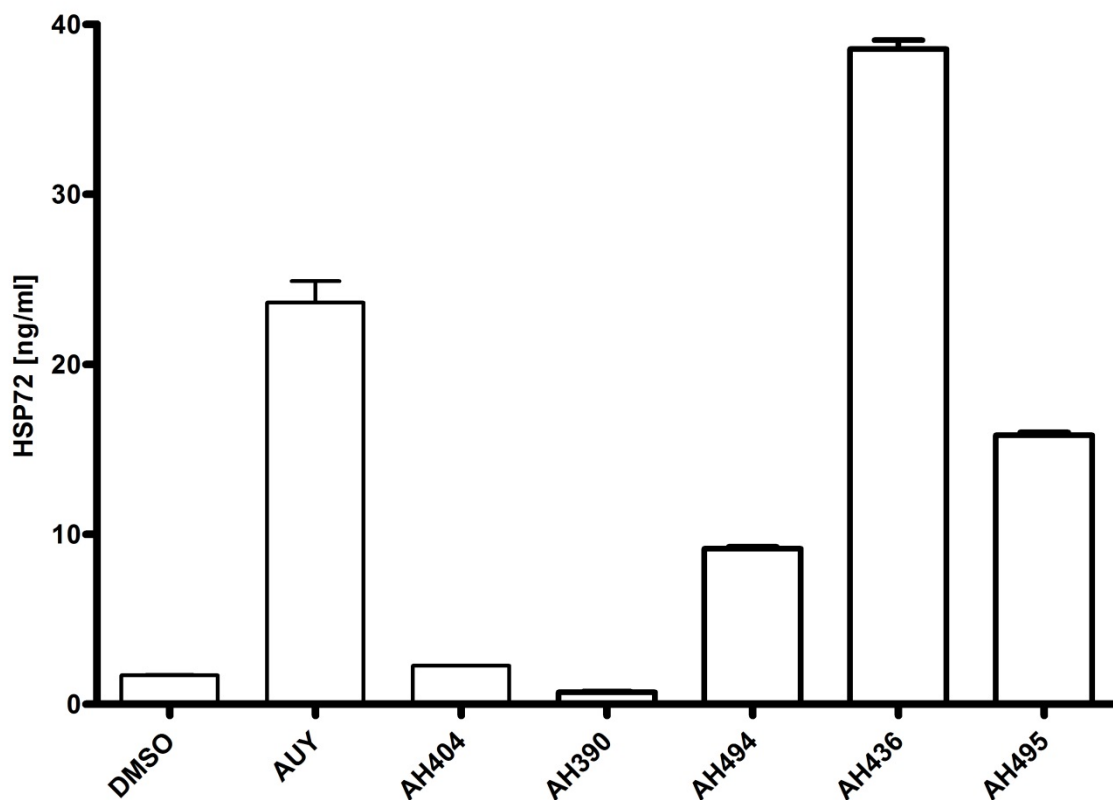


Abbildung 62: HSP72-Gehalte von INA6-Zellen, die mit verschiedenen α -acyl Aminocarboxamiden behandelt wurden.

Die Zellen wurden 4 h mit den verschiedenen α -acyl Aminocarboxamiden vorbehandelt und anschließend mit der HSR stimulierenden Substanz AUY922 für weitere 4 h inkubiert. Als Kontrollen wurden die Behandlung mit DMSO und AUY922 verwendet. Die Grafik wurde von Dr. Daniela Brünnert (AG Bargou) zur Verfügung gestellt.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass Substanz AH404 eine hemmende Wirkung auf die Hitzeschockantwort (HSR) hat, wurde daraus Substanz AH436 synthetisiert, um sie an magnetische Beads zu binden. Ziel war es, die zellulären Zielproteine der α -acyl Aminocarboxamide damit anzureichern und zu identifizieren. Die mit AH436 beladenen Beads wurden mit INA6 Zelllysate inkubiert, gewaschen und gebundene Proteine eluiert. Als Kontrolle dienten unbeladene Beads, die gleichermaßen behandelt wurden. Die eluierten Proteine wurden per SDS-PAGE aufgetrennt (Abbildung 63).

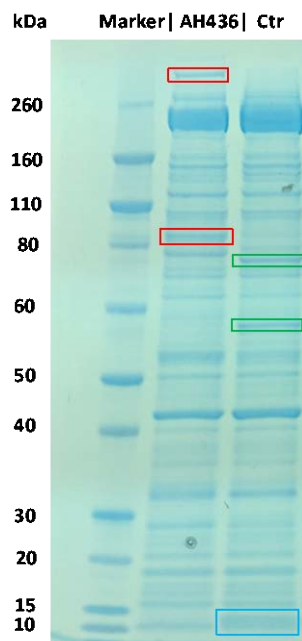


Abbildung 63: **Proteine, die mit AH436-beladenen Streptavidinbeads und der Beadkontrolle aus einem INA6 Zelllysate angereichert wurden.**

Die gebundenen Proteine wurden mit Probenpuffer von den Beads eluiert, reduziert, gekocht, alkyliert und anschließend durch SDS-PAGE aufgetrennt. Als Kontrolle wurden Streptavidinbeads verwendet und ebenfalls mit INA6 Zelllysate behandelt und wie oben beschrieben auf das Gel aufgetragen und aufgetrennt. Bereits im Gel konnten kleine Unterschiede zwischen der Kontrolle und dem verwendeten Inhibitor festgestellt werden. Proteinbanden, die nur mit dem Inhibitor AH436 aufgetreten sind wurden rot markiert. Spezifisch mit der Kontrolle angereicherte Proteine sind grün markiert. Die Bande des Streptavidin Monomers ist blau markiert. Für die anschließende Messung wurden beide Gelspuren (AH436 und Ctr) in jeweils 15 Banden geschnitten gewaschen, tryptisch verdaut und die Peptide mittels LC-MS/MS identifiziert. Die Quantifizierung wurde ohne Markierung mittels Maxquant LFQ durchgeführt.

Bereits im Proteinbandenmuster der aufgetrennten Proteine konnten Unterschiede zwischen den Kontroll- und den Inhibitorbeads festgestellt werden, jedoch sind die beiden Lanes von der Gesamtintensität vergleichbar, was gute Voraussetzungen für einen Vergleich mittels verwendeter LFQ-Methode sind (Abbildung 63). Erkennbare Unterschiede sind bei der Kontrollspur auf der Höhe von 57 und 75 kDa im Vergleich zur AH436-Spur. Diese beiden Proteinbanden passen zu den Carboxylase PCCB (56 kDa) und PCCA (77 kDa). Mit dem Inhibitor sind zwei deutliche Banden im Bereich von ca. 400 und 85 kDa vorhanden. Weiterhin ist zu sehen, dass im Bereich von 10 kDa eine Bande in der Kontrollspur auftaucht (blaue Markierung). Bei dieser Bande handelt es sich um Streptavidin, das an die Beads verlinkt wurde. Bei den Inhibitorbeads wird durch die Biotin-Streptavidin-Bindung die Stabilität des Streptavidin vergrößert (Weber et al., 1989). Nicht-kovalent gebundene Einheiten des Streptavidintetramers lösen sich nur in kleinen Mengen im Vergleich zu den Kontrollbeads. Diese Tatsache ist zudem ein Hinweis darauf, dass der biotinylierte Inhibitor an Streptavidin gebunden hat.

Für die MS-Messungen wurde jede Gelspur in 15 Banden geschnitten, die Proteine extrahiert und mittels LC-MS/MS analysiert. Für jeden Inhibitor wurden mindestens 3 Replikate angefertigt und die Proteine mit Maxquant identifiziert und quantifiziert. Für den Inhibitor AH436 (Abbildung 61A) wurden 5 biologische Replikate angefertigt und die Proteinverhältnisse zwischen Kontrolle und Inhibitor gebildet und gegen die Proteinintensitäten aufgetragen (Abbildung 64A). Der Großteil der Proteine, die als offene Kreise markiert sind, sind mit der Kontrolle und dem Inhibitor gleichermaßen angereicherte unspezifische Proteine. Mit den Kontrollbeads wurden die Carboxylasen und zugehörige mitochondriale Proteine angereichert, was für die Funktionalität der verwendeten Streptavidinbeads spricht. Die Proteine, die mit dem Inhibitor AH436 angereichert wurden, lassen sich in Komplexe, Familien und Funktionen unterteilen. Jedes signifikant angereicherte Protein ist ein möglicher Interaktionspartner von AH436 bzw. ein Interaktionspartner eines AH436-Bindungspartners. Anhand dieser Daten ist es nicht möglich zwischen direkten und indirekten Interaktoren zu unterscheiden.

Mit dem Inhibitor AH436 wurden folgende Proteine angereichert (Abbildung 64A): der MICOS Komplex, der die mitochondriale Morphologie und den Proteintransport reguliert (Xie et al., 2007), vier Untereinheiten des SMN-Komplexes, der eine essentielle Rolle in der Zusammensetzung der kleinen splicesosomalen Ribonucleoproteine (snRNPs) spielt (Gubitz et al., 2004) und sechs Untereinheiten des CCR4-NOT Komplexes, der unter anderem in die DNA Damage response (DDR) involviert ist (Collart and Panasenko, 2012). Außerdem wurden mehrere peroxisomale Proteine, Apoptoseproteine wie MAP3K5, MAP3K6, PDCD6 und PEF1 und fünf Untereinheiten der Phosphatase 6 identifiziert, die mit der Regulation des Zellzyklus in Verbindung stehen (Rusin et al., 2015). Interessanterweise wurden auch vier Kinasen (PRKDC, ATM, ATR und mTOR) derselben Familie (PIKKs) angereichert. mTOR reguliert das Zellwachstum über verschiedene Prozesse wie Proteinsynthese, Ribosomenbiogenese und Autophagie (Sarbasov et al., 2005; Tu et al., 2013). PRKDC, ATM und ATR sind Interaktionspartner innerhalb der DDR (Weber and Ryan, 2015). Die PRKDC (DNA-PK) ist zudem ein Interaktionspartner von HSF1 (Huang et al., 1997) und es konnte gezeigt werden, dass die PRKDC in der HSF1 vermittelten Hochregulierung von HSP72 eine wichtige Rolle spielt (Nueda et al., 1999).

Um einen strukturellen Zusammenhang innerhalb der verschiedenen Proteine zu finden, wurde eine Anreicherungsanalyse für Proteindomänen durchgeführt (Abbildung 64B). Die häufigste Domäne, die innerhalb der potentiellen Bindungspartner von AH436 angereichert wurde ist die Armadillodomäne (ARM). Von den 68 angereicherten Proteinen weisen 13 (PRKDC, ATM, ATR, mTOR, XPOT, PP6R1, PP6R2, MON2, CIP2A, CNOT1, RCD1, GCN1, BIG2) die Armadillodomäne auf, was 17 % der Proteine sind. Diese Domäne besteht aus mehreren variablen Helices, die zusammen eine Superhelix bilden, die bei der Protein-Proteininteraktion eine wichtige Rolle spielt (Baretic and Williams, 2014).

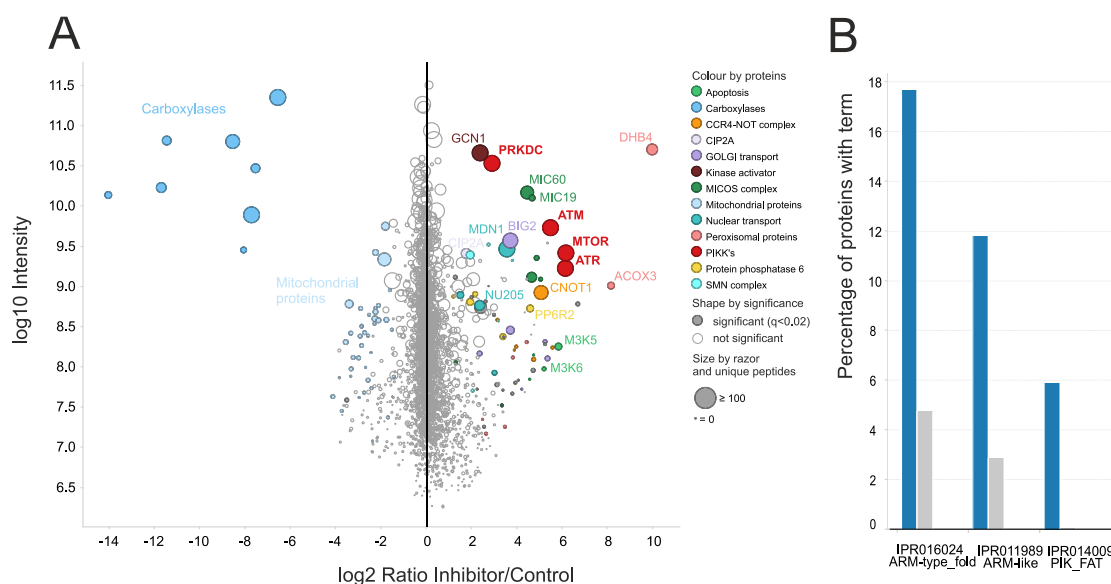


Abbildung 64: **Identifizierung von potentiellen Zielproteinen, die mit Substanz AH436 aus einem INA6 Zelllysats angereichert wurden.**

(A) Proteine, die im Vergleich zur Kontrolle signifikant (Benjamini-Hochberg adjusted limma p-value < 0.02) angereichert wurden sind als geschlossene Kreise markiert. Proteinverhältnisse und –intensitäten sind Medianwerte von 5 biologischen Replikaten (n Replikate > 1). Die Größe der Kreise korreliert mit der Anzahl der identifizierten Peptide (razor and unique). Proteine von demselben Komplex, der gleichen Familie oder derselben Funktion sind mit derselben Farbe markiert. Mit den Kontrollbeads wurden speziell Carboxylasen angereichert, da diese Biotin als prosthetische Gruppe enthalten.

(B) Signifikant angereicherte und nicht-redundante InterPro-Domänen (Benjamini-Hochberg adjusted Fisher’s exact test p-value < 0.01). Die blauen Balken zeigen den Anteil der angereicherten Domäne, innerhalb der potentiellen Zielproteine (Benjamini-Hochberg adjusted limma p-value < 0.02, n replicates > 1 and log₂ ratio > 0). Die grauen Balken stellen den Anteil der angereicherten Domäne innerhalb der nicht-signifikant angereicherten Proteine dar (Quelle: (Bach et al., 2017)).

Im nächsten Schritt wurden diese 13 Proteine und die anderen 55 angereicherten Proteine mit der HitPredict Datenbank (Patil et al., 2011) auf Interaktionen hin untersucht. Die meisten der angereicherten Proteine lassen sich durch die Interaktion mit einem der 13 Proteine mit Armadillodomäne erklären. Diese Domäne stellt somit ein potentielles

Bindungsmotiv für die α -acyl Aminocarboxamide dar. Obwohl die Armadillodomäne in Bezug auf die Größe stark variieren kann, wurde in einer anderen Studie gezeigt, dass diese Domäne hochkonservierte Bindetaschen aufweist, die für die Interaktion mit Proteinen wichtig sind (Dahlstrom and Salminen, 2015).

5.2.2.2 Identifizierung zellulärer Targets von Proteinen der Substanz AH495

Um den Einfluß der Position des Linkers an den α -acyl Aminocarboxamiden genauer zu untersuchen, wurde Substanz AH495 von Dr. Anna Lehmann (AG Holzgrabe) synthetisiert. Der Linker wurde, im Vergleich zu Substanz AH436, nicht an den oberen Phenylrest, sondern an den Phenylrest unten rechts angefügt (Abbildung 61). Somit konnte überprüft werden, ob die phenolische OH-Gruppe in Substanz AH436 für die Bindung an die Proteine mit Armadillodomäne essentiell ist.

Substanz AH495 wurde genau wie Substanz AH436 an magnetische Beads gekoppelt, mit INA6 Zelllysate inkubiert, die Bindungspartner eluiert und die Proteine mittels LC-MS/MS analysiert (Abbildung 65). Die mit Substanz AH495 angereicherten Proteine überlappen zum Teil mit den Proteinen, die mit Substanz AH436 identifiziert wurden. Hierzu zählen auch die vier Kinasen PRKDC, ATM, ATR und mTOR. Die Bindung der PIKKs an die α -acyl Aminocarboxamide ist somit unabhängig von der phenolischen OH Gruppe.

Bei der Anreicherungsanalyse für Proteindomänen mit Substanz AH495 wurde die Armadillodomäne signifikant angereichert. Mehr als 27 % der angereicherten Proteine haben diese Domäne. Im Vergleich zu Substanz AH436 sind somit mehr Proteine mit einer Armadillodomäne angereichert. Weiterhin sind die 4 Kinasen PRKDC (DNA-PK), ATM, ATR und mTOR stärker angereichert was man am Proteinverhältnis erkennen kann. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass die Substanz AH495 stärker an die vier Kinasen und an Proteine mit Armadillodomäne bindet. Insgesamt wurden 116 Proteine angereichert, das sind 48 Proteine mehr als mit Substanz AH436. Der stärkeren Anreicherung der Kinasen PRKDC (DNA-PK), ATM, ATR und mTOR, die wahrscheinlich für den Effekt auf die MM-Zellen verantwortlich sind, steht somit eine vermehrte generelle Anreicherung von Proteinen mit Armadillodomäne entgegen.

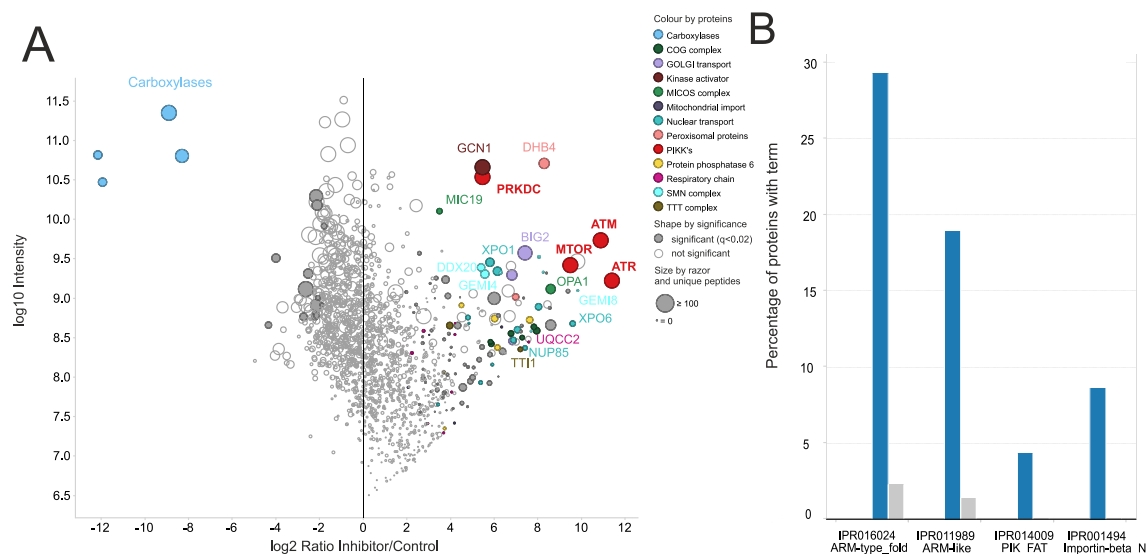


Abbildung 65: **Identifizierung von potentiellen Zielproteinen, die mit Substanz AH495 aus einem INA6 Zellysats angereichert wurden.**

(A) Proteine, die im Vergleich zur Kontrolle signifikant (Benjamini-Hochberg adjusted limma p-value < 0.02) angereichert wurden sind als geschlossene Kreise markiert. Proteinverhältnisse und –intensitäten sind Medianwerte von 3 biologischen Replikaten (n Replikate > 1). Die Größe der Kreise korreliert mit der Anzahl der identifizierten Peptide (razor and unique). Proteine von demselben Komplex, der gleichen Familie oder derselben Funktion sind mit derselben Farbe markiert. Mit den Kontrollbeads wurden speziell Carboxylasen angereichert, da diese Biotin als prosthetische Gruppe enthalten. B) Signifikant angereicherte und nicht-redundante InterPro-Domänen (Benjamini-Hochberg adjusted Fisher’s exact test p-value < 0.01). Die blauen Balken zeigen den Anteil der angereicherten Domäne, innerhalb der potentiellen Zielproteine (Benjamini-Hochberg adjusted limma p-value < 0.02, n replicates > 1 and log₂ ratio > 0). Die grauen Balken stellen den Anteil der angereicherten Domäne innerhalb der nicht-signifikant angereicherten Proteine dar (Quelle (Bach et al., 2017)).

5.2.2.3 Vergleich der zellulären Targets der Substanzen AH436 und AH495

Die Datensätze von AH436 und AH495, mit den verschiedenen Linkerpositionen, wurden für einen genauen Vergleich zusammen in Maxquant prozessiert, um Unterschiede im Hinblick auf die Zielproteine zu untersuchen. Hierzu wurden die log₂-Verhältnisse der Inhibitoren auf den Z-Score standardisiert und gegeneinander aufgetragen (Abbildung 66). Der Z-Score gibt an, wieviele Standardabweichungen sich ein Datenpunkt vom Median des Datensatzes entfernt befindet. Die Z-Scores wurden von Dr. Jens Vanselow (AG Schlosser), wie in Kapitel 4.5.2.11 beschrieben, berechnet. Die vier Kinasen PRKDC, ATM, ATR und mTOR sind nahe der Winkelhalbierenden angeordnet, was für eine Anreicherung mit beiden Inhibitoren spricht. Es gibt jedoch zwei Proteinkomplexe, die nur mit jeweils einem der beiden Inhibitoren angereichert wurden. Mit Substanz AH436 wird der CCR4-NOT Komplex angereichert und mit AH495 sind mehrere Untereinheiten des COG-Komplexes zu sehen. Der COG-Komplex besteht aus acht Untereinheiten, die zusammen einen Heterooktamer bilden und zur Familie der

CATCHR-Komplexe gehören (Yu and Hughson, 2010). Seine Aufgabe ist es, unter anderem, den retrograden Transport innerhalb der Membran des Golgi-Apparates zu steuern (Ungar et al., 2006).

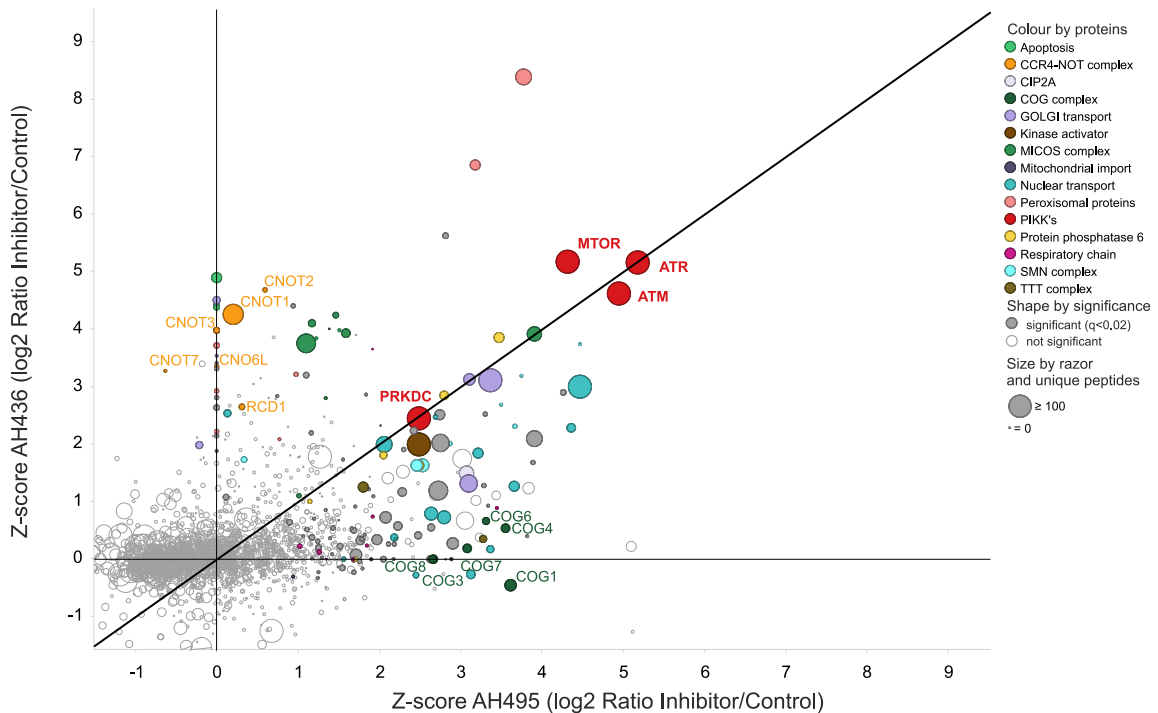


Abbildung 66: Vergleich der Proteine, die mit Substanz AH436 und AH495 aus INA6 Zellysats angereichert wurden.

Proteine, die mit mindestens einer Substanz signifikant (Benjamini-Hochberg adjusted limma p-value < 0.02, $n > 1$, and \log_2 ratio > 0) angereichert wurden, sind als geschlossene Kreise dargestellt. Die Z-Werte wurden aus dem Median der \log_2 Proteinverhältnisse (Inhibitor/Kontrolle, n Replikate > 1), geteilt durch die Standardabweichung des Medians der \log_2 Proteinverhältnisse (Inhibitor/Kontrolle, n Replikate > 1) berechnet. Fehlende Werte in einem der beiden Experimente wurden durch 0 ersetzt. Die Größe der Kreise korreliert mit der Anzahl der identifizierten Peptide (razor and unique). Proteine von demselben Komplex, der gleichen Familie oder derselben Funktion sind mit derselben Farbe markiert (Quelle (Bach et al., 2017)).

5.2.2.4 Zielproteine der α -acyl Aminocarboxamide und neuer Wirkmechanismus

Insgesamt wurden 68 potentielle Zielproteine mit dem α -acyl Aminocarboxamid AH436 angereichert (Abbildung 64A). Diese große Anzahl an Proteinen lässt sich in erster Linie damit erklären, dass zusätzlich zu den primären Zielproteinen interagierende Proteine angereichert werden. Anhand dieser Daten ist es nicht möglich zwischen direkten und indirekten Zielproteinen zu unterscheiden. Jedoch lassen sich die Proteine in verschiedene Gruppen einteilen. Die interessanteste Gruppe stellen die Phosphatidylinositol 3-Kinase-Related Kinases (PIKKs) dar. Die Kinasen PRKDC (DNA-PK), ATM und ATR spielen eine wichtige Rolle in der DNA-Damage-Response (DDR), in der sie zudem miteinander

interagieren. Bisher konnte nicht gezeigt werden, dass die DNA-PK den Transkriptionsfaktor HSF1 phosphoryliert und damit seine Aktivität reguliert. Vielmehr deuten bisherige Ergebnisse darauf hin, dass die Stabilität von HSF1 durch die Interaktion mit der DNA-PK beeinflusst wird (Bach et al., 2017). Bei ausgelöster HSR, durch AUY922, könnte die Inhibition der DNA-PK zu einer Destabilisierung von HSF1 mit folgender Degradation führen. Die Expression von Hitzeschockproteinen wie HSP72 wird nicht mehr induziert (Abbildung 67).

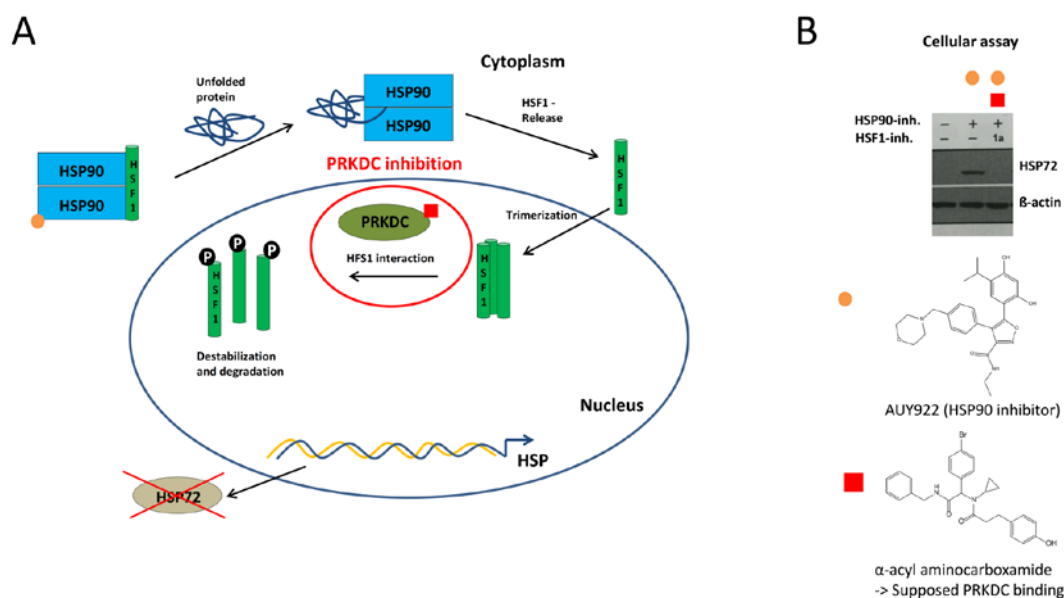


Abbildung 67: **Potentieller Wirkungsmechanismus der α -acyl Aminocarboxamide basierend auf den massenspektrometrischen Daten aus Abbildung 64.**

(A) Die Stabilität von HSF1 wird durch die fehlende Interaktion mit der Kinase PRKDC (DNA-PK) reduziert und es kommt zur Degradation. Die HSR kann nicht ausgelöst werden, was zur ausbleibenden HSP72-Expression und letztendlich zum Zelltod führt (Modifiziert nach de Billy et al. 2009)

(B) Western Blot Ergebnisse der Menge an HSP72 ohne Behandlung (-/-), mit HSP90 Inhibition (+/-) und einer Kombination aus HSP90- und potentieller HSF1-Inhibition durch α -acyl Aminocarboxamide (Quelle CRU216 Antrag).

Die Hitzestressantwort ist damit komplett ausgeschaltet, wodurch Proteine, die für onkogene Signalwege wichtig sind, nicht mehr gefaltet werden können. Bei MM-Zellen, die mit einer Kombination aus HSP90-Inhibitor und den α -acyl Aminocarboxamiden behandelt werden, kommt es somit nach wenigen Stunden zur Apoptose. Ob der indirekte Effekt der α -acyl Aminocarboxamide auf die HSR nur von der DNA-PK abhängt oder ob es sich um einen synergistischen Effekt handelt, da vier PIKKs inhibiert sind, bleibt im Moment noch ungeklärt. Durch das schrittweise Ausschalten der Proteinlevel der einzelnen Kinasen mit passenden siRNAs könnte man herausfinden, welche Kinase oder

Kinasenkombination erforderlich ist, um den gleichen Effekt wie mit den Inhibitoren zu erzeugen.

5.2.2.5 Überprüfung der Anreicherung von PIKKs mit AH436 mittels Western Blot

Um die massenspektrometrischen Daten aus Kapitel 5.2.2.1 mit einer anderen Methode zu validieren, wurden die Proteineluate von den Kontroll- und den Inhibitorbeads per SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran übertragen. Die Kinasen PRKDC, ATM, ATR und mTOR wurden mittels spezifischer Antikörper über Immundetektion validiert (Abbildung 68; in Kooperation mit Dr. Daniela Brünnert(AG Bargou)). Im Vergleich zur Kontrolle wurden mit den AH436-beladenen Beads alle vier Kinasen angereichert. Die beiden zusätzlichen Banden bei der Detektion der PRKDC und ATM sind bekannte Abbauprodukte, an die der spezifische Antikörper auch bindet. Als Ladekontrolle wurden das Histon H2A.X und die Ponceaufärbung der Membran auf der Höhe von 43 kDa herangezogen. Die massenspektrometrischen Daten konnten somit mittels Western Blot bestätigt werden. Diese Ergebnisse waren zu erwarten, denn die Anreicherung wurde wie bei den massenspektrometrischen Versuchen durchgeführt, es wurde nur die Detektion der Proteine geändert.

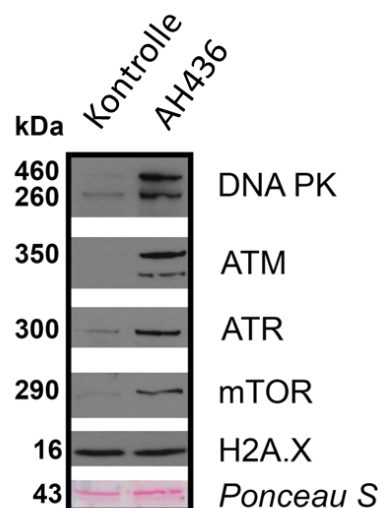


Abbildung 68: Überprüfung der Anreicherung der PIKKs mit Substanz AH436 mittels Western Blot.

Die Kontrollbeads und die mit AH436 beladenen Beads wurden getrennt mit INA6 Zelllysate inkubiert und die gebundenen Proteine eluiert, mit SDS-PAGE aufgetrennt auf eine PVDF-Membran übertragen und die Zielproteine PRKDC (DNA-PK), ATM, ATR und mTOR mittels spezifischer Antikörper nachgewiesen. Als Ladekontrollen wurden das Histon H2A.X und die Ponceau S Färbung an der Stelle 43 kDa herangezogen (in Kooperation mit Daniela Brünnert;Quelle: (Bach et al., 2017)).

5.2.2.6 Validierung der DNA-PK als Zielprotein der α -acyl Aminocarboxamide mittels Kinaseassay

Nachdem die DNA-PK als potentielles Target der α -acyl Aminocarboxamide per Massenspektrometrie identifiziert und mittels Western Blot bestätigt werden konnte, wurde überprüft, ob diese Bindung direkt mit der Reduktion der Kinaseaktivität der DNA-PK zusammenhängt. Deshalb wurde das kommerziell verfügbare DNA-PK Kinase Enzyme System (Promega) verwendet, mit dem man den Einfluss von Inhibitoren auf die Phosphorylierungsaktivität der PRKDC testen kann (Abbildung 69).

Dieses Enzymkit funktioniert folgendermaßen: Zunächst wird zu der Kinase, ATP und Substratpeptid gegeben. In der Kinaseaktion entsteht ADP, phosphoryliertes Substrat und es verbleibt das restliche ATP, da es im Überschuss zugegeben wird. Dieses ATP wird durch die Zugabe der ADP-Glo™ Reagenz abgebaut. Im nächsten Schritt wird das Reaktionsprodukt ADP aus der Kinaseaktion in ATP umgewandelt. Dieses kann mittels Luziferase in Form von Licht detektiert werden. Die Menge an entstandenem Licht steht somit in Abhängigkeit mit der Aktivität der verwendeten Kinase.

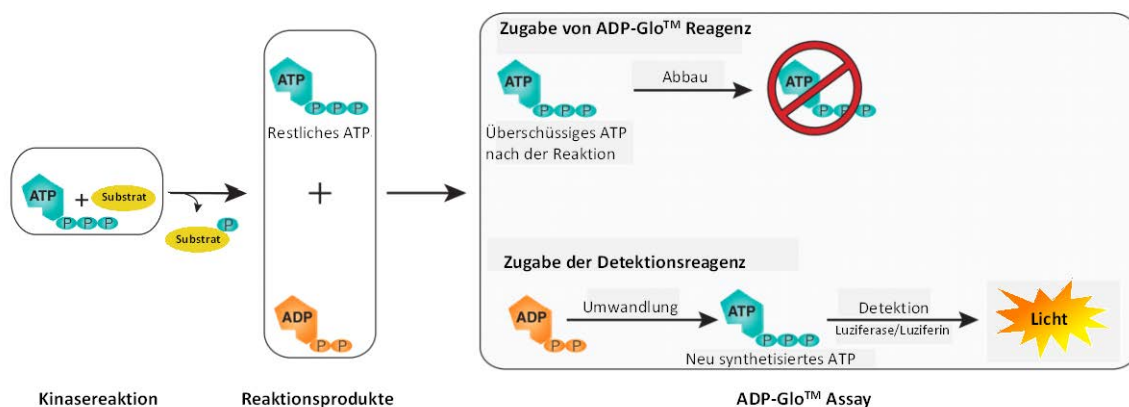


Abbildung 69: Schematische Darstellung der Funktionsweise des DNA-PK Kinase Enzyme System.

Durch die Zugabe von ATP und Substratpeptid (p53) zur DNA-PK wurde die Phosphorylierungsreaktion durchgeführt. Es entstehen ATP und ADP als Reaktionsprodukte. Das überschüssige ATP wurde durch die ADP-Glo Reagenz aufgebraucht und das entstandene ADP im nächsten Schritt in ATP umgewandelt. Das entstandene ATP wurde mittels Luziferase/Luziferin-Test detektiert (Modifizierte Abbildung vom Kinase Enzyme System Protocol (www.promega.com)).

Als Positivkontrolle für das DNA-PK Kinase Enzyme System wurden die beiden kommerziell verfügbaren DNA-PK Inhibitoren NU7026 und NU7441 verwendet (Abbildung 70 (Willmore et al., 2004), (Leahy et al., 2004)). Mit beiden Inhibitoren konnte bereits mit einer Konzentration von 9.8 nM eine reduzierte Kinaseaktivität herbeigeführt werden (Abbildung 71). Die Konzentration an NU7441, die nötig ist um die Kinaseaktivität auf 50 % zu senken, ist 19.5 nM. Dieser Wert ist vergleichbar mit dem in der Literatur angegebenen IC₅₀-Wert von 14 nM (Leahy et al., 2004). Der gemessene IC₅₀-Wert von Substanz NU7026 betrug 39.1 nM. Er fällt somit niedriger aus als der IC₅₀-Wert aus der Literatur mit 230 nM. Insgesamt betrachtet konnte das DNA-PK Kinase Enzyme System positiv auf seine Funktionsweise hin überprüft werden.

Im nächsten Schritt wurde eine der aktivsten Substanzen, AH390 auf die Inhibition der DNA-PK getestet. Die gemessenen Replikate für jede Konzentration weisen eine sehr hohe Streuung auf, was sich in einer hohen Standardabweichung widerspiegelt (Abbildung 71, rote Kurve). Bis zu einer Konzentration von 1250 nM bleibt die Kinaseaktivität bei ca. 100 %. Bei einer Konzentration von 10 µM wird ein Wert von 80 % Aktivität erreicht. Im Vergleich zu den beiden bekannten DNA-PK Inhibitoren NU7026 und NU7441 ist somit keine oder nur eine geringe inhibitorische Wirkung vorhanden. Höhere Konzentrationen konnten mit diesem Assay nicht getestet werden, da dann die vollständige Löslichkeit der Substanz AH390 nicht mehr gegeben war. Aufgrund der großen Streuung der Daten und der hohen Konzentrationen an AH390 ist diese Abnahme auf 80 % kritisch zu betrachten. Es könnte sich auch um einen unspezifischen inhibitorischen Effekt aufgrund der hohen Konzentrationen handeln.

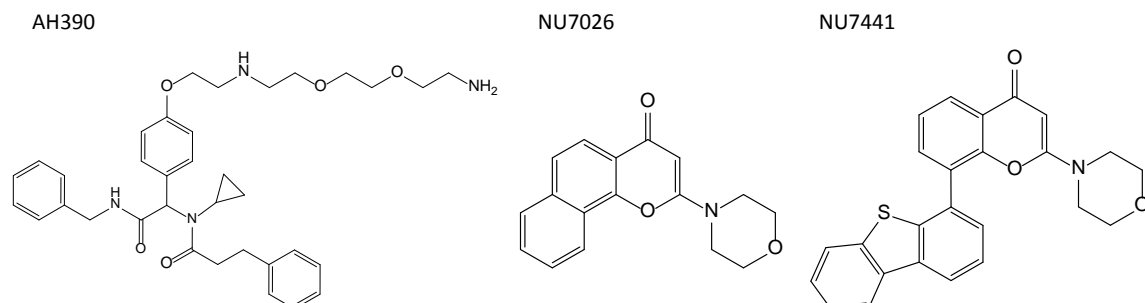


Abbildung 70: Strukturformeln des α -acyl Aminocarboxamids AH390 und der beiden DNA-PK-Inhibitoren NU7026 und NU7441.

Alle drei Substanzen wurden auf ihre inhibitorische Wirkung bezüglich der ATP-Hydrolyse der DNA-PK untersucht. Hierzu wurde das DNA-PK Kinase Enzyme System verwendet.

Geht man davon aus, dass die Armadillodomäne die Zielstruktur der α -acyl Aminocarboxamide ist, würde man keine Inhibition der Kinaseaktivität der DNA-PK erwarten, sondern die spezifische Blockierung von Proteininteraktionen. Wenn AH390 ein Kinaseinhibitor wäre, würde man außerdem erwarten, dass noch viele andere Kinasen angereichert werden (Zhang et al., 2013). Es kann weiterhin ausgeschlossen werden, dass es zu einer Kompetition zwischen dem im Kinase-Kit enthaltenen Peptid von p53 und der Substanz AH390 kommt. Das Peptid von p53 muss, um phosphoryliert zu werden, an die PIKK-Domäne der DNA-PK binden (Baretic and Williams, 2014). Die Substanz AH390 bindet wahrscheinlich an die N-terminale Armadillodomäne. Diese Bindung hat laut der in Abbildung 71 gezeigten Daten keinen Einfluss auf die Kinaseaktivität der DNA-PK.

Diese These passt zu den Ergebnissen aus Kapitel 5.2.2.4, da nicht die Abnahme der HSF1-Phosphorylierung detektiert werden konnte, sondern die Abnahme des HSF1-Gesamtproteingehaltes (Bach et al., 2017). Diese Abnahme könnte aufgrund der fehlenden Proteininteraktion von HSF1 mit der DNA-PK an der Armadillodomäne zustande kommen, was zur Destabilisierung und Degradation von HSF1 führt.

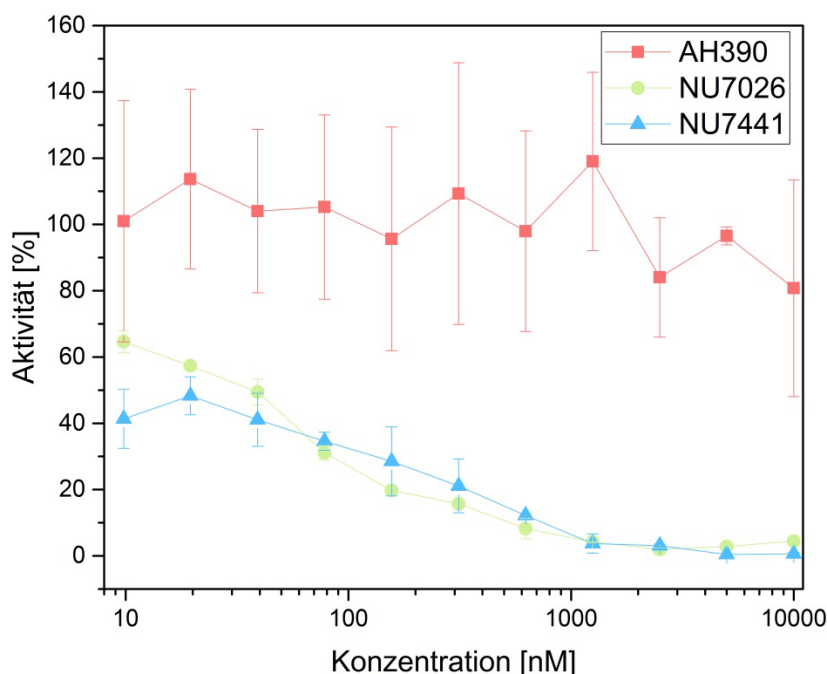


Abbildung 71: **Kinaseaktivität der DNA-PK bei Konzentrationsreihen von Substanz AH390 und den beiden DNA-PK-Inhibitor NU7026 und NU7441.**

Verwendet wurde das DNA-PK Kinase Enzyme System (Promega). Die mit dem Luminometer (TriStar² LB 942 Multidetector Microplate Reader) gemessenen relativen Lichteinheiten, stehen für die Aktivität der DNA-PK. Zu jeder Konzentration an Inhibitor wurden 3 Replikate gemessen. Zu sehen sind die Mittelwerte und zugehörigen Standardabweichungen. Die Aktivität in Prozent wurde gegen die Konzentration aufgetragen.

5.2.2.7 Validierung der DNA-PK als Zielprotein der α -acyl Aminocarboxamide mittels Co-IP

Eine weitere Möglichkeit, um die gefundenen Zielproteine mit AH436 und AH495 zu validieren, ist es, die DNA-PK mit einem spezifischen Antikörper anzureichern und die gebundenen Proteine mit denen zu vergleichen, die mit beiden Inhibitoren gefunden wurden. In Kooperation mit Dr. Daniela Brännert (AG Bargou) wurde ein für die DNA-PK spezifischer Antikörper an magnetische Beads gebunden (Kapitel 4.5.1.7). Durch die Zugabe von INA6 Zelllysate wurden die DNA-PK und interagierende Proteine co-immunpräzipitiert. Als Kontrolle wurden unbeladene Beads verwendet, um zwischen unspezifischen Bindungen an die Beads und spezifischen Bindungen an den Antikörper zu unterscheiden. Gebundene Proteine wurden eluiert, per SDS-PAGE aufgetrennt und mittels LC-MS/MS gemessen. Die Auswertung wurde, wie bei den Versuchen mit den beiden Inhibitoren, markierungsfrei mit Maxquant durchgeführt. Insgesamt betrachtet sind die Kontrolle und die Co-IP-Probe gut miteinander vergleichbar, da ein Großteil der Proteine gleichermaßen unspezifisch an die Beads bindet und somit um den \log_2 von 0 streut (Abbildung 72). Weiterhin kommt es zu keiner spezifischen Anreicherung von Proteinen mit den Kontrollbeads.

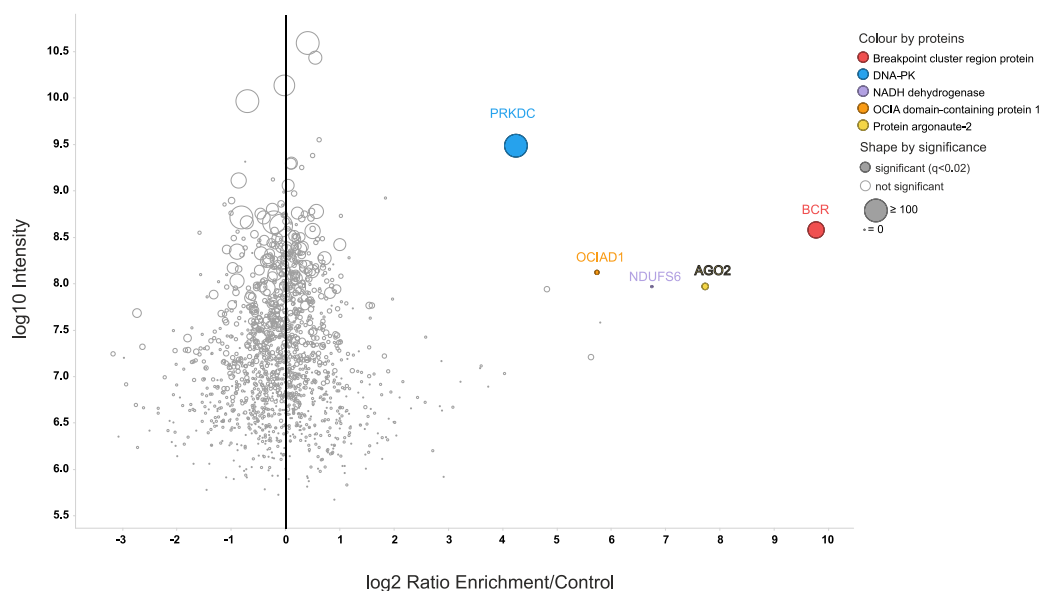


Abbildung 72: Anreicherung von Proteinen mittels anti-DNA-PK Co-Immünpräzipitation aus einem INA6 Zelllysate.

Proteine, die im Vergleich zur Kontrolle signifikant (Benjamini-Hochberg adjusted limma p-value < 0.05) angereichert wurden sind als geschlossene Kreise markiert. Proteinverhältnisse und -intensitäten sind Medianwerte von 3 biologischen Replikaten (n Replikate > 1). Die Größe der Kreise korreliert mit der Anzahl der identifizierten Peptide (razor and unique). Die spezifisch angereicherten Proteine sind mit unterschiedlichen Farben hervorgehoben.

Die mittels Co-IP angereicherten Proteine sind die DNA-PK, BCR, AGO2, NDUFS6 und OCIAD1. Das spezifische Zielprotein des verwendeten Antikörpers ist die DNA-PK. Die anderen signifikant angereicherten Proteine sind Interaktionspartner oder sie haben eine ähnliche Aminosäuresequenz, die vom Antikörper erkannt wird. Die Proteine AGO2, NDUFS6 und OCIAD1 konnten mit den Interaktionsdatenbanken STRING oder Hitpredict nicht mit der DNA-PK in Verbindung gebracht werden. Das Protein BCR spielt eine Rolle in der DNA-Reparatur (Skorski, 2002), was die Interaktion mit der DNA-PK erklären könnte, da diese an der DDR beteiligt ist. AGO2 steht mit dem zellulären RNAi-Prozess in Verbindung (Chendrimada et al., 2005), NDUFS6 ist ein Teil der mitochondrialen NADH-dehydrogenase in der Atmungskette (Stroud et al., 2016) und zu OCIAD1 liegen noch keine genauen funktionellen Informationen vor. Die per Co-IP identifizierten potentiellen Interaktionspartner der DNA-PK sind weder mit AH436 noch mit AH495 angereichert worden, was ein Hinweis dafür sein könnte, dass die DNA-PK nicht das einzige primäre Zielprotein der α -acyl Aminocarboxamide ist. Eine weitere Erklärung der Anreicherung von BCR, AGO2, NDUFS6 und OCIAD1 könnte sein, dass sie das gleiche Epitop aufweisen das auch vom DNA-PK Antikörper erkannt wird.

5.2.2.8 Fazit zur Identifizierung der potentiellen Targets von α -acyl Aminocarboxamiden

Mittels quantitativer MS-Messung konnten potentielle Targets der α -acyl Aminocarboxamide identifiziert werden. Unter den Targets befinden sich vier Kinasen derselben Proteinfamilie (PRKDC, ATM, ATR, mTOR), die mit Überlebensmechanismen bzw. onkogenem Signaling in Verbindung stehen. Zudem ist bekannt, dass PRKDC (DNA-PK) mit dem Transkriptionsfaktor HSF1 interagiert und somit die HSR beeinflussen kann. Diese Daten passen zu der unterdrückten HSR bzw. Induktion von HSP72, die bei einer kombinatorischen Behandlung von MM-Zellen mit einer HSR-induzierenden Substanz und den α -acyl Aminocarboxamiden vorliegt. Als potentielle Bindestelle der α -acyl Aminocarboxamide kommt die Armadillodomäne in Frage, da sie innerhalb der potentiellen Targets spezifisch angereichert wurde. Die Ergebnisse konnten mit den Substanzen AH436 und AH495 gleichermaßen erzeugt werden, obwohl sich der Linker mit dem Biotin an jeweils anderen Stellen im Molekül befindet. Die beiden Stellen mit den Linkermodifikationen sind somit nicht essentiell für die Interaktion mit den Proteinen.

5.2.3 Identifizierung zellulärer Targets von Naphtylisochinolinen

Die Naphtylisochinoline sind Naturstoffe, die unter anderem in der Pflanze *Ancistrocladus tectorius* vorkommen, welche in den tropischen Regenwäldern Asiens wächst (Bringmann et al., 2013). In zellulären Assays mit INA6 Zellen konnte mit diesen Substanzen ein apoptotischer Effekt erzeugt werden (Li et al., 2017). Da der zugrundeliegende zelluläre Mechanismus gänzlich unbekannt ist, wurde, mittels Anreicherungsversuchen in Kombination mit quantitativen MS-Messungen, die Zielproteine dieser Substanzen identifiziert (siehe Kapitel 5.2). Hierzu wurden verschiedene Naphtylisochinoline an unterschiedlichen Stellen über einen Linker mit Biotin markiert, um sie an magnetischen Beads zu immobilisieren (Abbildung 73). Die organische Synthese der Substanzen BG135 und BG138 wurde von Raina Seupel (AG Bringmann) durchgeführt.

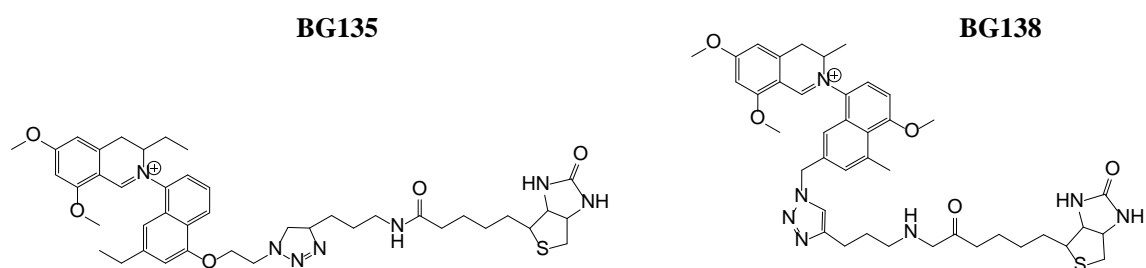


Abbildung 73: **Strukturformeln der Naphtylisochinoline BG135 und BG138.**

Die biotinylierten Naphtylisochinoline wurden an magnetische Beads immobilisiert und mit INA6 Zelllysate inkubiert, um die zellulären Zielproteine mittels LC-MS/MS zu identifizieren. Die Synthese beider Substanzen wurde von Raina Seupel (AG Bringmann; Organische Chemie) durchgeführt.

5.2.3.1 Identifizierung zellulärer Targets der Substanz BG135

Um zu untersuchen, welche Proteine an Substanz BG135 binden, wurde sie an magnetische Streptavidin-Beads immobilisiert, mit INA6 Zelllysate inkubiert, gewaschen und die gebundenen Proteine eluiert. Nach der Fällung der Proteine mit Aceton wurden die Proteine in Lösung verdaut. Wie in Kapitel 5.2.2.1 beschrieben, wurde ebenfalls eine Bead-Kontrolle verwendet, um zwischen spezifischen und unspezifischen Bindungspartnern an die Beads oder den Inhibitor zu unterscheiden. Alle gebundenen Proteine wurden mittels LC-MS/MS gemessen und mit Maxquant analysiert. Für den Datensatz aus Abbildung 74 wurden drei Replikate verwendet und die Proteinverhältnisse zwischen Kontrolle und Inhibitor gebildet und gegen die Proteinintensitäten aufgetragen.

Der Großteil der Proteine, die als offene Kreise markiert sind, sind mit der Kontrolle und dem Inhibitor gleichermaßen angereicherte unspezifische Proteine. Mit der Bead-Kontrolle wurden Carboxylasen und zugehörige mitochondriale Proteine angereichert, was für die Funktionalität der verwendeten Streptavidin-Beads steht. Jedes signifikant angereicherte Protein ist ein möglicher Bindungspartner von BG135 bzw. ein Interaktionspartner eines BG135-Bindungspartners. Anhand dieser Daten ist es allerdings nicht möglich, zwischen direkten und indirekten Interaktoren zu unterscheiden.

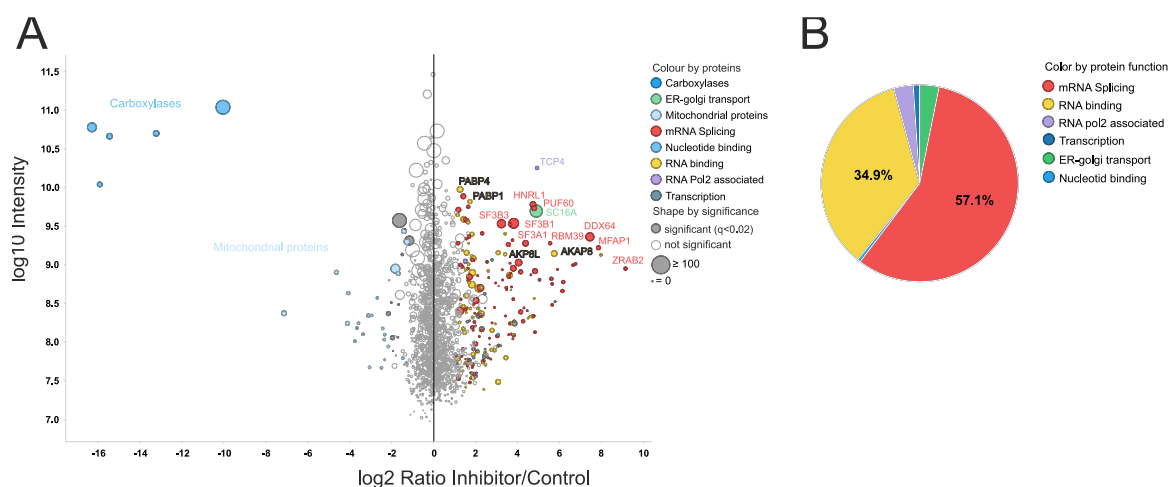


Abbildung 74: **Identifizierung von potentiellen Zielproteinen, die mit Substanz BG135 aus einem INA6 Zelllysate angereichert wurden.**

A) Proteine, die im Vergleich zur Kontrolle signifikant (Benjamini-Hochberg adjusted limma p-value < 0.02) angereichert wurden sind als geschlossene Kreise markiert. Proteinverhältnisse und –intensitäten sind Medianwerte von 3 biologischen Replikaten (n Replikate > 1). Die Größe der Kreise korreliert mit der Anzahl der identifizierten Peptide (razor and unique). Proteine der gleichen Familie oder derselben Funktion sind mit einer Farbe markiert. Mit der Beadkontrolle wurden speziell Carboxylasen angereichert, da diese Biotin als prosthetische Gruppe enthalten. B) Prozentuale Darstellung der Proteine mit derselben Funktion, die mit Substanz BG135 signifikant angereichert wurden.

Die Proteine, die mit dem Naphtylisochinolin BG135 angereichert wurden, (insgesamt 204) lassen sich hauptsächlich in zwei verschiedene Funktionen unterteilen, die sich aber auch überschneiden (Abbildung 74). Die erste Gruppe ist die der RNA-bindenden Proteine. Insgesamt wurden 66 Proteine signifikant angereicht, von denen bekannt ist, dass sie RNA binden. Hierzu gehören acht RNA-binding proteins (RBMs). Von diesen acht Proteinen haben vier Proteine zudem die Funktion mRNA zu Spleißen. Von der Gruppe der Proteine, die mit dem Spleißen von mRNA in Verbindung stehen, wurden 108 Proteine signifikant angereicht. Weitere Proteine dieser Gruppe sind: Drei UEs des Splicing Factor 3A, sechs UEs des Splicing Factor 3B und acht Serine/arginine-rich Splicing Faktoren. Es konnte bereits gezeigt werden, dass der Splicing Factor 3A

essentiell für das Splicen von pre-mRNA *in vivo* ist (Tanackovic and Kramer, 2005). Zusammen machen die RNA bindenden Proteine und die mRNA spleißenden Proteine 90 % der signifikant angereicherten Proteine aus. Die restlichen 10 % der angereicherten Proteine verteilen sich auf RNA Polymerase assoziierte Proteine, Proteine der Transkription, Proteine des ER-Golgi-Transportes und nukleotidbindende Proteine.

5.2.3.2 Identifizierung zellulärer Targets der Substanz BG138

Um den Einfluss des Linkers an den biotinylierten Naphtylisochinolinen genauer zu untersuchen, wurde Substanz BG138 von Raina Seupel (AG Bringmann) synthetisiert. Im Vergleich zu Substanz BG 135 wurde der Linker nicht an der 4'- sondern an der 2'-Position des Moleküls angefügt. (Abbildung 73).

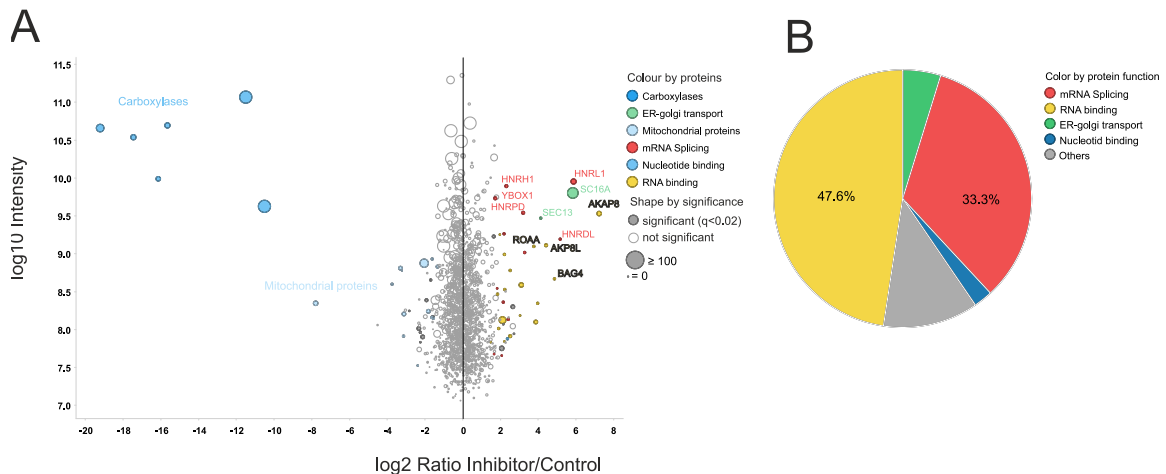


Abbildung 75: **Identifizierung von potentiellen Zielproteinen, die mit Substanz BG138 aus einem INA6 Zelllysats angereichert wurden.**

A) Proteine, die im Vergleich zur Kontrolle signifikant (Benjamini-Hochberg adjusted limma p-value < 0.02) angereichert wurden, sind als geschlossene Kreise markiert. Proteinverhältnisse und –intensitäten sind Medianwerte von 3 biologischen Replikaten (n Replikate > 1). Die Größe der Kreise korreliert mit der Anzahl der identifizierten Peptide (razor and unique). Proteine der gleichen Familie oder derselben Funktion sind mit einer Farbe markiert. Mit der Beadkontrolle wurden speziell Carboxylasen angereicht, da diese Biotin als prosthetische Gruppe enthalten. B) Prozentuale Darstellung der Proteine mit derselben Funktion, die mit Substanz BG138 signifikant angereichert wurden.

Substanz BG138 wurde genau wie Substanz BG135 an magnetische Beads gekoppelt, mit INA6 Zelllysats inkubiert, die Bindungspartner eluiert und die Proteine mittels LC-MS/MS analysiert (Abbildung 75). Die mit Substanz BG138 angereicherten Proteine überlappen zu 90 % mit den Proteinen, die mit Substanz BG135 identifiziert wurden. Wiederum sind vor allem Proteine angereichert worden, die mit dem Spleißen von mRNA und mit der Bindung an RNA involviert sind. Hierzu gehören die Proteine

AKAP8 und AKP8L, die sowohl am Spleißen als auch bei der RNA-Bindung eine Rolle spielen (Hu et al., 2016).

Die AKAP-Proteine haben die Funktion, die regulatorische Untereinheit der Proteinkinase A (PKA) zu verankern. AKAP8 ist zudem im Zellkern und hat die Aufgabe den Zellzyklus zu regulieren. Dazu gehört auch die Regulation der Expression von Proteinen des Zellzyklus (Skroblin et al., 2010). Die Inhibition des Zellzyklus über die potentiellen Zielproteine AKAP8 und AKAP8L ist eine mögliche Erklärung für die apoptotische Wirkung der Naphtylisochinoline.

5.2.3.3 Zielproteine der Naphtylisochinoline

Mit den beiden Naphtylisochinolinolinen BG135 und BG138 wurden hauptsächlich Proteine angereichert, die mRNA spleißen oder RNA binden. Beide Inhibitoren unterscheiden sich jedoch in der Anzahl der angereicherten Proteine. Mit BG135 wurden 204 potentielle Bindungspartner angereichert, davon sind 66 RNA-bindende Proteine und 108 Proteine, die am Spleißen von mRNA beteiligt sind. Im Vergleich hierzu wurden mit der Substanz BG138 nur 38 Proteine angereichert. Davon sind 20 RNA-bindende Proteine und 14 Proteine, die in das Spleißen von mRNA involviert sind. Die Inhibitoren BG135 und BG138 unterschieden sich hauptsächlich in der Linkerposition (Abbildung 73). Insgesamt betrachtet weisen die potentiellen Zielproteine der beiden Inhibitoren den gleichen funktionellen Zusammenhang auf. Die kleinere Anzahl an angereicherten Proteinen mit BG138 deutet darauf hin, dass die veränderte Linkerposition einen Einfluss auf die Spezifität der Proteinbindung hat.

Die Wirkung der Naphtylisochinoline auf transkriptioneller Ebene ist eine mögliche Erklärung für die Wirkung auf MM-Zellen und den Malariaerreger *Plasmodium falciparum* (Li et al., 2017). Da Krebszellen sich schnell und unkontrolliert teilen, sind sie besonders darauf angewiesen, in kurzer Zeit viele Proteine zu synthetisieren, die für die Zellteilung wichtig sind. Um diesen Effekt auf die Transkription und das Spleißen in den Zellen zu bestätigen, wäre eine quantitative Analyse von Transkriptionsmarkern mittels Microarray zielführend. Hierbei könnten alle Gene, die mit dem Spleißen von mRNA in Verbindung stehen, auf veränderte Expression, nach Zugabe eines Naphtylisochinolins, überprüft werden.

Ein möglicher mikroskopischer Assay wäre zudem die Überprüfung der Lokalisierung von sogenannten *Nuclear Speckles*, die für das Splicen von pre-mRNA und die Verteilung von mRNA im Cytoplasma verantwortlich sind. Durch den Inhibitor Spliceostatin A, der an den Splicing Faktor 3A bindet und dadurch das Spleißen beeinflusst, konnte gezeigt werden, dass es zu einer veränderten Verteilung der mRNA und der *Nuclear Speckles* kommt (Kaida et al., 2007). *Nuclear Speckles* sind Kompartimente, die aus Splicing-Proteinen und pre-mRNA bestehen und an denen das Spleißen der pre-mRNA stattfindet. Normalerweise sind sie im gesamten Zellkern verteilt. Inhibiert man den Splicing Faktor 3A, wandern sie zur Kernperipherie. mRNA, die nach dem Splicen ins Cytoplasma exportiert wird, akkumuliert nach der Behandlung mit Spliceostatin A ebenfalls an der Peripherie des Zellkerns.

Da der verwendete Linker sich von dem Linker der α -acyl Aminocarboxamide unterscheidet, muss dieser auch auf Proteinbindungen untersucht werden, um auszuschließen, dass Proteine spezifisch daran binden.

5.2.3.4 Fazit zur Identifizierung der potentiellen Targets von Naphtylisochinolin

Mit den beiden Naphtylisochinolin BG135 und BG138 konnten jeweils spezifisch RNA-bindende Proteine und Proteine, die mit dem Spleißen von mRNA in Verbindung stehen, angereichert werden. Der Splicing factor 3B, der sich unter den angereicherten Targets befindet, ist essentiell für das Spleißen von pre-mRNA. Die Wirkung der Naphtylisochinoline auf transkriptioneller Ebene muss nun in Folgeexperimenten bestätigt werden. Hierzu könnte die Analyse von Transkriptionsmarkern mittels Microarray verwendet werden.

6 Abkürzungsverzeichnis

6.1 Allgemein

°C	Grad <u>C</u> elsius
µg	<u>M</u> ikro <u>g</u> ramm
µL	<u>M</u> ikro <u>l</u> iter
µm	<u>M</u> ikro <u>m</u> eter
µM	<u>M</u> ikro <u>m</u> olar
µs	<u>M</u> ikro <u>s</u> ekunde
ABC	Ammoniumhydrogencarbonat (engl.: <u>A</u> mmonium <u>b</u> icarbonate)
ACN	<u>A</u> cet <u>n</u> itril
BS3	<u>B</u> is(<u>s</u> ulfosuccinimidyl)suberat
BCA	Bicinchoninsäure (engl.: <u>A</u> icin <u>C</u> honinic <u>A</u> cid)
BSA	<u>B</u> ovines <u>S</u> erum <u>a</u> lbumin
ca.	<u>c</u> ir <u>a</u>
CETSA	Cellular Thermal Shift Assay
CID <u>D</u> issociation	Kollisionsinduzierte Dissoziation (eng.: <u>C</u> ollision- <u>I</u> nduced)
cm	Zenti <u>m</u> eter (centi von lat.: <u>c</u> entum = 100)
Co-IP	<u>C</u> o- <u>I</u> mmunpräzi <u>p</u> itation

Da	<u>D</u>alton (Atomare Masseneinheit)
DMSO	<u>D</u>imethyl<u>s</u>ulfo<u>x</u>id
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl.: <u>D</u>eoxyribo<u>N</u>ucleic <u>A</u>cid))
DNA-PK <u>K</u>inase)	DNA-abhängige Proteinkinase (engl.: <u>D</u>NA dependent <u>P</u>rotein <u>K</u>inase))
DSSO	<u>D</u>isuccinimidyl<u>s</u>ulfo<u>x</u>id
DTT	<u>D</u>ithio<u>t</u>hreitol
<i>E. coli</i>	<u>E</u>scherichia <u>c</u>oli (Modellorganismus)
EDTA acid)	Ethylendiamintetraessigsäure (engl.: <u>E</u>thylene<u>D</u>iamine<u>T</u>etra<u>A</u>cetic acid))
EI	<u>E</u>lektronenstoß<u>i</u>onisation
ESI	<u>E</u>lektrospray<u>i</u>onisation
et al.	und andere (lat.: <u>e</u>t <u>a</u>lii)
ETD	<u>E</u>lectron <u>T</u>ransfer <u>D</u>issociation
FAB	<u>F</u>ast <u>A</u>tom <u>B</u>ombardment
FDR	<u>F</u>alse <u>D</u>iscovery <u>R</u>ate
FRET	<u>F</u>örster-<u>R</u>esonanz<u>e</u>nergie<u>t</u>ransfer
FT-ICR	<u>F</u>ourier-<u>T</u>ransform <u>I</u>on <u>C</u>yclotron <u>R</u>esonance
FWHM	Halbwertsbreite (engl.: <u>F</u>ull <u>W</u>idth at <u>H</u>alf <u>M</u>aximum)
g	<u>G</u>ramm

x g	Erdbeschleunigung (g ravitation)
GA	G lutar a ldehyd
h	Stunde (lat.: h ora)
HCD	H igher-energy C ollisional D issociation
Hz	H ertz
IAA	I od a cet a mid
iBAQ	Intensitätsbasierte absolute Quantifizierung (engl.: i ntensity B ased A bsolute Q uantification)
IP	I mmunpräzi p itation
IT	Ionenfalle (engl.: I on T rap)
ITRAQ	Isobare Markierungen für die relative und absolute Quantifizierung (engl.: Isobaric T ags for R elative and A bsolute Q uantitation)
kDa	K ilo d alton
kg	K ilo g ramm
l	L iter
lat.	l ateinisch
LC	Flüssigkeitschromatographie (engl.: L iquid C hromatographie)
LC-MS/MS	Flüssigkeitschromatographie Tandem Massenspektrometrie L iquid C hromatography Tandem M ass S pectrometry

Log	<u>L</u>ogarithmus
LTQ	Lineare Ionenfalle (eng.: <u>L</u>inear <u>T</u>rap <u>Q</u>adrupol)
m	<u>M</u>eter
M	<u>M</u>olar
MALDI	Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation (engl.: <u>M</u>atrix-<u>a</u>ssisted <u>L</u>aser <u>D</u>esorption/<u>I</u>onization)
MaxLFQ	<u>M</u>axquant <u>L</u>abel <u>F</u>ree <u>Q</u>uantification
mg	<u>M</u>illigramm
min	<u>M</u>inute
mL	<u>M</u>illiliter
MM	<u>M</u>ultiples <u>M</u>yelom
MOPS	<u>M</u>orpholino-<u>P</u>ropansulfonsäure
MS	<u>M</u>assenspektrometer
MS ¹	Übersichtsscan
MS/MS; MS ²	Tandem-Massenspektrometrie
MS ⁿ	n-stufige Tandem-Massenspektrometrie
m/z	Masse-zu-Ladungsverhältnis
nm	<u>N</u>anometer
NHS	<u>N</u>-<u>H</u>ydroxysuccinimid

NMR	Kernspinresonanz (engl.: N uclear M agnetic R esonance)
NP40	N onidet P - 40
OD	O ptische D ichte
PAGE	P oly a crylamid g el e lektrophorese
PEG	P oly e thyleng l ycol
PPM	Teile pro Million (engl.: P arts P er M illion)
PTM	P ost t ranslationale M odifikationen
QIT	Q uadrupol I on T rap
QTOF	Q uadrupol T ime O f F light
RT	R aum t emperatur
RPM	Umdrehungen pro Minute (engl.: R evolutions P er M inute)
s	S ekunde
Sulfo-SBED	Sulfo -N-hydroxysuccinimidyl-2-(6-[b iotinamido]-2-(p-azido benzamido)-hexanoamido) e thyl-1,3'- d ithiopropionate
SDC	Natriumdesoxycholat (engl.: S odium D eoxy ch olate)
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl.: S odium D odecyl s ulfate)
SEV	S ekundäre e lektronen v ervielfacher
SILAC	S t a ble I sotop L abeling with A mino acid in C ell culture
SMCC	S ulfosuccinimidyl 4-(N- m aleimidomethyl)cyclohexane-1- c arboxylate

TOF	Flugzeitanalysator (engl.: T ime O f F light)
TRIS	T ris(hydroxymethyl)-aminomethan
UE	U nter e inheit
UBX	U biquitin R egulatory X
UV	U ltraviolett
V	V olt
XIC	Extrahiertes Ionenchromatogramm (engl.: e xtracted i on c hromatogram)
XL	Crosslink
z	Ladung
z.b.	z um B eispiel
π	Kreiszahl Pi
ω	Winkelgeschwindigkeit

6.2 Aminosäuren

Name	3-letter Symbol	1-letter Symbol	Monoisotopische Masse (residue)
Alanin	Ala	A	71.03711
Arginin	Arg	R	156.10111
Asparagin	Asn	N	114.04293
Asparaginsäure	Asp	D	115.02694
Cystein	Cys	C	103.00919
Glutaminsäure	Glu	E	129.04259
Glutamin	Gln	Q	128.05858
Glycin	Gly	G	57.05
Histidin	His	H	137.05891
Isoleucin	Ile	I	113.08406
Leucin	Leu	L	113.08406
Lysin	Lys	K	128.09496
Methionin	Met	M	131.04049
Phenylalanin	Phe	F	147.06841
Prolin	Pro	P	97.05276
Serin	Ser	S	87.03203
Threonin	Thr	T	101.04768
Tryptophan	Trp	W	186.07931
Tyrosin	Tyr	Y	163.06333
Valin	Val	V	99.06841

7 Literaturverzeichnis

Ahrends, R., Kosinski, J., Kirsch, D., Manelyte, L., Giron-Monzon, L., Hummerich, L., Schulz, O., Spengler, B., and Friedhoff, P. (2006). Identifying an interaction site between MutH and the C-terminal domain of MutL by crosslinking, affinity purification, chemical coding and mass spectrometry. *Nucleic Acids Res* *34*, 3169-3180.

Asial, I., Cheng, Y.X., Engman, H., Dollhopf, M., Wu, B.H., Nordlund, P., and Cornvik, T. (2013). Engineering protein thermostability using a generic activity-independent biophysical screen inside the cell. *Nat Commun* *4*.

Bach, M., Lehmann, A., Brännert, D., Vanselow, J.T., Hartung, A., Bargou, R.C., Holzgrabe, U., Schlosser, A., and Chatterjee, M. (2017). Ugi reaction-derived alpha-acyl aminocarboxamides bind to phosphatidylinositol 3-kinase-related kinases, inhibit HSF1-dependent heat shock response, and induce apoptosis in multiple myeloma cells. *J Med Chem*.

Back, J.W., de Jong, L., Muijsers, A.O., and de Koster, C.G. (2003). Chemical cross-linking and mass spectrometry for protein structural modeling. *Journal of molecular biology* *331*, 303-313.

Bantscheff, M., Eberhard, D., Abraham, Y., Bastuck, S., Boesche, M., Hobson, S., Mathieson, T., Perrin, J., Raida, M., Rau, C., *et al.* (2007). Quantitative chemical proteomics reveals mechanisms of action of clinical ABL kinase inhibitors. *Nat Biotechnol* *25*, 1035-1044.

Barber, M., Bordoli, R.S., Sedgwick, R.D., and Tyler, A.N. (1981). Fast Atom Bombardment of Solids (Fab) - a New Ion-Source for Mass-Spectrometry. *J Chem Soc Chem Comm*, 325-327.

Baretic, D., and Williams, R.L. (2014). PIKKs - the solenoid nest where partners and kinases meet. *Current opinion in structural biology* *29*, 134-142.

Bauer, A., and Kuster, B. (2003). Affinity purification-mass spectrometry - Powerful tools for the characterization of protein complexes. *Eur J Biochem* *270*, 570-578.

Benjamini, Y., and Hochberg, Y. (1995). Controlling the False Discovery Rate - a Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *J Roy Stat Soc B Met* *57*, 289-300.

Beth, A.H., Conturo, T.E., Venkataramu, S.D., and Staros, J.V. (1986). Dynamics and Interactions of the Anion Channel in Intact Human-Erythrocytes - an Electron-Paramagnetic Resonance Spectroscopic Study Employing a New Membrane-Impermeant Bifunctional Spin-Label. *Biochemistry-U.S.* *25*, 3824-3832.

Biemann, K. (1992). Mass spectrometry of peptides and proteins. *Annu Rev Biochem* *61*, 977-1010.

Boersema, P.J., Raijmakers, R., Lemeer, S., Mohammed, S., and Heck, A.J.R. (2009). Multiplex peptide stable isotope dimethyl labeling for quantitative proteomics. *Nat Protoc* *4*, 484-494.

Bose, R., Holbert, M.A., Pickin, K.A., and Cole, P.A. (2006). Protein tyrosine kinase-substrate interactions. *Current opinion in structural biology* *16*, 668-675.

- Brenner, H., Gonds, A., and Pulte, D. (2008). Recent major improvement in long-term survival of younger patients with multiple myeloma. *Blood* *111*, 2521-2526.
- Brewer, C.F., and Riehm, J.P. (1967). Evidence for Possible Nonspecific Reactions between N-Ethylmaleimide and Proteins. *Anal Biochem* *18*, 248-&.
- Bringmann, G., Zhang, G.L., Ölschläger, T., Stich, A., Wu, J., Chatterjee, M., and Brun, R. (2013). Highly selective antiplasmodial naphthylisoquinoline alkaloids from *Ancistrocladus tectorius*. *Phytochemistry* *91*, 220-228.
- Bruderer, R.M., Brasseur, C., and Meyer, H.H. (2004). The AAA ATPase p97/VCP interacts with its alternative co-factors, Ufd1-Npl4 and p47, through a common bipartite binding mechanism. *J Biol Chem* *279*, 49609-49616.
- Calderwood, S.K., Khaleque, M.A., Sawyer, D.B., and Ciocca, D.R. (2006). Heat shock proteins in cancer: chaperones of tumorigenesis. *Trends Biochem Sci* *31*, 164-172.
- Cameron, A.E., and Eggers, D.F. (1948). An Ion Velocitron. *Rev Sci Instrum* *19*, 605-607.
- Cevher, M.A., Shi, Y., Li, D., Chait, B.T., Malik, S., and Roeder, R.G. (2014). Reconstitution of active human core Mediator complex reveals a critical role of the MED14 subunit. *Nat Struct Mol Biol*.
- Chen, R., Kang, R., Fan, X.G., and Tang, D. (2014). Release and activity of histone in diseases. *Cell Death Dis* *5*.
- Chen, Z.A., Jawhari, A., Fischer, L., Buchen, C., Tahir, S., Kamenski, T., Rasmussen, M., Lariviere, L., Bukowski-Wills, J.C., Nilges, M., *et al.* (2010). Architecture of the RNA polymerase II-TFIIF complex revealed by cross-linking and mass spectrometry. *Embo J* *29*, 717-726.
- Chendrimada, T.P., Gregory, R.I., Kumaraswamy, E., Norman, J., Cooch, N., Nishikura, K., and Shiekhattar, R. (2005). TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature* *436*, 740-744.
- Cheng, K.W., Wong, C.C., Wang, M.F., He, Q.Y., and Chen, F. (2010). Identification and Characterization of Molecular Targets of Natural Products by Mass Spectrometry. *Mass spectrometry reviews* *29*, 126-155.
- Clifford-Nunn, B., Showalter, H.D., and Andrews, P.C. (2012). Quaternary diamines as mass spectrometry cleavable crosslinkers for protein interactions. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* *23*, 201-212.
- Collart, M.A., and Panasenko, O.O. (2012). The Ccr4-Not complex. *Gene* *492*, 42-53.
- Combe, C.W., Fischer, L., and Rappsilber, J. (2015). xiNET: Cross-link Network Maps With Residue Resolution. *Molecular & Cellular Proteomics* *14*, 1137-1147.
- Comisarow, M.B., and Marshall, A.G. (1974). Fourier-Transform Ion-Cyclotron Resonance Spectroscopy. *Chem Phys Lett* *25*, 282-283.
- Cox, J., Hein, M.Y., Lubner, C.A., Paron, I., Nagaraj, N., and Mann, M. (2014). Accurate Proteome-wide Label-free Quantification by Delayed Normalization and Maximal Peptide Ratio Extraction, Termed MaxLFQ. *Molecular & Cellular Proteomics* *13*, 2513-2526.

- Cox, J., and Mann, M. (2008). MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nat Biotechnol* 26, 1367-1372.
- Craig, R., Cortens, J.C., Fenyo, D., and Beavis, R.C. (2006). Using annotated peptide mass spectrum libraries for protein identification. *Journal of proteome research* 5, 1843-1849.
- Creasy, D.M., and Cottrell, J.S. (2002). Error tolerant searching of uninterpreted tandem mass spectrometry data. *Proteomics* 2, 1426-1434.
- Dahlstrom, K.M., and Salminen, T.A. (2015). 3D model for Cancerous Inhibitor of Protein Phosphatase 2A armadillo domain unveils highly conserved protein-protein interaction characteristics. *J Theor Biol* 386, 78-88.
- de Billy, E., Powers, M.V., Smith, J.R., and Workman, P. (2009). Drugging the heat shock factor 1 pathway Exploitation of the critical cancer cell dependence on the guardian of the proteome. *Cell Cycle* 8, 3806-3808.
- Dentan, C., Tselepis, A.D., Chapman, M.J., and Ninio, E. (1996). Pefabloc, 4-[2-aminoethyl]benzenesulfonyl fluoride, is a new, potent nontoxic and irreversible inhibitor of PAF-degrading acetylhydrolase. *Bba-Lipid Lipid Met* 1299, 353-357.
- Dephoure, N., and Gygi, S.P. (2012). Hyperplexing: A Method for Higher-Order Multiplexed Quantitative Proteomics Provides a Map of the Dynamic Response to Rapamycin in Yeast. *Sci Signal* 5.
- Deracinois, B., Flahaut, C., Duban-Deweere, S., and Karamanos, Y. (2013). Comparative and Quantitative Global Proteomics Approaches: An Overview. *Proteomes* 1, 180-218.
- Dole, M., Mack, L.L., and Hines, R.L. (1968). Molecular Beams of Macroions. *J Chem Phys* 49, 2240-&.
- Dreveny, I., Pye, V.E., Beuron, F., Briggs, L.C., Isaacson, R.L., Matthews, S.J., McKeown, C., Yuan, X., Zhang, X., and Freemont, P.S. (2004). P97 and close encounters of every kind: a brief review. *Biochem Soc T* 32, 715-720.
- El-Aneed, A., Cohen, A., and Banoub, J. (2009). Mass Spectrometry, Review of the Basics: Electrospray, MALDI, and Commonly Used Mass Analyzers. *Appl Spectrosc Rev* 44, 210-230.
- Elias, J.E., and Gygi, S.P. (2007). Target-decoy search strategy for increased confidence in large-scale protein identifications by mass spectrometry. *Nat Methods* 4, 207-214.
- Elliott, M.H., Smith, D.S., Parker, C.E., and Borchers, C. (2009). Current trends in quantitative proteomics. *J Mass Spectrom* 44, 1637-1660.
- Fenn, J.B., Mann, M., Meng, C.K., Wong, S.F., and Whitehouse, C.M. (1989). Electrospray Ionization for Mass-Spectrometry of Large Biomolecules. *Science* 246, 64-71.
- Fields, S., and Song, O. (1989). A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 340, 245-246.
- Förster, T. (1948). *Zwischenmolekulare Energiewanderung Und Fluoreszenz. *Ann Phys-Berlin* 2, 55-75.

- Frese, C.K., Altelaar, A.F.M., Hennrich, M.L., Nolting, D., Zeller, M., Griep-Raming, J., Heck, A.J.R., and Mohammed, S. (2011). Improved Peptide Identification by Targeted Fragmentation Using CID, HCD and ETD on an LTQ-Orbitrap Velos. *Journal of proteome research* *10*, 2377-2388.
- Frewen, B.E., Merrihew, G.E., Wu, C.C., Noble, W.S., and MacCoss, M.J. (2006). Analysis of peptide MS/MS spectra from large-scale proteomics experiments using spectrum libraries. *Analytical chemistry* *78*, 5678-5684.
- Fritzsche, R., Ihling, C.H., Götze, M., and Sinz, A. (2012). Optimizing the enrichment of cross-linked products for mass spectrometric protein analysis. *Rapid Commun Mass Sp* *26*, 653-658.
- Fujii, N., Jacobsen, R.B., Wood, N.L., Schoeniger, J.S., and Guy, R.K. (2004). A novel protein crosslinking reagent for the determination of moderate resolution protein structures by mass spectrometry (MS3-D). *Bioorg Med Chem Lett* *14*, 427-429.
- Geiger, T., Wehner, A., Schaab, C., Cox, J., and Mann, M. (2012). Comparative Proteomic Analysis of Eleven Common Cell Lines Reveals Ubiquitous but Varying Expression of Most Proteins. *Molecular & Cellular Proteomics* *11*.
- Giot, L., Bader, J.S., Brouwer, C., Chaudhuri, A., Kuang, B., Li, Y., Hao, Y.L., Ooi, C.E., Godwin, B., Vitols, E., *et al.* (2003). A protein interaction map of *Drosophila melanogaster*. *Science* *302*, 1727-1736.
- Glatter, T., Ludwig, C., Ahrne, E., Aebersold, R., Heck, A.J.R., and Schmidt, A. (2012). Large-Scale Quantitative Assessment of Different In-Solution Protein Digestion Protocols Reveals Superior Cleavage Efficiency of Tandem Lys-C/Trypsin Proteolysis over Trypsin Digestion. *Journal of proteome research* *11*, 5145-5156.
- Gonzalez, D., van der Burg, M., Garcia-Sanz, R., Fenton, J.A., Langerak, A.W., Gonzalez, M., van Dongen, J.J.M., Miguel, J.F.S., and Morgan, G.J. (2007). Immunoglobulin gene rearrangements and the pathogenesis of multiple myeloma. *Blood* *110*, 3112-3121.
- Götze, M., Pettelkau, J., Schaks, S., Bosse, K., Ihling, C.H., Krauth, F., Fritzsche, R., Kuhn, U., and Sinz, A. (2012). StavroX-A Software for Analyzing Crosslinked Products in Protein Interaction Studies. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* *23*, 76-87.
- Gubitz, A.K., Feng, W.Q., and Dreyfuss, G. (2004). The SMN complex. *Exp Cell Res* *296*, 51-56.
- Haaf, E., and Schlosser, A. (2012). Peptide and Protein Quantitation by Acid-Catalyzed O-18-Labeling of Carboxyl Groups. *Analytical chemistry* *84*, 304-311.
- Hajkova, D., Rao, K.C.S., and Miyagi, M. (2006). pH dependency of the carboxyl oxygen exchange reaction catalyzed by lysyl endopeptidase and trypsin. *Journal of proteome research* *5*, 1667-1673.
- Han, X.M., Aslanian, A., and Yates, J.R. (2008). Mass spectrometry for proteomics. *Curr Opin Chem Biol* *12*, 483-490.
- Hänzelmann, P., Buchberger, A., and Schindelin, H. (2011). Hierarchical Binding of Cofactors to the AAA ATPase p97. *Structure* *19*, 833-843.

- Harding, M.W., Galat, A., Uehling, D.E., and Schreiber, S.L. (1989). A Receptor for the Immunosuppressant Fk506 Is a Cis-Trans Peptidyl-Prolyl Isomerase. *Nature* 341, 758-760.
- Heide, H., Bleier, L., Steger, M., Ackermann, J., Drose, S., Schwamb, B., Zornig, M., Reichert, A.S., Koch, I., Wittig, I., *et al.* (2012). Complexome Profiling Identifies TMEM126B as a Component of the Mitochondrial Complex I Assembly Complex. *Cell Metab* 16, 538-549.
- Herzog, F., Kahraman, A., Boehringer, D., Mak, R., Bracher, A., Walzthoeni, T., Leitner, A., Beck, M., Hartl, F.U., Ban, N., *et al.* (2012). Structural probing of a protein phosphatase 2A network by chemical cross-linking and mass spectrometry. *Science* 337, 1348-1352.
- Hopp, T.P., and Woods, K.R. (1981). Prediction of Protein Antigenic Determinants from Amino-Acid-Sequences. *P Natl Acad Sci-Biol* 78, 3824-3828.
- Hu, J., Khodadadi-Jamayran, A., Mao, M.W., Shah, K., Yang, Z.H., Nasim, M.T., Wang, Z.F., and Jiang, H. (2016). AKAP95 regulates splicing through scaffolding RNAs and RNA processing factors. *Nat Commun* 7.
- Hu, Q.Z., Noll, R.J., Li, H.Y., Makarov, A., Hardman, M., and Cooks, R.G. (2005). The Orbitrap: a new mass spectrometer. *J Mass Spectrom* 40, 430-443.
- Huang, J.R., Nueda, A., Yoo, S., and Dynan, W.S. (1997). Heat shock transcription factor 1 binds selectively in vitro to Ku protein and the catalytic subunit of the DNA-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 272, 26009-26016.
- Hunt, D.F., Yates, J.R., Shabanowitz, J., Winston, S., and Hauer, C.R. (1986). Protein Sequencing by Tandem Mass-Spectrometry. *P Natl Acad Sci USA* 83, 6233-6237.
- Imasaki, T., Calero, G., Cai, G., Tsai, K.L., Yamada, K., Cardelli, F., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Berger, I., Kornberg, G.L., *et al.* (2011). Architecture of the Mediator head module. *Nature* 475, 240-U245.
- Isaacson, R.L., Pye, V.E., Simpson, P., Meyer, H.H., Zhang, X.D., Freemont, P.S., and Matthews, S. (2007). Detailed structural insights into the p97-Npl4-Ufd1 interface. *J Biol Chem* 282, 21361-21369.
- Ishihama, Y., Oda, Y., Tabata, T., Sato, T., Nagasu, T., Rappsilber, J., and Mann, M. (2005). Exponentially modified protein abundance index (emPAI) for estimation of absolute protein amount in proteomics by the number of sequenced peptides per protein. *Molecular & Cellular Proteomics* 4, 1265-1272.
- Ito, T., Chiba, T., Ozawa, R., Yoshida, M., Hattori, M., and Sakaki, Y. (2001). A comprehensive two-hybrid analysis to explore the yeast protein interactome. *P Natl Acad Sci USA* 98, 4569-4574.
- Jares-Erijman, E.A., and Jovin, T.M. (2003). FRET imaging. *Nat Biotechnol* 21, 1387-1395.
- Kaida, D., Motoyoshi, H., Tashiro, E., Nojima, T., Hagiwara, M., Ishigami, K., Watanabe, H., Kitahara, T., Yoshida, T., Nakajima, H., *et al.* (2007). Spliceostatin A targets SF3b and inhibits both splicing and nuclear retention of pre-mRNA. *Nat Chem Biol* 3, 576-583.

- Kalkhof, S., and Sinz, A. (2008). Chances and pitfalls of chemical cross-linking with amine-reactive N-hydroxysuccinimide esters. *Anal Bioanal Chem* 392, 305-312.
- Kall, L., Storey, J.D., MacCoss, M.J., and Noble, W.S. (2008). Assigning significance to peptides identified by tandem mass spectrometry using decoy databases. *Journal of proteome research* 7, 29-34.
- Kao, A.H., Chiu, C.L., Vellucci, D., Yang, Y.Y., Patel, V.R., Guan, S.H., Randall, A., Baldi, P., Rychnovsky, S.D., and Huang, L. (2011). Development of a Novel Cross-linking Strategy for Fast and Accurate Identification of Cross-linked Peptides of Protein Complexes. *Molecular & Cellular Proteomics* 10.
- Karas, M., Bachmann, D., Bahr, U., and Hillenkamp, F. (1987). Matrix-Assisted Ultraviolet-Laser Desorption of Nonvolatile Compounds. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes* 78, 53-68.
- Karas, M., Glückmann, M., and Schäfer, J. (2000). Ionization in matrix-assisted laser desorption/ionization: singly charged molecular ions are the lucky survivors. *J Mass Spectrom* 35, 1-12.
- Kim, D., Kim, S.H., and Li, G.C. (1999). Proteasome inhibitors MG132 and lactacystin hyperphosphorylate HSF1 and induce hsp70 and hsp27 expression. *Biochem Biophys Res Co* 254, 264-268.
- Kondo, H., Rabouille, C., Levine, T.P., and Warren, G. (1997). p47 is a cofactor for p97-mediated membrane fusion. *Mol Biol Cell* 8, 1719-1719.
- Krogan, N.J., Cagney, G., Yu, H.Y., Zhong, G.Q., Guo, X.H., Ignatchenko, A., Li, J., Pu, S.Y., Datta, N., Tikuisis, A.P., *et al.* (2006). Global landscape of protein complexes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* 440, 637-643.
- Lam, H., Deutsch, E.W., Eddes, J.S., Eng, J.K., King, N., Stein, S.E., and Aebersold, R. (2007). Development and validation of a spectral library searching method for peptide identification from MS/MS. *Proteomics* 7, 655-667.
- Leahy, J.J.J., Golding, B.T., Griffin, R.J., Hardcastle, I.R., Richardson, C., Rigoreau, L., and Smith, G.C.M. (2004). Identification of a highly potent and selective DNA-dependent protein kinase (DNA-PK) inhibitor (NU7441) by screening of chromenone libraries. *Bioorg Med Chem Lett* 14, 6083-6087.
- Lehmann, W.D. (2017). A Timeline of Stable Isotopes and Mass Spectrometry in the Life Sciences. *Mass spectrometry reviews* 36, 58-85.
- Leitner, A., Faini, M., Stengel, F., and Aebersold, R. (2016). Crosslinking and Mass Spectrometry: An Integrated Technology to Understand the Structure and Function of Molecular Machines. *Trends Biochem Sci* 41, 20-32.
- Leitner, A., Reischl, R., Walzthoeni, T., Herzog, F., Bohn, S., Förster, F., and Aebersold, R. (2012). Expanding the Chemical Cross-Linking Toolbox by the Use of Multiple Proteases and Enrichment by Size Exclusion Chromatography. *Molecular & Cellular Proteomics* 11.
- Leon, I.R., Schwämmle, V., Jensen, O.N., and Sprenger, R.R. (2013). Quantitative Assessment of In-solution Digestion Efficiency Identifies Optimal Protocols for Unbiased Protein Analysis. *Molecular & Cellular Proteomics* 12, 2992-3005.

- Li, J., Seupel, R., Feineis, D., Mudogo, V., Kaiser, M., Brun, R., Brännert, D., Chatterjee, M., Seo, E.J., Efferth, T., *et al.* (2017). Dioncophyllines C2, D2, and F and Related Naphthylisoquinoline Alkaloids from the Congolese Liana *Ancistrocladus ileboensis* with Potent Activities against *Plasmodium falciparum* and against Multiple Myeloma and Leukemia Cell Lines. *J Nat Prod* 80, 443-458.
- Li, S.M., Armstrong, C.M., Bertin, N., Ge, H., Milstein, S., Boxem, M., Vidalain, P.O., Han, J.D.J., Chesneau, A., Hao, T., *et al.* (2004). A map of the interactome network of the metazoan *C-elegans*. *Science* 303, 540-543.
- Liao, P.C., and Allison, J. (1995). Ionization Processes in Matrix-Assisted Laser-Desorption Ionization Mass-Spectrometry - Matrix-Dependent Formation of [M+H](+) Vs [M+Na](+) Ions of Small Peptides and Some Mechanistic Comments. *J Mass Spectrom* 30, 408-423.
- Lindquist, S. (1986). The Heat-Shock Response. *Annual Review of Biochemistry* 55, 1151-1191.
- Liu, F., and Heck, A.J.R. (2015). Interrogating the architecture of protein assemblies and protein interaction networks by cross-linking mass spectrometry. *Current opinion in structural biology* 35, 100-108.
- Liu, F., Lossel, P., Scheltema, R., Viner, R., and Heck, A.J.R. (2017). Optimized fragmentation schemes and data analysis strategies for proteome-wide cross-link identification. *Nat Commun* 8.
- Liu, F., Rijkers, D.T.S., Post, H., and Heck, A.J.R. (2015). Proteome-wide profiling of protein assemblies by cross-linking mass spectrometry. *Nat Methods* 12, 1179-+.
- Liu, N., Wu, H., Liu, H., Chen, G., and Cai, Z. (2010). Microwave-assisted 18O-labeling of proteins catalyzed by formic acid. *Analytical chemistry* 82, 9122-9126.
- Loftheim, H., Asberg, A., and Reubsæet, L. (2010). Accelerated O-18-labeling in urinary proteomics. *J Chromatogr A* 1217, 8241-8248.
- Lottspeich, F., and Engels, J.W. (2006). *Bioanalytik* (Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg).
- Lundby, A., and Olsen, J.V. (2011). GeLCMS for in-depth protein characterization and advanced analysis of proteomes. *Methods in molecular biology* 753, 143-155.
- Ma, B., Zhang, K.Z., Hendrie, C., Liang, C.Z., Li, M., Doherty-Kirby, A., and Lajoie, G. (2003). PEAKS: powerful software for peptide de novo sequencing by tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Sp* 17, 2337-2342.
- Macarron, R., Banks, M.N., Bojanic, D., Burns, D.J., Cirovic, D.A., Garyantes, T., Green, D.V.S., Hertzberg, R.P., Janzen, W.P., Paslay, J.W., *et al.* (2011). Impact of high-throughput screening in biomedical research. *Nat Rev Drug Discov* 10, 188-195.
- Makarov, A. (2000). Electrostatic axially harmonic orbital trapping: A high-performance technique of mass analysis. *Analytical chemistry* 72, 1156-1162.
- Makarov, A., Denisov, E., Kholomeev, A., Baischun, W., Lange, O., Strupat, K., and Horning, S. (2006). Performance evaluation of a hybrid linear ion trap/orbitrap mass spectrometer. *Analytical chemistry* 78, 2113-2120.

- Makarov, A., and Scigelova, M. (2010). Coupling liquid chromatography to Orbitrap mass spectrometry. *J Chromatogr A* *1217*, 3938-3945.
- Malik, S., and Roeder, R.G. (2010). The metazoan Mediator co-activator complex as an integrative hub for transcriptional regulation. *Nat Rev Genet* *11*, 761-772.
- Marshall, A.G., and Hendrickson, C.L. (2008). High-Resolution Mass Spectrometers. *Annu Rev Anal Chem* *1*, 579-599.
- Masuda, T., Tomita, M., and Ishihama, Y. (2008). Phase transfer surfactant-aided trypsin digestion for membrane proteome analysis. *Journal of proteome research* *7*, 731-740.
- Mayr, L.M., and Bojanic, D. (2009). Novel trends in high-throughput screening. *Curr Opin Pharmacol* *9*, 580-588.
- Megger, D.A., Bracht, T., Meyer, H.E., and Sitek, B. (2013). Label-free quantification in clinical proteomics. *Bba-Proteins Proteom* *1834*, 1581-1590.
- Meissner, F., and Mann, M. (2014). Quantitative shotgun proteomics: considerations for a high-quality workflow in immunology. *Nat Immunol* *15*, 112-117.
- Meyer, H.H., Shorter, J.G., Seemann, J., Pappin, D., and Warren, G. (2000). A complex of mammalian Ufd1 and Npl4 links the AAA-ATPase, p97, to ubiquitin and nuclear transport pathways. *Embo J* *19*, 2181-2192.
- Miyagi, M., and Rao, K.C. (2007). Proteolytic 18O-labeling strategies for quantitative proteomics. *Mass spectrometry reviews* *26*, 121-136.
- Molina, D.M., Jafari, R., Ignatushchenko, M., Seki, T., Larsson, E.A., Dan, C., Sreekumar, L., Cao, Y.H., and Nordlund, P. (2013). Monitoring Drug Target Engagement in Cells and Tissues Using the Cellular Thermal Shift Assay. *Science* *341*, 84-87.
- Munson, M.S.B., and Field, F.H. (1966). Chemical Ionization Mass Spectrometry .I. General Introduction. *J Am Chem Soc* *88*, 2621-&.
- Murphy, R.C., and Clay, K.L. (1979). Synthesis and back exchange of 18O labeled amino acids for use as internal standards with mass spectrometry. *Biomed Mass Spectrom* *6*, 309-314.
- Nagaraj, N., Kulak, N.A., Cox, J., Neuhauser, N., Mayr, K., Hoerning, O., Vorm, O., and Mann, M. (2012). System-wide Perturbation Analysis with Nearly Complete Coverage of the Yeast Proteome by Single-shot Ultra HPLC Runs on a Bench Top Orbitrap. *Molecular & Cellular Proteomics* *11*.
- Nesvizhskii, A.I., and Aebersold, R. (2005). Interpretation of shotgun proteomic data - The protein inference problem. *Molecular & Cellular Proteomics* *4*, 1419-1440.
- Nesvizhskii, A.I., Vitek, O., and Aebersold, R. (2007). Analysis and validation of proteomic data generated by tandem mass spectrometry. *Nat Methods* *4*, 787-797.
- Nooren, I.M.A., and Thornton, J.M. (2003). Structural characterisation and functional significance of transient protein-protein interactions. *Journal of molecular biology* *325*, 991-1018.
- Nowinski, R.C., Lostrom, M.E., Tam, M.R., Stone, M.R., and Burnette, W.N. (1979). Isolation of Hybrid Cell-Lines Producing Monoclonal Antibodies against the P15(E) Protein of Ecotropic Murine Leukemia Viruses. *Virology* *93*, 111-126.

- Nueda, A., Hudson, F., Mivechi, N.F., and Dynan, W.S. (1999). DNA-dependent protein kinase protects against heat-induced apoptosis. *J Biol Chem* 274, 14988-14996.
- Olsen, J.V., Ong, S.E., and Mann, M. (2004). Trypsin cleaves exclusively C-terminal to arginine and lysine residues. *Molecular & Cellular Proteomics* 3, 608-614.
- Ong, S.E., Blagoev, B., Kratchmarova, I., Kristensen, D.B., Steen, H., Pandey, A., and Mann, M. (2002). Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Molecular & Cellular Proteomics* 1, 376-386.
- Ong, S.E., Kratchmarova, I., and Mann, M. (2003). Properties of ¹³C-substituted arginine in stable isotope labeling by amino acids in cell culture (SILAC). *Journal of proteome research* 2, 173-181.
- Ong, S.E., Schenone, M., Margolin, A.A., Li, X.Y., Do, K., Doud, M.K., Mani, D.R., Kuai, L., Wang, X., Wood, J.L., *et al.* (2009). Identifying the proteins to which small-molecule probes and drugs bind in cells. *P Natl Acad Sci USA* 106, 4617-4622.
- Overington, J.P., Al-Lazikani, B., and Hopkins, A.L. (2006). Opinion - How many drug targets are there? *Nat Rev Drug Discov* 5, 993-996.
- Pace, C.N., and Barrett, A.J. (1984). Kinetics of Tryptic Hydrolysis of the Arginine Valine Bond in Folded and Unfolded Ribonuclease-T1. *Biochem J* 219, 411-417.
- Park, S., Isaacson, R., Kim, H.T., Silver, P.A., and Wagner, G. (2005). Ufd1 exhibits the AAA-ATPase fold with two distinct ubiquitin interaction sites. *Structure* 13, 995-1005.
- Patil, A., Nakai, K., and Nakamura, H. (2011). HitPredict: a database of quality assessed protein-protein interactions in nine species. *Nucleic Acids Res* 39, D744-D749.
- Paul, W., and Steinwedel, H. (1953). *Ein Neues Massenspektrometer Ohne Magnetfeld. *Z Naturforsch A* 8, 448-450.
- Peri, S., Steen, H., and Pandey, A. (2001). GPMAW - a software tool for analyzing proteins and peptides. *Trends Biochem Sci* 26, 687-689.
- Perkins, D.N., Pappin, D.J.C., Creasy, D.M., and Cottrell, J.S. (1999). Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* 20, 3551-3567.
- Petritis, B.O., Qian, W.J., Camp, D.G., 2nd, and Smith, R.D. (2009). A simple procedure for effective quenching of trypsin activity and prevention of ¹⁸O-labeling back-exchange. *Journal of proteome research* 8, 2157-2163.
- Petrochenko, E.V., Serpa, J.J., and Borchers, C.H. (2011). An Isotopically Coded CID-cleavable Biotinylated Cross-linker for Structural Proteomics. *Molecular & Cellular Proteomics* 10.
- Poss, Z.C., Ebmeier, C.C., and Taatjes, D.J. (2013). The Mediator complex and transcription regulation. *Crit Rev Biochem Mol* 48, 575-608.
- Powers, M.V., and Workman, P. (2007). Inhibitors of the heat shock response: Biology and pharmacology. *Febs Lett* 581, 3758-3769.
- Puchades, M., Westman, A., Blennow, K., and Davidsson, P. (1999). Removal of sodium dodecyl sulfate from protein samples prior to matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Sp* 13, 344-349.

Rapp, D., and Englande, P. (1965). Total Cross Sections for Ionization and Attachment in Gases by Electron Impact .I. Positive Ionization. *J Chem Phys* 43, 1464-&.

Rappsilber, J. (2011). The beginning of a beautiful friendship: Cross-linking/mass spectrometry and modelling of proteins and multi-protein complexes. *J Struct Biol* 173, 530-540.

Rappsilber, J., Ishihama, Y., and Mann, M. (2003). Stop and go extraction tips for matrix-assisted laser desorption/ionization, nanoelectrospray, and LC/MS sample pretreatment in proteomics. *Analytical chemistry* 75, 663-670.

Rappsilber, J., Mann, M., and Ishihama, Y. (2007). Protocol for micro-purification, enrichment, pre-fractionation and storage of peptides for proteomics using StageTips. *Nat Protoc* 2, 1896-1906.

Robinson, P.J., Trnka, M.J., Pellarin, R., Greenberg, C.H., Bushnell, D.A., Davis, R., Burlingame, A.L., Sali, A., and Kornberg, R.D. (2015). Molecular architecture of the yeast Mediator complex. *eLife* 4.

Roeder, R.G. (2005). Transcriptional regulation and the role of diverse coactivators in animal cells. *Febs Lett* 579, 909-915.

Roepstorff, P., and Fohlman, J. (1984). Proposal for a Common Nomenclature for Sequence Ions in Mass-Spectra of Peptides. *Biomed Mass Spectrom* 11, 601-601.

Rusin, S.F., Schlosser, K.A., Adamo, M.E., and Kettenbach, A.N. (2015). Quantitative phosphoproteomics reveals new roles for the protein phosphatase PP6 in mitotic cells. *Sci Signal* 8.

Sarbassov, D.D., Ali, S.M., and Sabatini, D.M. (2005). Growing roles for the mTOR pathway. *Curr Opin Cell Biol* 17, 596-603.

Savitski, M.M., Reinhard, F.B.M., Franken, H., Werner, T., Savitski, M.F., Eberhard, D., Molina, D.M., Jafari, R., Dovega, R.B., Klaeger, S., *et al.* (2014). Tracking cancer drugs in living cells by thermal profiling of the proteome. *Science* 346, 55-+.

Schenone, M., Dancik, V., Wagner, B.K., and Clemons, P.A. (2013). Target identification and mechanism of action in chemical biology and drug discovery. *Nat Chem Biol* 9, 232-240.

Schwanhäusser, B., Busse, D., Li, N., Dittmar, G., Schuchhardt, J., Wolf, J., Chen, W., and Selbach, M. (2011). Global quantification of mammalian gene expression control. *Nature* 473, 337-342.

Schwartz, J.C., Senko, M.W., and Syka, J.E.P. (2002). A two-dimensional quadrupole ion trap mass spectrometer. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 13, 659-669.

Searle, B.C. (2010). Scaffold: A bioinformatic tool for validating MS/MS-based proteomic studies. *Proteomics* 10, 1265-1269.

Selbach, M., and Mann, M. (2006). Protein interaction screening by quantitative immunoprecipitation combined with knockdown (QUICK). *Nat Methods* 3, 981-983.

Sevinsky, J.R., Brown, K.J., Cargile, B.J., Bundy, J.L., and Stephenson, J.L. (2007). Minimizing back exchange in O-18/O-16 quantitative proteomics experiments by

incorporation of immobilized trypsin into the initial digestion step. *Analytical chemistry* 79, 2158-2162.

Shah, S.P., Lonial, S., and Boise, L.H. (2015). When Cancer Fights Back: Multiple Myeloma, Proteasome Inhibition, and the Heat-Shock Response. *Mol Cancer Res* 13, 1163-1173.

Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O., and Mann, M. (1996). Mass spectrometric sequencing of proteins from silver stained polyacrylamide gels. *Analytical chemistry* 68, 850-858.

Shiyama, T., Furuya, M., Yamazaki, A., Terada, T., and Tanaka, A. (2004). Design and synthesis of novel hydrophilic spacers for the reduction of nonspecific binding proteins on affinity resins. *Bioorgan Med Chem* 12, 2831-2841.

Sinz, A. (2006). Chemical cross-linking and mass spectrometry to map three-dimensional protein structures and protein-protein interactions. *Mass spectrometry reviews* 25, 663-682.

Skorski, T. (2002). BCR/ABL regulates response to DNA damage: the role in resistance to genotoxic treatment and in genomic instability. *Oncogene* 21, 8591-8604.

Skroblin, P., Grossmann, S., Schäfer, G., Rosenthal, W., and Klussmann, E. (2010). Mechanisms of Protein Kinase a Anchoring. *Int Rev Cel Mol Bio* 283, 235-330.

Smyth, D.G., Konigsberg, W., and Blumenfeld, O.O. (1964). Reactions of N-Ethylmaleimide with Peptides + Amino Acids. *Biochem J* 91, 589-&.

Staros, J.V. (1982). N-Hydroxysulfosuccinimide Active Esters - Bis(N-Hydroxysulfosuccinimide) Esters of 2 Dicarboxylic-Acids Are Hydrophilic, Membrane-Impermeant, Protein Cross-Linkers. *Biochemistry-Us* 21, 3950-3955.

Staros, J.V. (1988). Membrane-Impermeant Cross-Linking Reagents - Probes of the Structure and Dynamics of Membrane-Proteins. *Accounts Chem Res* 21, 435-441.

Steen, H., and Mann, M. (2004). The ABC's (and XYZ's) of peptide sequencing. *Nat Rev Mol Cell Bio* 5, 699-711.

Stewart, II, Thomson, T., and Figeys, D. (2001). 18O labeling: a tool for proteomics. *Rapid communications in mass spectrometry : RCM* 15, 2456-2465.

Stockwell, B.R. (2000). Chemical genetics: Ligand-based discovery of gene function. *Nat Rev Genet* 1, 116-125.

Stockwell, B.R. (2004). Exploring biology with small organic molecules. *Nature* 432, 846-854.

Stroud, D.A., Surgenor, E.E., Formosa, L.E., Reljic, B., Frazier, A.E., Dibley, M.G., Osellame, L.D., Stait, T., Beilharz, T.H., Thorburn, D.R., *et al.* (2016). Accessory subunits are integral for assembly and function of human mitochondrial complex I. *Nature* 538, 123-+.

Subbotin, R.I., and Chait, B.T. (2014). A pipeline for determining protein-protein interactions and proximities in the cellular milieu. *Molecular & cellular proteomics : MCP* 13, 2824-2835.

Sundberg, S.A. (2000). High-throughput and ultra-high-throughput screening: solution- and cell-based approaches. *Curr Opin Biotech* 11, 47-53.

- Sutherland, B.W., Toews, J., and Kast, J. (2008). Utility of formaldehyde cross-linking and mass spectrometry in the study of protein-protein interactions. *J Mass Spectrom* *43*, 699-715.
- Swaim, C.L., Smith, J.B., and Smith, D.L. (2004). Unexpected products from the reaction of the synthetic cross-linker 3,3'-dithiobis(sulfosuccinimidyl propionate), DTSSP with peptides. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* *15*, 736-749.
- Syka, J.E.P., Coon, J.J., Schroeder, M.J., Shabanowitz, J., and Hunt, D.F. (2004). Peptide and protein sequence analysis by electron transfer dissociation mass spectrometry. *P Natl Acad Sci USA* *101*, 9528-9533.
- Taatjes, D.J. (2010). The human Mediator complex: a versatile, genome-wide regulator of transcription. *Trends Biochem Sci* *35*, 315-322.
- Tanackovic, G., and Kramer, A. (2005). Human splicing factor SF3a, but not SF1, is essential for pre-mRNA splicing in vivo. *Mol Biol Cell* *16*, 1366-1377.
- Taylor, G. (1964). Disintegration of Water Drops in Electric Field. *Proc R Soc Lon Ser-A* *280*, 383-+.
- Taylor, J.A., and Johnson, R.S. (1997). Sequence database searches via de novo peptide sequencing by tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Sp* *11*, 1067-1075.
- Thiede, B., Lamer, S., Mattow, J., Siejak, F., Dimmler, C., Rudel, T., and Jungblut, P.R. (2000). Analysis of missed cleavage sites, tryptophan oxidation and N-terminal pyroglutamylation after in-gel tryptic digestion. *Rapid Commun Mass Sp* *14*, 496-502.
- Thomson, B.A., and Iribarne, J.V. (1979). Field-Induced Ion Evaporation from Liquid Surfaces at Atmospheric-Pressure. *J Chem Phys* *71*, 4451-4463.
- Tong, L. (2013). Structure and function of biotin-dependent carboxylases. *Cellular and Molecular Life Sciences* *70*, 863-891.
- Trester-Zedlitz, M., Kamada, K., Burley, S.K., Fenyó, D., Chait, B.T., and Muir, T.W. (2003). A modular cross-linking approach for exploring protein interactions. *J Am Chem Soc* *125*, 2416-2425.
- Tsai, K.L., Tomomori-Sato, C., Sato, S., Conaway, R.C., Conaway, J.W., and Asturias, F.J. (2014). Subunit Architecture and Functional Modular Rearrangements of the Transcriptional Mediator Complex. *Cell* *157*, 1430-1444.
- Tu, Y., Ji, C., Yang, B., Yang, Z., Gu, H., Lu, C.C., Wang, R., Su, Z.L., Chen, B., Sun, W.L., *et al.* (2013). DNA-dependent protein kinase catalytic subunit (DNA-PKcs)-SIN1 association mediates ultraviolet B (UVB)-induced Akt Ser-473 phosphorylation and skin cell survival. *Mol Cancer* *12*.
- Ungar, D., Oka, T., Krieger, M., and Hughson, F.M. (2006). Retrograde transport on the COG railway. *Trends in cell biology* *16*, 113-120.
- Uthe, H., Vanselow, J.T., and Schlosser, A. (2017). Proteomic Analysis of the Mediator Complex Interactome in *Saccharomyces cerevisiae*. *Sci Rep-Uk* *7*.
- Vedadi, M., Niesen, F.H., Allali-Hassani, A., Fedorov, O.Y., Finerty, P.J., Wasney, G.A., Yeung, R., Arrowsmith, C., Ball, L.J., Berglund, H., *et al.* (2006). Chemical screening methods to identify ligands that promote protein stability, protein crystallization, and structure determination. *P Natl Acad Sci USA* *103*, 15835-15840.

- Vij, N. (2008). AAA ATPase p97/VCP: cellular functions, disease and therapeutic potential. *J Cell Mol Med* 12, 2511-2518.
- von Kleist, L., Michaelis, S., Bartho, K., Graebner, O., Schlieff, M., Dreger, M., Schrey, A.K., Sefkow, M., Kroll, F., Koester, H., *et al.* (2016). Identification of Potential Off-target Toxicity Liabilities of Catechol-O-methyltransferase Inhibitors by Differential Competition Capture Compound Mass Spectrometry. *J Med Chem* 59, 4664-4675.
- von Mering, C., Huynen, M., Jaeggi, D., Schmidt, S., Bork, P., and Snel, B. (2003). STRING: a database of predicted functional associations between proteins. *Nucleic Acids Res* 31, 258-261.
- Walzthoeni, T., Leitner, A., Stengel, F., and Aebersold, R. (2013). Mass spectrometry supported determination of protein complex structure. *Current opinion in structural biology* 23, 252-260.
- Wang, X.R., Cimermancic, P., Yu, C., Schweitzer, A., Chopra, N., Engel, J.L., Greenberg, C., Huszagh, A.S., Beck, F., Sakata, E., *et al.* (2017). Molecular Details Underlying Dynamic Structures and Regulation of the Human 26S Proteasome. *Molecular & Cellular Proteomics* 16, 840-854.
- Weber, A.M., and Ryan, A.J. (2015). ATM and ATR as therapeutic targets in cancer. *Pharmacol Therapeut* 149, 124-138.
- Weber, P.C., Ohlendorf, D.H., Wendoloski, J.J., and Salemme, F.R. (1989). Structural Origins of High-Affinity Biotin Binding to Streptavidin. *Science* 243, 85-88.
- Werner, T., Sweetman, G., Savitski, M.F., Mathieson, T., Bantscheff, M., and Savitski, M.M. (2014). Ion Coalescence of Neutron Encoded TMT 10-Plex Reporter Ions. *Analytical chemistry* 86, 3594-3601.
- Wiese, S. (2007). Protein labeling by iTRAQ: A new tool for quantitative mass spectrometry in proteome research (vol 7, pg 340, 2007). *Proteomics* 7, 1004-1004.
- Willmore, E., de Caux, S., Sunter, N.J., Tilby, M.J., Jackson, G.H., Austin, C.A., and Durkacz, B.W. (2004). A novel DNA-dependent protein kinase inhibitor, NU7026, potentiates the cytotoxicity of topoisomerase II poisons used in the treatment of leukemia. *Blood* 103, 4659-4665.
- Wisniewski, J.R., Zougman, A., Nagaraj, N., and Mann, M. (2009). Universal sample preparation method for proteome analysis. *Nat Methods* 6, 359-U360.
- Woodman, P.G. (2003). p97, a protein coping with multiple identities. *J Cell Sci* 116, 4283-4290.
- Wu, Z.X., Doondeea, J.B., Gholami, A.M., Janning, M.C., Lemeer, S., Kramer, K., Eccles, S.A., Gollin, S.M., Grenman, R., Walch, A., *et al.* (2011). Quantitative Chemical Proteomics Reveals New Potential Drug Targets in Head and Neck Cancer. *Molecular & Cellular Proteomics* 10.
- Xie, J., Marusich, M.F., Souda, P., Whitelegge, J., and Capaldi, R.A. (2007). The mitochondrial inner membrane protein mitofilin exists as a complex with SAM50, metaxins 1 and 2, coiled-coil-helix coiled-coil-helix domain-containing protein 3 and 6 and DnaJC11. *Febs Lett* 581, 3545-3549.
- Yost, R.A., and Enke, C.G. (1979). Triple Quadrupole Mass-Spectrometry for Direct Mixture Analysis and Structure Elucidation. *Analytical chemistry* 51, 1251-&.

Young, M.M., Tang, N., Hempel, J.C., Oshiro, C.M., Taylor, E.W., Kuntz, I.D., Gibson, B.W., and Dollinger, G. (2000). High throughput protein fold identification by using experimental constraints derived from intramolecular cross-links and mass spectrometry. *P Natl Acad Sci USA* *97*, 5802-5806.

Yu, I.M., and Hughson, F.M. (2010). Tethering Factors as Organizers of Intracellular Vesicular Traffic. *Annu Rev Cell Dev Bi* *26*, 137-156.

Zhang, H., Tang, X., Munske, G.R., Tolic, N., Anderson, G.A., and Bruce, J.E. (2009). Identification of protein-protein interactions and topologies in living cells with chemical cross-linking and mass spectrometry. *Molecular & cellular proteomics : MCP* *8*, 409-420.

Zhang, L.X., Holmes, I.P., Hochgräfe, F., Walker, S.R., Ali, N.A., Humphrey, E.S., Wu, J.M., de Silva, M., Kersten, W.J.A., Connor, T., *et al.* (2013). Characterization of the Novel Broad-Spectrum Kinase Inhibitor CTx-0294885 As an Affinity Reagent for Mass Spectrometry-Based Kinome Profiling. *Journal of proteome research* *12*, 3104-3116.

Zhang, X., Li, Y.Z., Shao, W.G., and Lam, H. (2011). Understanding the improved sensitivity of spectral library searching over sequence database searching in proteomics data analysis. *Proteomics* *11*, 1075-1085.

Zhang, X.D., Shaw, A., Bates, P.A., Newman, R.H., Gowen, B., Orlova, E., Gorman, M.A., Kondo, H., Dokurno, P., Lally, J., *et al.* (2000). Structure of the AAA ATPase p97. *Mol Cell* *6*, 1473-1484.

Zubarev, R.A., Kelleher, N.L., and McLafferty, F.W. (1998). Electron capture dissociation of multiply charged protein cations. A nonergodic process. *J Am Chem Soc* *120*, 3265-3266.

8 Anhang

8.1 Interaktionen von Proteinen mit Proteinen

8.1.1 Quervernetzung von UFD1 und NPL4 mit BS3

> gi|157426879|ref|NP_060391.2| Nuclear Protein Localization 4 [Homo sapiens]

```

      10      20      30      40      50
MAESIIIRVQ SPDGVKRITA TKRETAATFL KKVAKKEFGFQ NNGFSVYINR
      60      70      80      90     100
NKTGEITASS NKSLNLLKIK HGDLLFLFPS SLAGPSSEME TSVPPGFKVF
      110     120     130     140     150
GAPNVVEDEI DQYLSKQDGK IYRSRDPQLC RHGPLGKCVH CVPLEPFDED
      160     170     180     190     200
YLNHLEPPVK HMSFHAYIRK LTGGADKGF VALENISCKI KSGCEGHLPW
      210     220     230     240     250
PNGICTKQCP SAITLNRQKY RHVDNIMFEN HTVADRFLDF WRKTGNQHFQ
      260     270     280     290     300
YLYGRYTEHK DIPLGIRAEV AAIYEPPQIG TQNSLELLED PKAEVVDEIA
      310     320     330     340     350
AKLGLRKVGW IFTDLVSEDV RKGTVRYSRN KDTYFLSSEE CITAGDFQNK
      360     370     380     390     400
HPNMCRLSPD GHFGSKFVTA VATGGPDNVQ HFEGYQVSNQ CMALVRDECL
      410     420     430     440     450
LPCKDAPELG YAKESSESEQ VPDVFKDQVD KFGNEITQLA RPLPVEYLII
      460     470     480     490     500
DITTFPKDP VYTFISISQNP FPIENRDVLG ETQDFHSLAT YLSQNTSSVF
      510     520     530     540     550
LDTISDFHLL LFLVTNEVMP LQDSISLLE AVRTRNEELA QTWKRSEQWA
      560     570     580     590     600
TIEQLCSTVG GQLPLGHEYG AVGGSTHTAT AAMWACQHCT FMNQPGTGHC

EMCSLPRT

```

Abbildung A. 1: Aminosäuresequenz des Proteins NPL4 im FASTA-Format, das für die Quervernetzungen mit BS3 verwendet wurde.

> gi|29501813|ref|NP_005650.2| Ubiquitin Fusion Degradation 1-like isoform A [Homo sapiens]

```

      10      20      30      40      50
MGSHHHHHHS SGLVPRGSHM FSFNMFDHPI PRVFQNRFSY QYRCFVSVM
      60      70      80      90     100
AGPNDRSDVE KGGKIIMPPS ALDQLSRLNI TYPMLFKLTN KNSDRMTHCG
      110     120     130     140     150
VLEFVADEGI CYLPHWMMQN LLLEEGGLVQ VESVNLQVAT YSKFQPQSPD
      160     170     180     190     200
FLDITNPKAV LENALRNFAV LTTGDVIAIN YNEKIYELRV METKPKAVS
      210     220     230     240     250
IIECDMNVDF DAPLGYKEPE RQVQHEESTE GEADHSGYAG ELGFRAFSGS
      260     270     280     290     300
GNRLDGKKGK VEPSPSPIKP GDIKRGIPNY EFKLGKITFI RNSRPLVKKV
      310     320
EEDEAGGRFV AFSGEGQSLR KKGRKP

```

Abbildung A. 2: Aminosäuresequenz des Proteins UFD1 im FASTA-Format, das für die Quervernetzungen mit BS3 verwendet wurde.

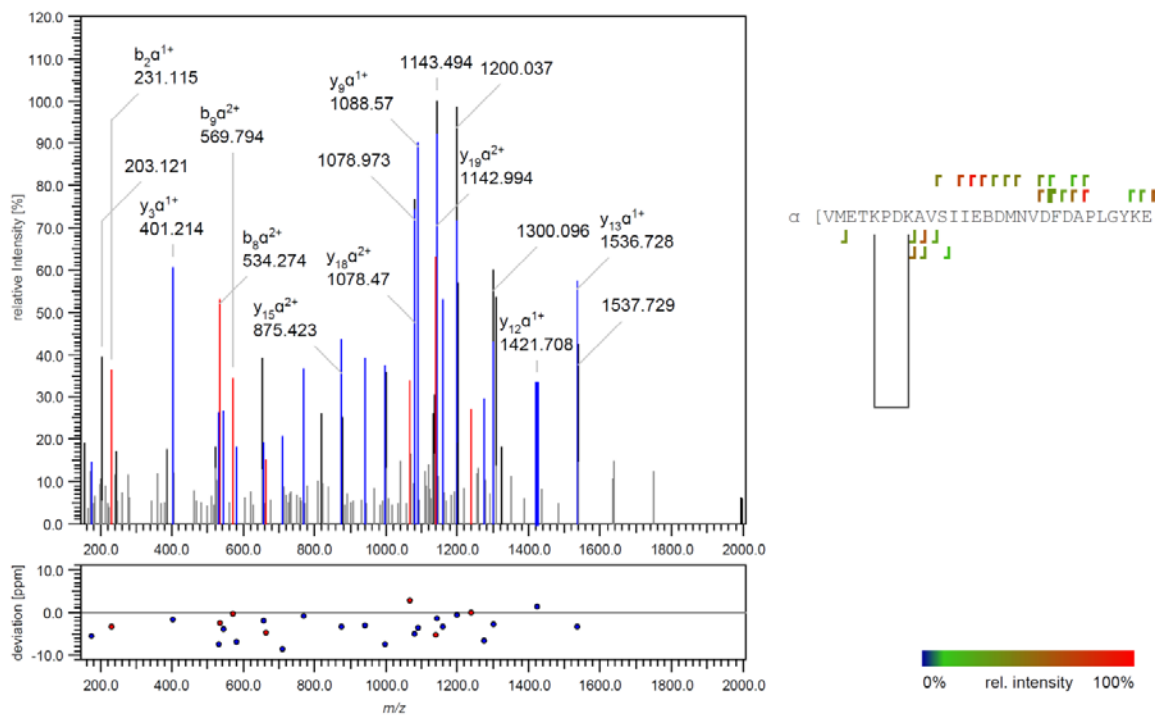


Abbildung A. 3: MS²-Spektrum des Peptids VMETKPKDKAVSIIEBDMNVDFDAPLGYKE, das in Tabelle 8 mit der Nr. 1 aufgelistet ist.

Zu sehen ist eine intramolekulare Quervernetzung (Typ1) von UFD1. Neben dem Fragmentationsspektrum sind die Peptidsequenzen mit den jeweiligen b- und y-Ionen markiert. Die Farbe der Markierung steht für die relative Intensität der einzelnen Ionen. Unter dem Spektrum ist die Massengenauigkeit der Fragmente in ppm angegeben. Der Buchstabe B steht für ein alkyliertes Cysteine.

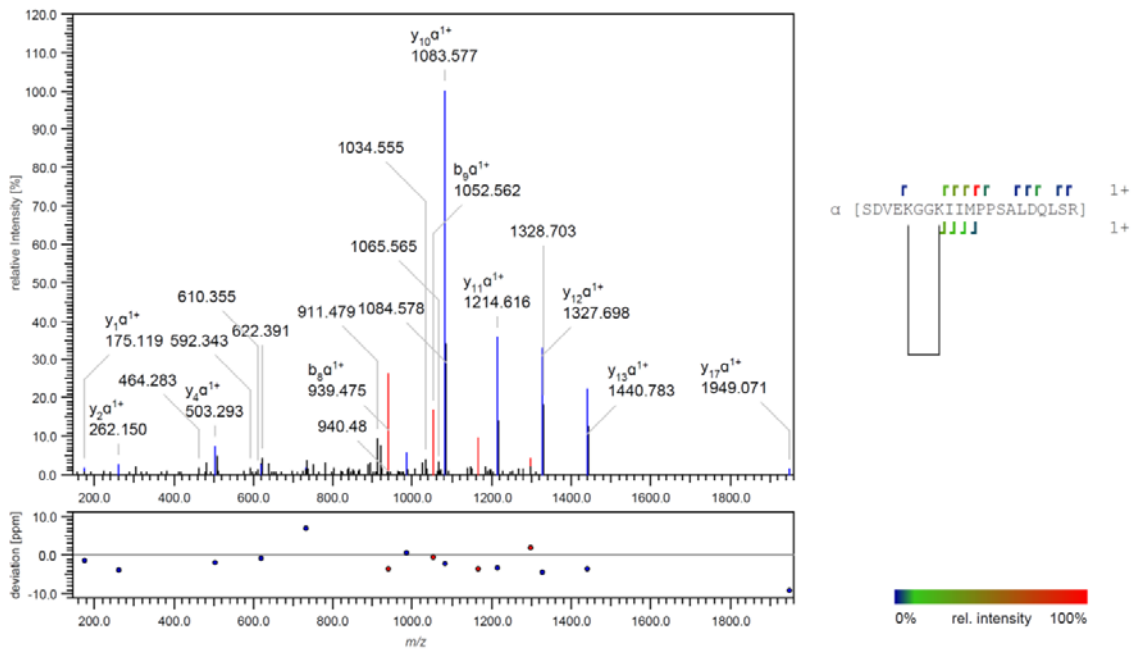


Abbildung A. 4: MS²-Spektrum des Peptids SDVEKGGKIIMPPSALDQLSR, das in Tabelle 8 mit der Nr.2 aufgelistet ist.

Zu sehen ist eine intramolekulare Quervernetzung (Typ1) von UFD1. Neben dem Fragmentationsspektrum sind die Peptidsequenzen mit den jeweiligen b- und y-Ionen markiert. Die Farbe der Markierung steht für die relative Intensität der einzelnen Ionen. Unter dem Spektrum ist die Massengenauigkeit der Fragmente in ppm angegeben.

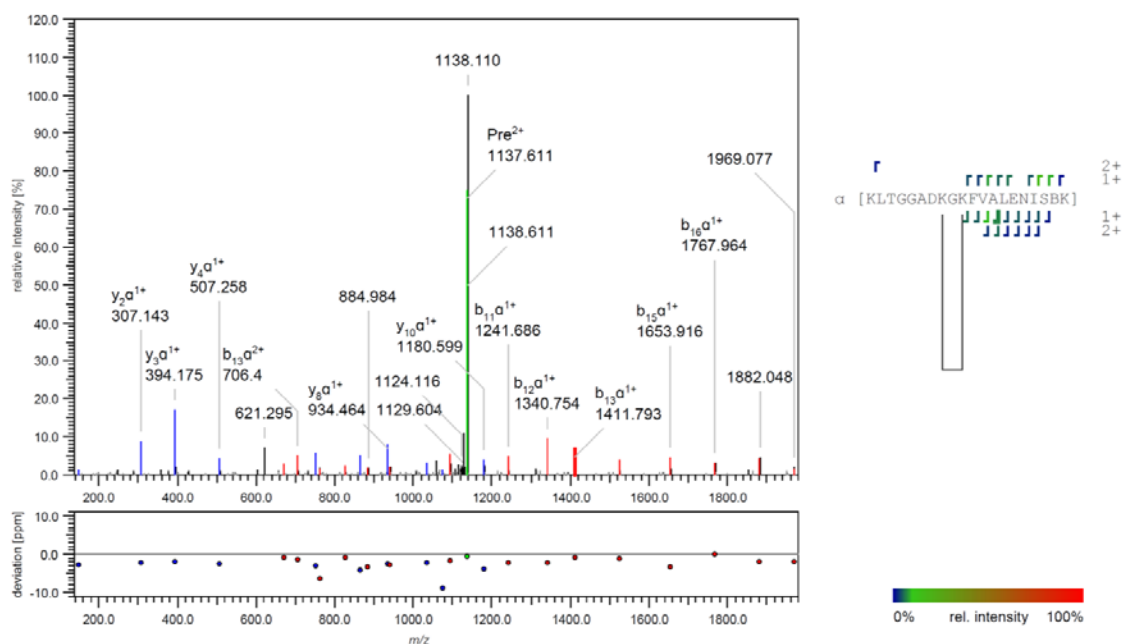


Abbildung A. 5: MS²-Spektrum des Peptids KLTGGADKGGKFFVALENISBK, das in Tabelle 8 mit der Nr.3 aufgelistet ist.

Zu sehen ist eine intramolekulare Quervernetzung (Typ1) von NPL4. Neben dem Fragmentationenspektrum sind die Peptidsequenzen mit den jeweiligen b- und y-Ionen markiert. Die Farbe der Markierung steht für die relative Intensität der einzelnen Ionen. Unter dem Spektrum ist die Massengenauigkeit der Fragmente in ppm angegeben. Der Buchstabe B steht für ein alkyliertes Cystein.

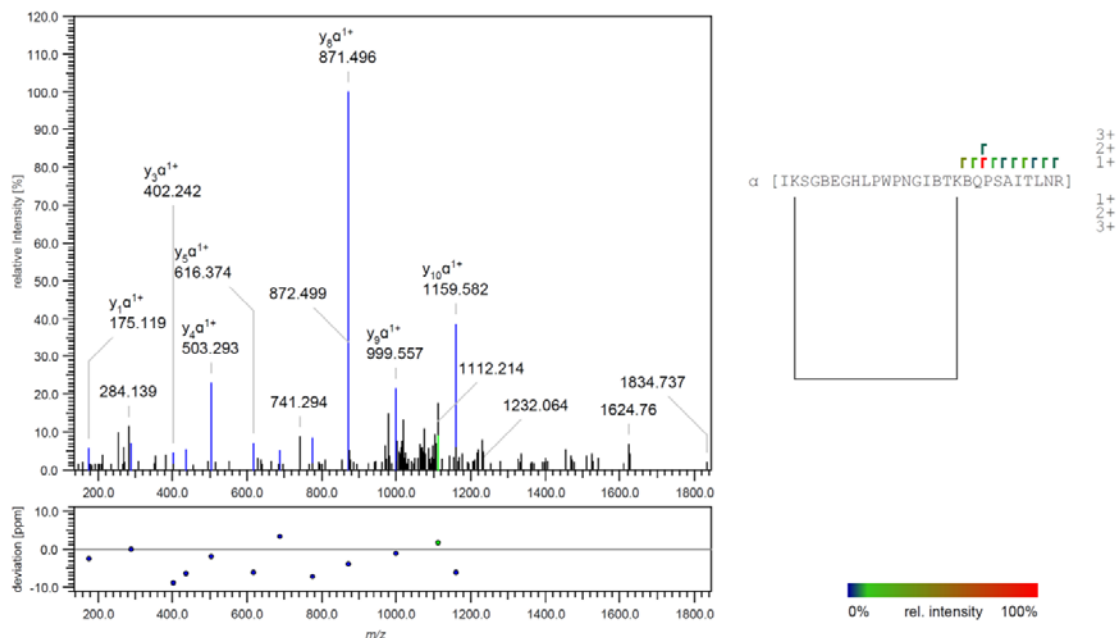


Abbildung A. 6: MS²-Spektrum des Peptids IKSGBEGHLPWPNGIBTKBQPSAITLNR, das in Tabelle 8 mit der Nr.5 aufgelistet ist.

Zu sehen ist eine intramolekulare Quervernetzung (Typ1) von NPL4. Neben dem Fragmentationenspektrum sind die Peptidsequenzen mit den jeweiligen b- und y-Ionen markiert. Die Farbe der Markierung steht für die relative Intensität der einzelnen Ionen. Unter dem Spektrum ist die Massengenauigkeit der Fragmente in ppm angegeben. Der Buchstabe B steht für ein alkyliertes Cystein.

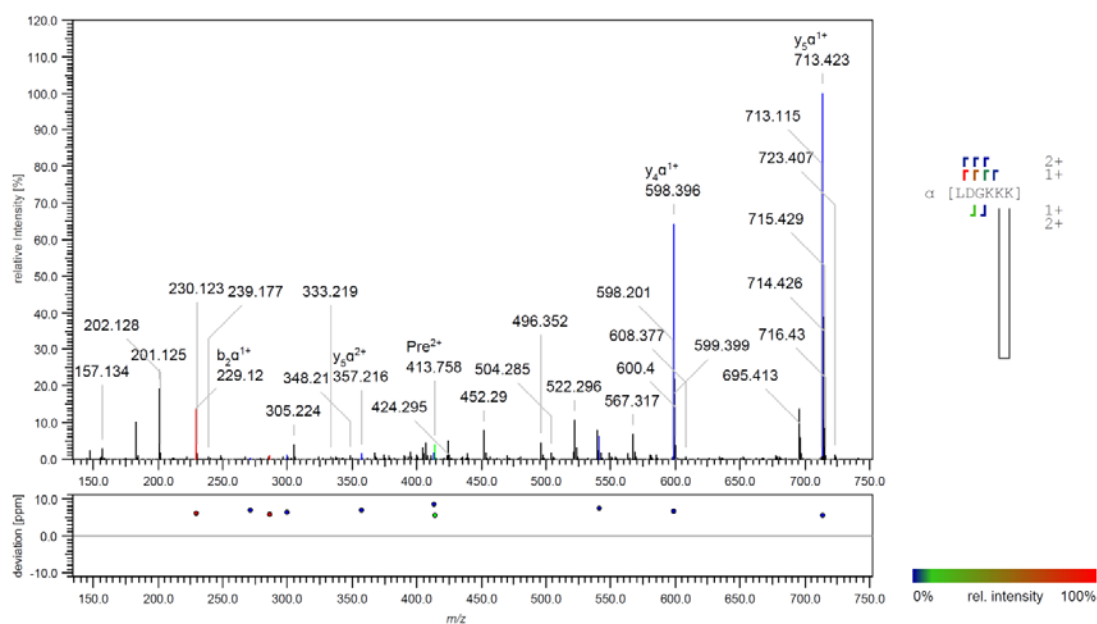


Abbildung A. 7: MS²-Spektrum des Peptids LDGKKK, das in Tabelle 8 mit der Nr.6 aufgelistet ist.

Zu sehen ist eine intramolekulare Quervernetzung (Typ1) von UFD1. Neben dem Fragmentationenspektrum sind die Peptidsequenzen mit den jeweiligen b- und y-Ionen markiert. Die Farbe der Markierung steht für die relative Intensität der einzelnen Ionen. Unter dem Spektrum ist die Massengenauigkeit der Fragmente in ppm angegeben.

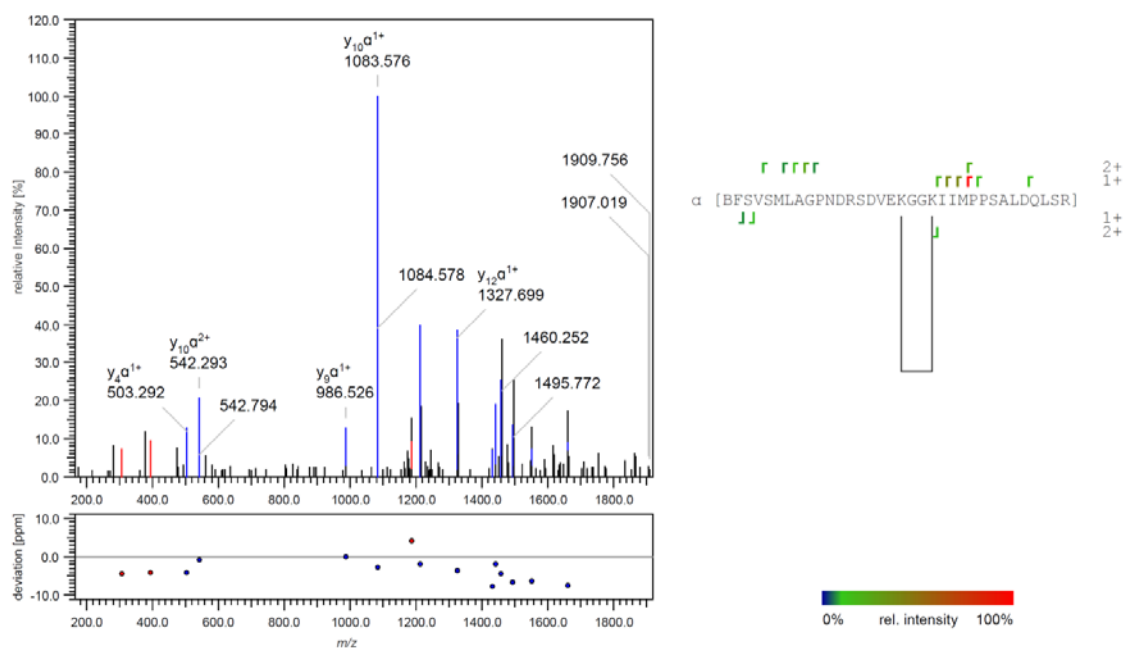


Abbildung A. 8: MS²-Spektrum des Peptids BFSVSMLAGPNDRSDVEKGGKIIMPPSALDQLSR, das in Tabelle 8 mit der Nr.7 aufgelistet ist.

Zu sehen ist eine intramolekulare Quervernetzung (Typ1) von UFD1. Neben dem Fragmentationenspektrum sind die Peptidsequenzen mit den jeweiligen b- und y-Ionen markiert. Die Farbe der Markierung steht für die relative Intensität der einzelnen Ionen. Unter dem Spektrum ist die Massengenauigkeit der Fragmente in ppm angegeben. Der Buchstabe B steht für ein alkyliertes Cystein.

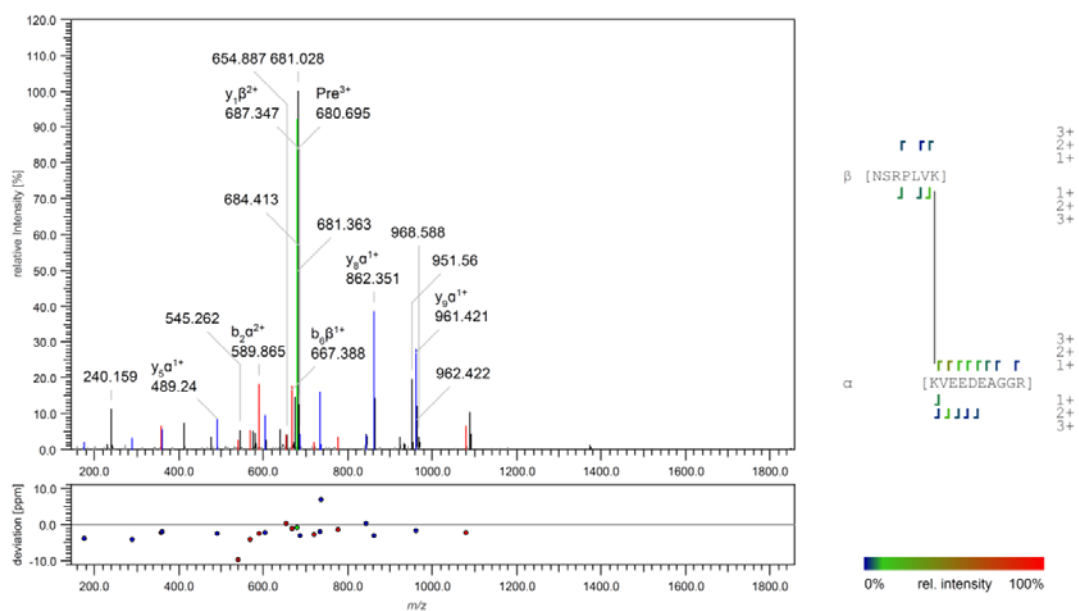


Abbildung A. 9: MS²-Spektrum der Peptide NSRPLVK und KVEEDEAGGR, die in Tabelle 8 mit der Nr.8 aufgelistet sind.

Zu sehen ist eine intramolekulare Quervernetzung (Typ2) von UFD1. Neben dem Fragmentationenspektrum sind die Peptidsequenzen mit den jeweiligen b- und y-Ionen markiert. Die Farbe der Markierung steht für die relative Intensität der einzelnen Ionen. Unter dem Spektrum ist die Massengenauigkeit der Fragmente in ppm angegeben.

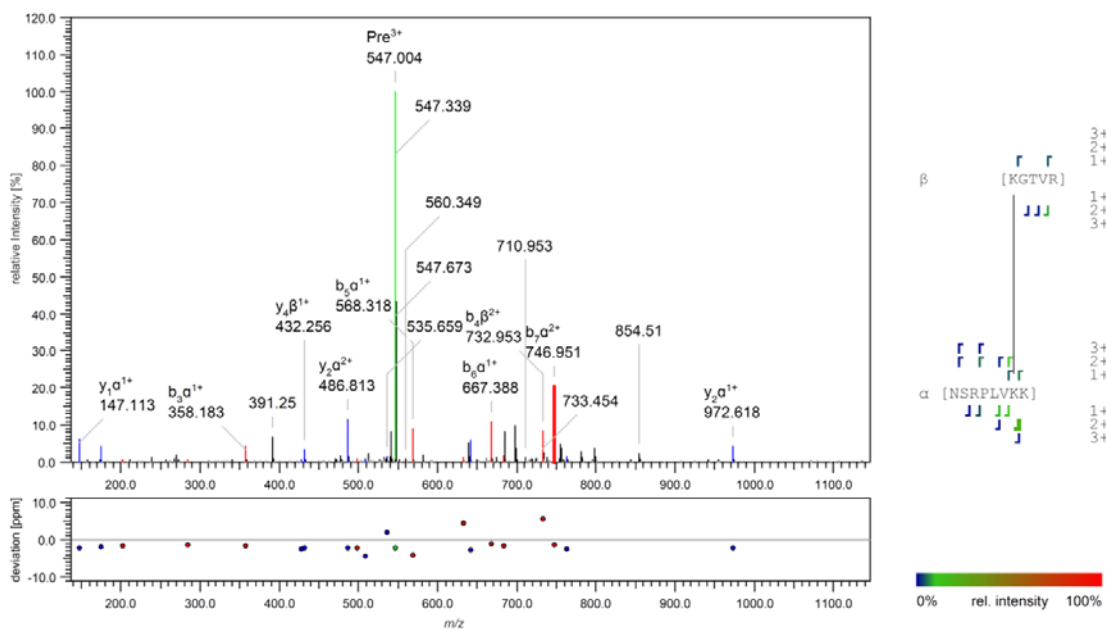


Abbildung A. 10: MS²-Spektrum der Peptide KGTVR und NSRPLVKK, die in Tabelle 8 mit der Nr.9 aufgelistet sind.

Zu sehen ist eine intermolekulare Quervernetzung (Typ2) von NPL4 und UFD1. Neben dem Fragmentationenspektrum sind die Peptidsequenzen mit den jeweiligen b- und y-Ionen markiert. Die Farbe der Markierung steht für die relative Intensität der einzelnen Ionen. Unter dem Spektrum ist die Massengenauigkeit der Fragmente in ppm angegeben.

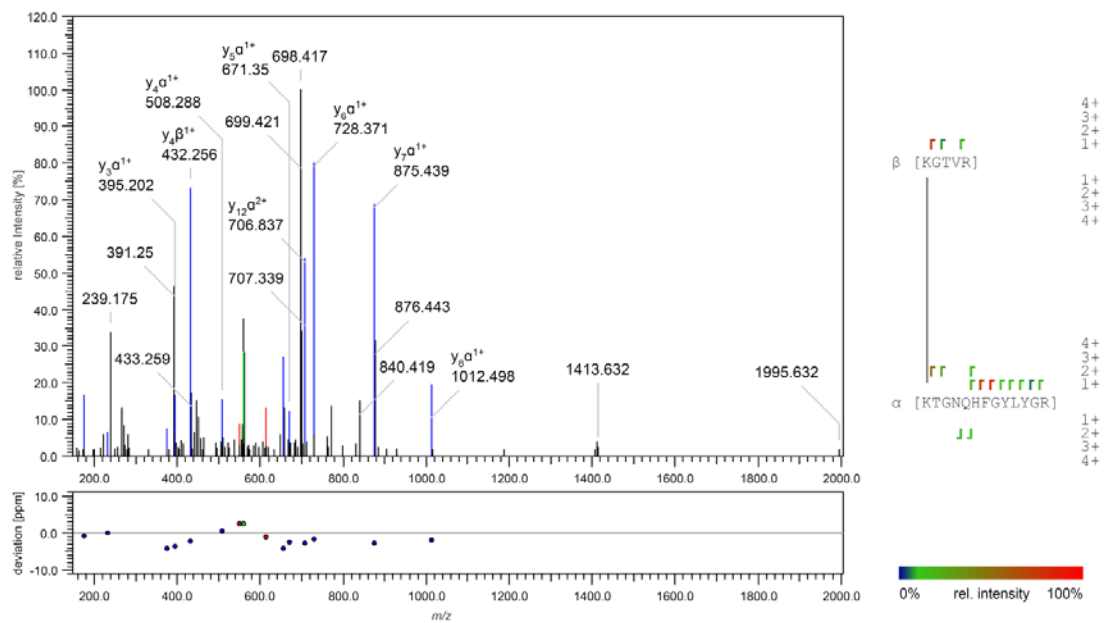


Abbildung A. 11: MS²-Spektrum der Peptide KGTVR und KTGQHFHFGYLYGR, die in Tabelle 8 mit der Nr.10 aufgelistet sind.

Zu sehen ist eine intramolekulare Quervernetzung (Typ2) von NPL4. Neben dem Fragmentationsspektrum sind die Peptidsequenzen mit den jeweiligen b- und y-Ionen markiert. Die Farbe der Markierung steht für die relative Intensität der einzelnen Ionen. Unter dem Spektrum ist die Massengenauigkeit der Fragmente in ppm angegeben.

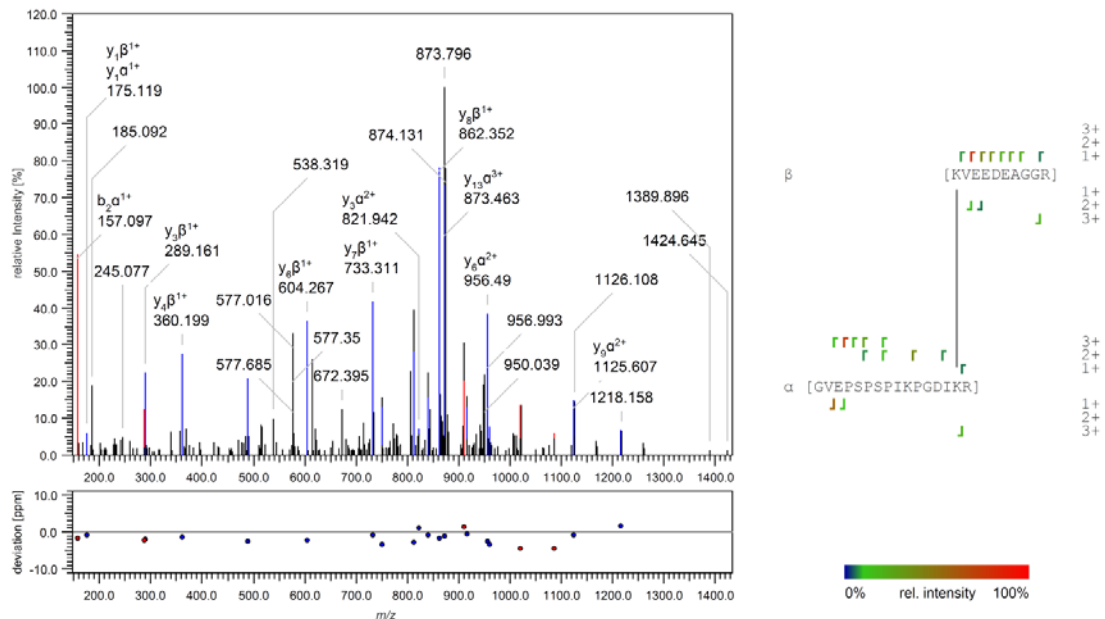


Abbildung A. 12: MS²-Spektrum der Peptide KVEEDEAGGR und GVEPSPSPIKPGDIKR, die in Tabelle 8 mit der Nr.11 aufgelistet sind.

Zu sehen ist eine intramolekulare Quervernetzung (Typ2) von UFD1. Neben dem Fragmentationsspektrum sind die Peptidsequenzen mit den jeweiligen b- und y-Ionen markiert. Die Farbe der Markierung steht für die relative Intensität der einzelnen Ionen. Unter dem Spektrum ist die Massengenauigkeit der Fragmente in ppm angegeben.

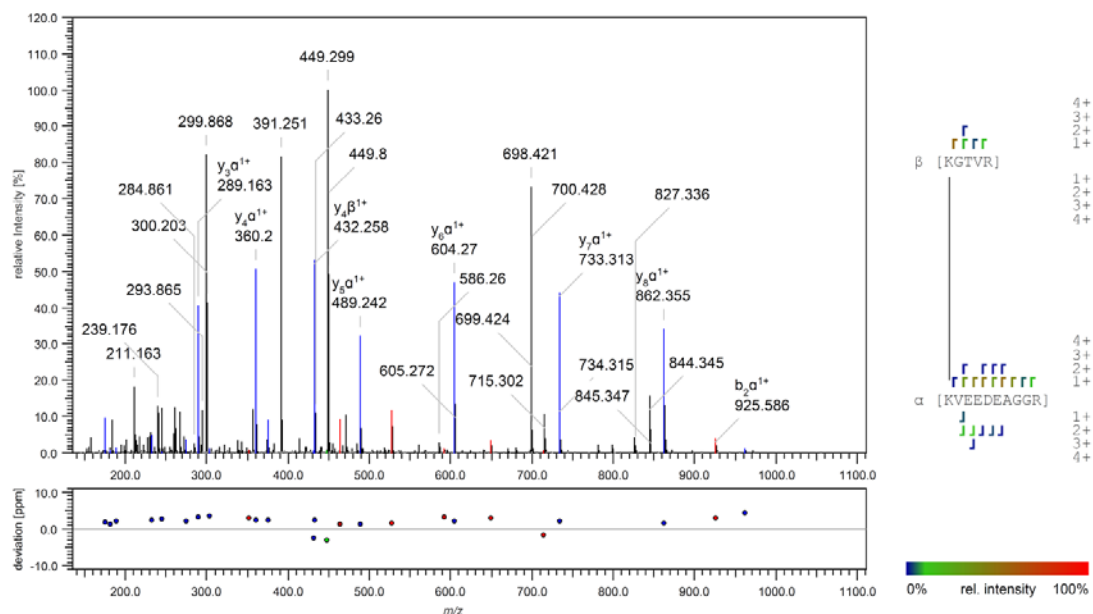


Abbildung A. 13: MS²-Spektrum der Peptide KGTVR und KVEEDEAGGR, die in Tabelle 8 mit der Nr.12 aufgelistet sind.

Zu sehen ist eine intermolekulare Quervernetzung (Typ2) von NPL4 und UFD1. Neben dem Fragmentationenspektrum sind die Peptidsequenzen mit den jeweiligen b- und y-Ionen markiert. Die Farbe der Markierung steht für die relative Intensität der einzelnen Ionen. Unter dem Spektrum ist die Massengenauigkeit der Fragmente in ppm angegeben.

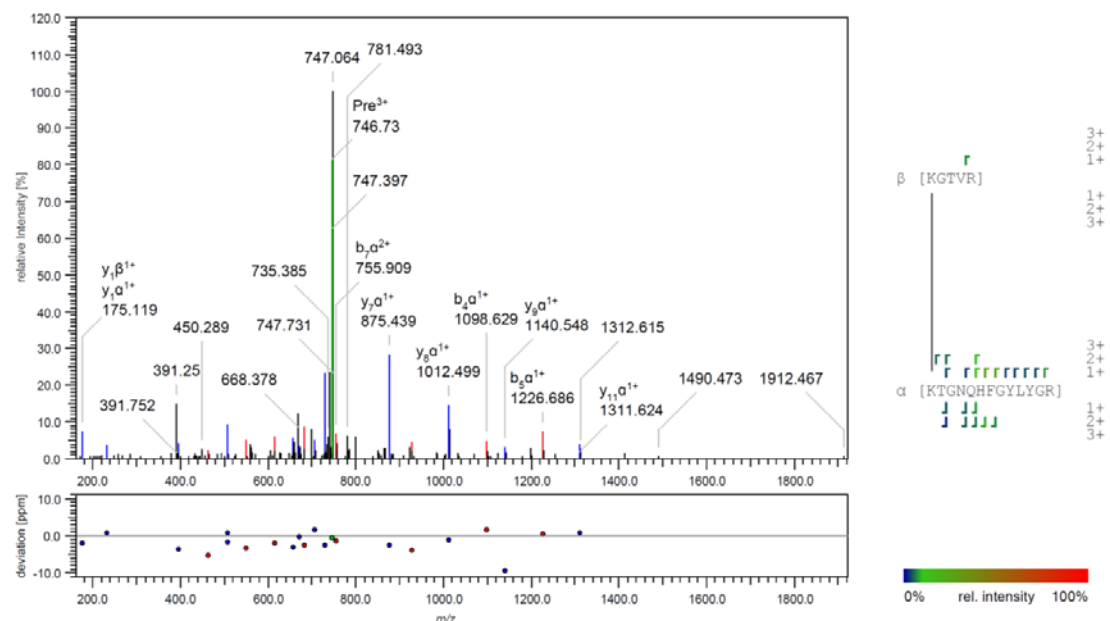


Abbildung A. 14: MS²-Spektrum der Peptide KGTVR und KTGNOHFGYLYGR, die in Tabelle 8 mit der Nr.13 aufgelistet sind.

Zu sehen ist eine intramolekulare Quervernetzung (Typ2) von NPL4. Neben dem Fragmentationenspektrum sind die Peptidsequenzen mit den jeweiligen b- und y-Ionen markiert. Die Farbe der Markierung steht für die relative Intensität der einzelnen Ionen. Unter dem Spektrum ist die Massengenauigkeit der Fragmente in ppm angegeben.

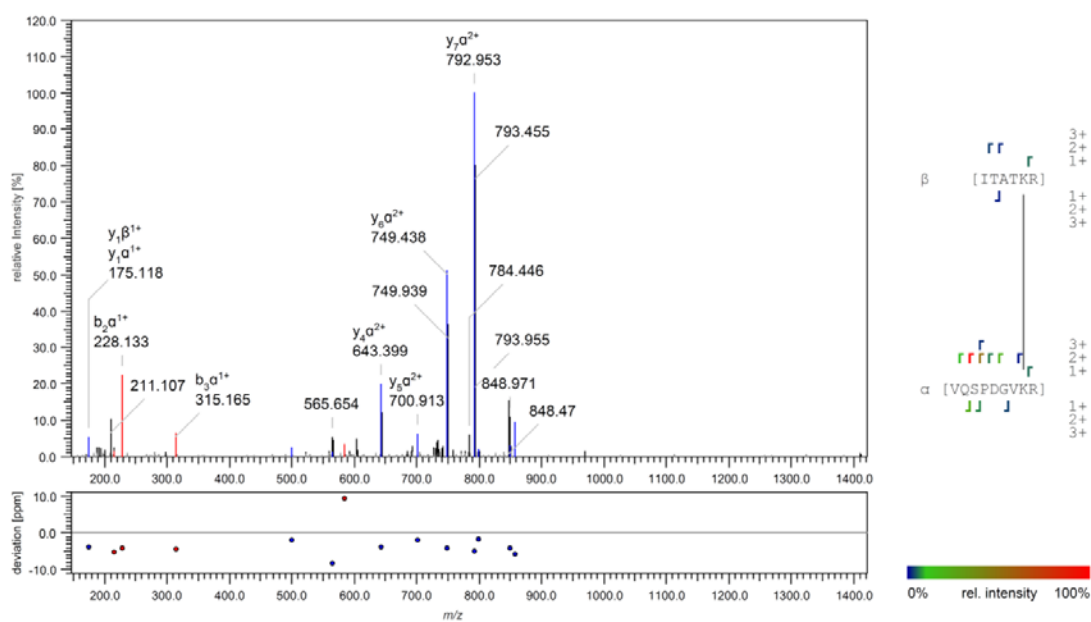


Abbildung A. 15: MS²-Spektrum der Peptide ITATKR und VQSPDGVKR, die in Tabelle 8 mit der Nr.14 aufgelistet sind.

Zu sehen ist eine intramolekulare Quervernetzung (Typ2) von NPL4. Neben dem Fragmentationenspektrum sind die Peptidsequenzen mit den jeweiligen b- und y-Ionen markiert. Die Farbe der Markierung steht für die relative Intensität der einzelnen Ionen. Unter dem Spektrum ist die Massengenauigkeit der Fragmente in ppm angegeben.

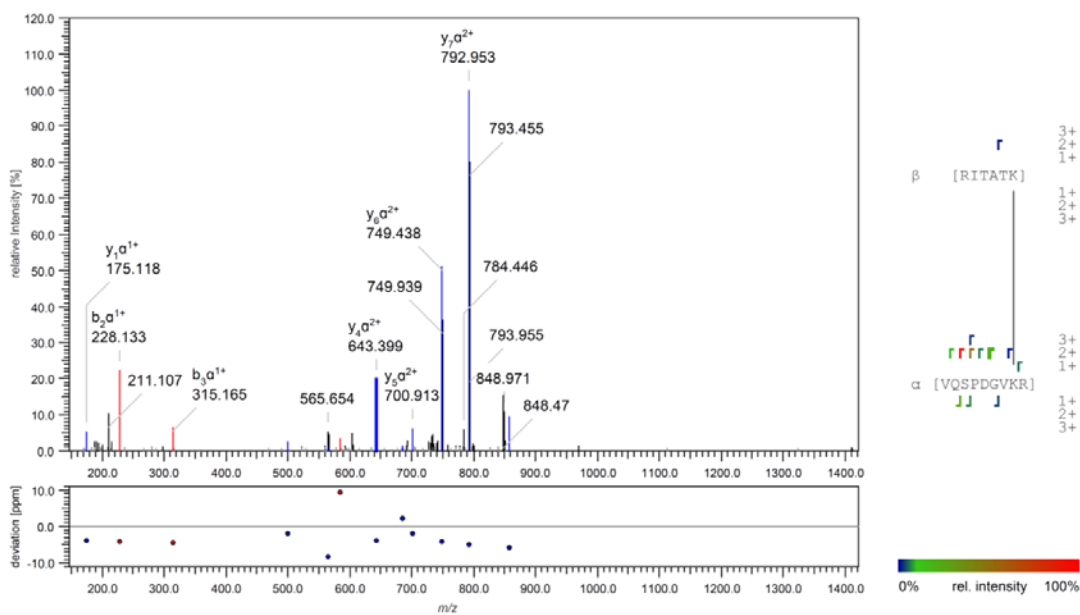


Abbildung A. 16: MS²-Spektrum der Peptide RITATK und VQSPDGVKR, die in Tabelle 8 mit der Nr.15 aufgelistet sind.

Zu sehen ist eine intramolekulare Quervernetzung (Typ2) von NPL4. Neben dem Fragmentationenspektrum sind die Peptidsequenzen mit den jeweiligen b- und y-Ionen markiert. Die Farbe der Markierung steht für die relative Intensität der einzelnen Ionen. Unter dem Spektrum ist die Massengenauigkeit der Fragmente in ppm angegeben.

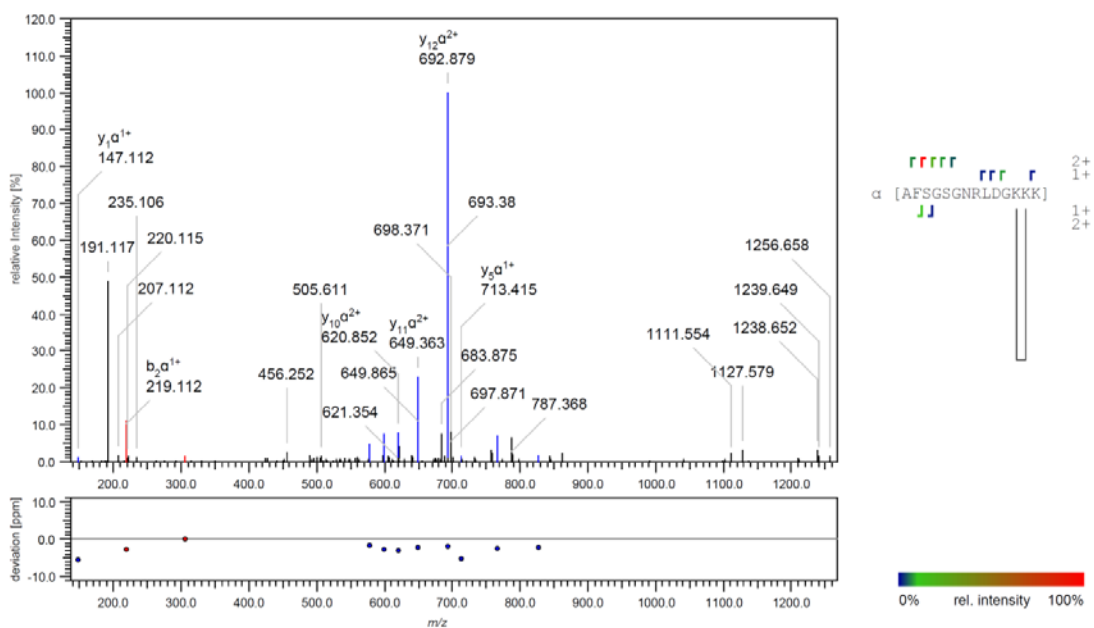


Abbildung A. 17: MS²-Spektrum des Peptids AFGSGNRLDGKKK, das in Tabelle 8 mit der Nr.16 aufgelistet ist.

Zu sehen ist eine intramolekulare Quervernetzung (Typ1) von UFD1. Neben dem Fragmentationenspektrum sind die Peptidsequenzen mit den jeweiligen b- und y-Ionen markiert. Die Farbe der Markierung steht für die relative Intensität der einzelnen Ionen. Unter dem Spektrum ist die Massengenauigkeit der Fragmente in ppm angegeben.

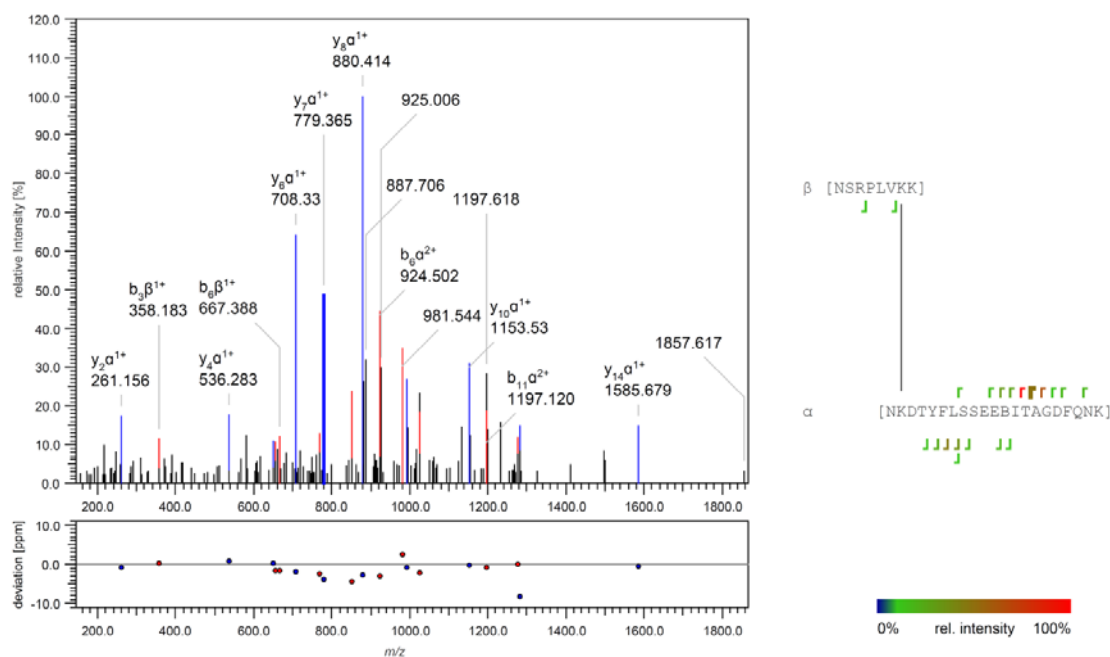


Abbildung A. 18: MS²-Spektrum der Peptide NSRPLVKK und NKDTYFLSSEEBITAGDFQNK, die in Tabelle 8 mit der Nr.17 aufgelistet sind.

Zu sehen ist eine intermolekulare Quervernetzung (Typ2) von NPL4 und UFD1. Neben dem Fragmentationenspektrum sind die Peptidsequenzen mit den jeweiligen b- und y-Ionen markiert. Die Farbe der Markierung steht für die relative Intensität der einzelnen Ionen. Unter dem Spektrum ist die Massengenauigkeit der Fragmente in ppm angegeben. Der Buchstabe B steht für ein alkyliertes Cystein.

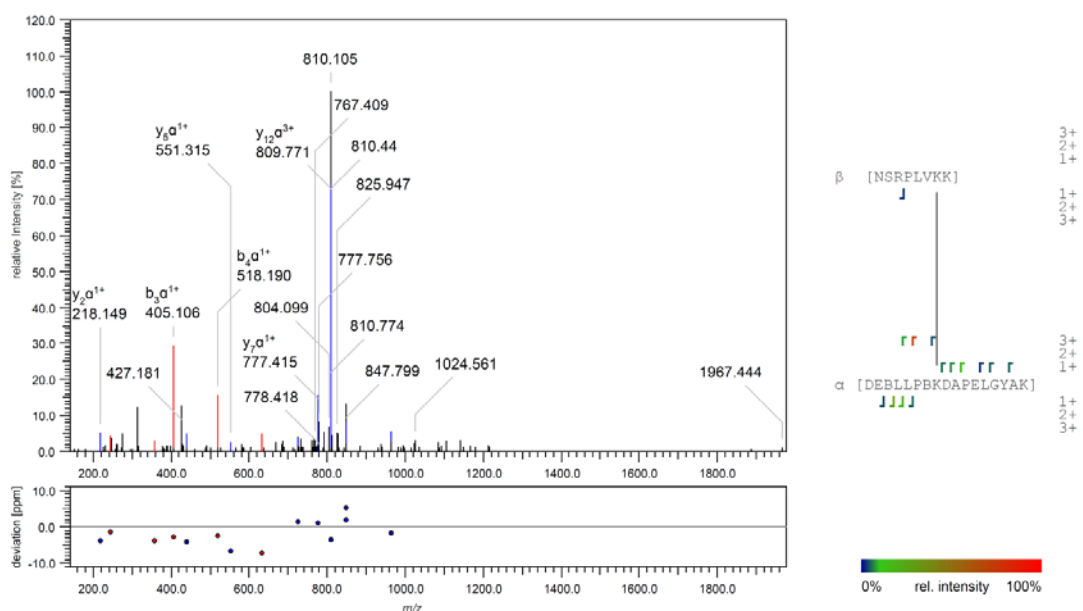


Abbildung A. 19: MS²-Spektrum der Peptide NSRPLVKK und DEBLLPBKDAPELGYAK, die in Tabelle 8 mit der Nr.18 aufgelistet sind.

Zu sehen ist eine intermolekulare Quervernetzung (Typ2) von NPL4 und UFD1. Neben dem Fragmentationenspektrum sind die Peptidsequenzen mit den jeweiligen b- und y-Ionen markiert. Die Farbe der Markierung steht für die relative Intensität der einzelnen Ionen. Unter dem Spektrum ist die Massengenauigkeit der Fragmente in ppm angegeben. Der Buchstabe B steht für ein alkyliertes Cystein.

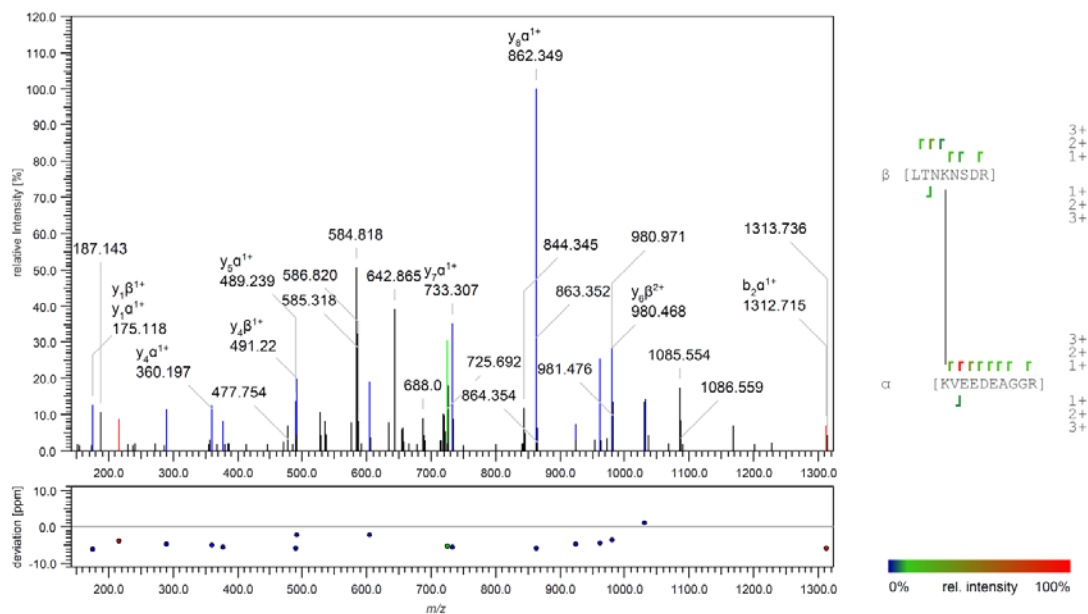


Abbildung A. 20: MS²-Spektrum der Peptide LTNKNSDR und KVEEDEAGGR, die in Tabelle 8 mit der Nr.19 aufgelistet sind.

Zu sehen ist eine intramolekulare Quervernetzung (Typ2) von UFD1. Neben dem Fragmentationenspektrum sind die Peptidsequenzen mit den jeweiligen b- und y-Ionen markiert. Die Farbe der Markierung steht für die relative Intensität der einzelnen Ionen. Unter dem Spektrum ist die Massengenauigkeit der Fragmente in ppm angegeben.

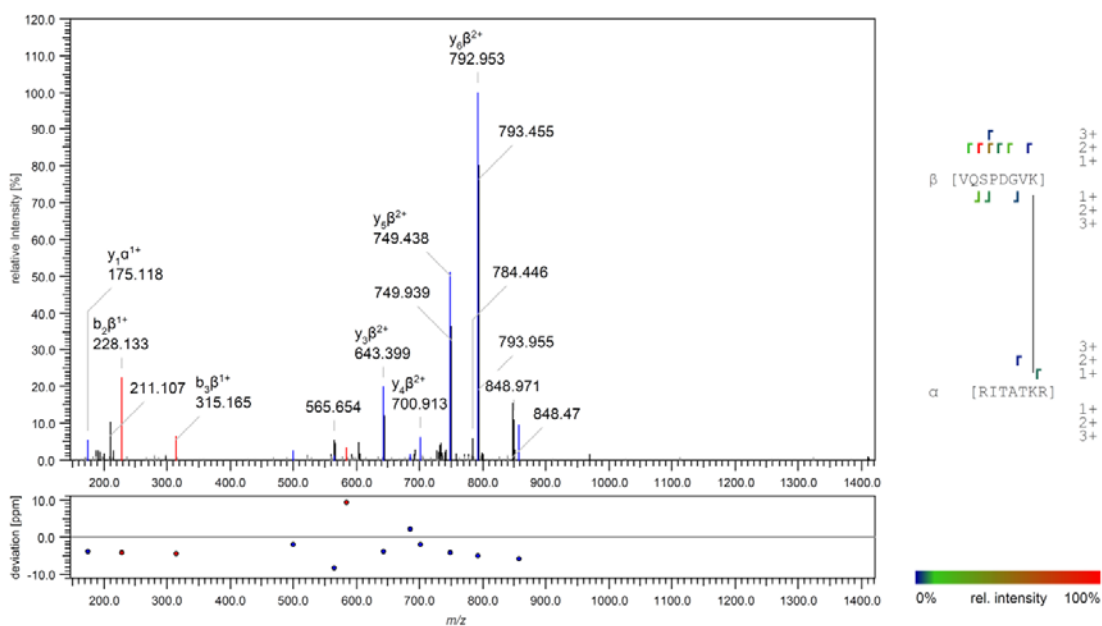


Abbildung A. 21: MS²-Spektrum der Peptide VQSPDGVK und RITATKR, die in Tabelle 8 mit der Nr.20 aufgelistet sind.

Zu sehen ist eine intramolekulare Quervernetzung (Typ2) von NPL4. Neben dem Fragmentionenspektrum sind die Peptidsequenzen mit den jeweiligen b- und y-Ionen markiert. Die Farbe der Markierung steht für die relative Intensität der einzelnen Ionen. Unter dem Spektrum ist die Massengenauigkeit der Fragmente in ppm angegeben.

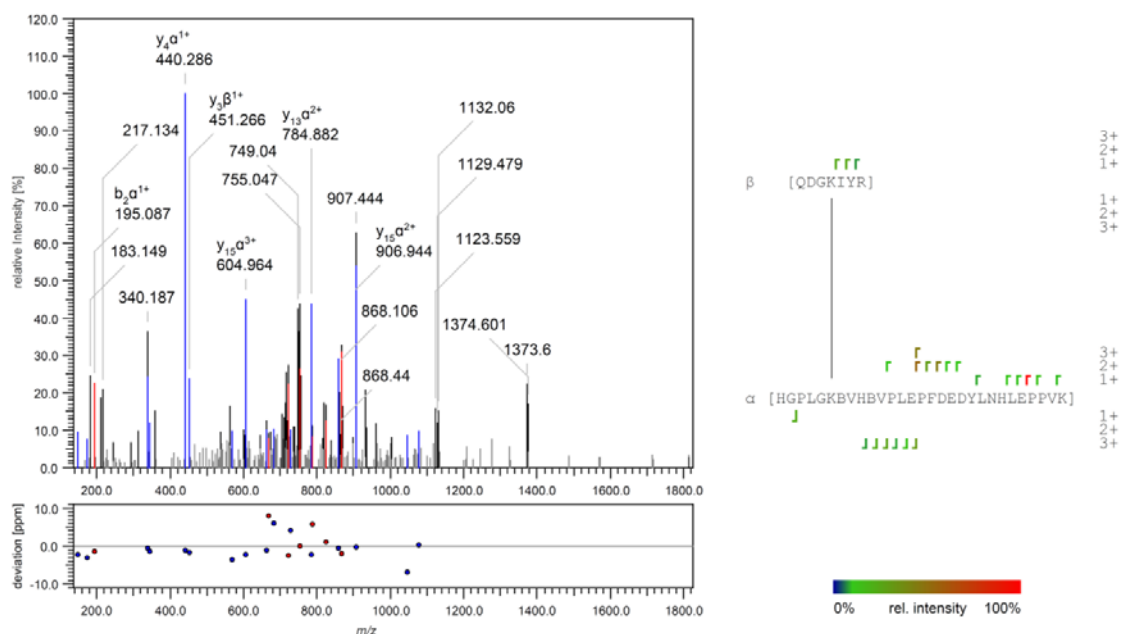


Abbildung A. 22: MS²-Spektrum der Peptide QDGKIYR und HGPLGKBVHVBVPLEPFDEEDYLNHLEPPVK, die in Tabelle 8 mit der Nr.21 aufgelistet sind.

Zu sehen ist eine intramolekulare Quervernetzung (Typ2) von NPL4. Neben dem Fragmentionenspektrum sind die Peptidsequenzen mit den jeweiligen b- und y-Ionen markiert. Die Farbe der Markierung steht für die relative Intensität der einzelnen Ionen. Unter dem Spektrum ist die Massengenauigkeit der Fragmente in ppm angegeben. Der Buchstabe B steht für ein alkyliertes Cystein.

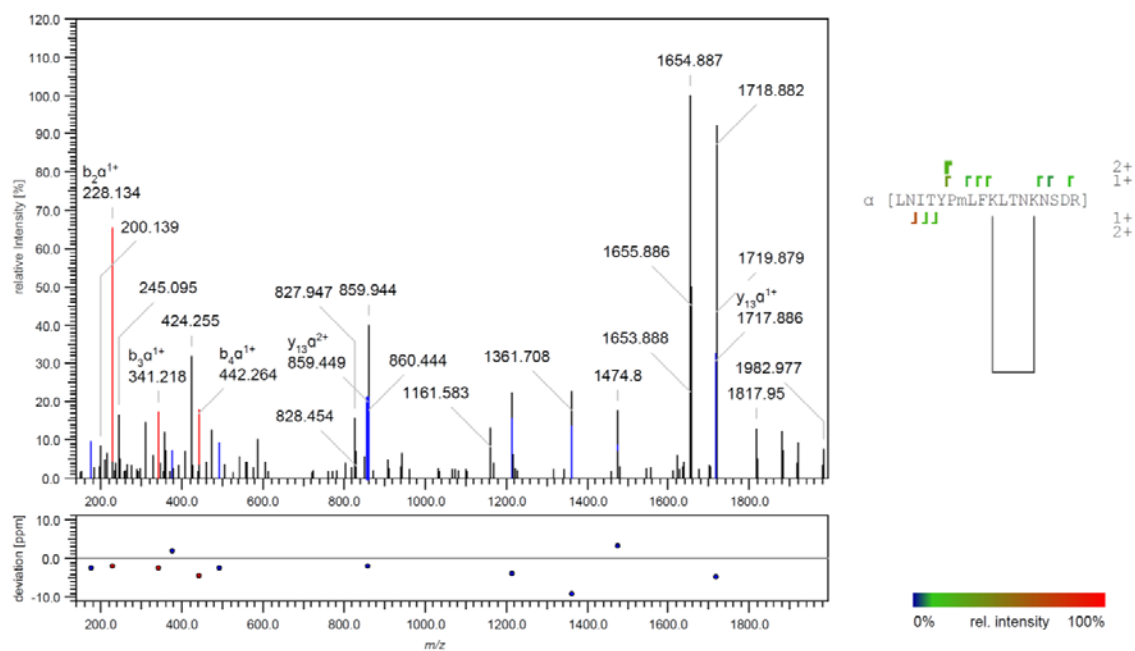


Abbildung A. 23: MS²-Spektrum des Peptids LNTYPM LFKLTNKNSDR, das in Tabelle 8 mit der Nr.22 aufgelistet ist.

Zu sehen ist eine intramolekulare Quervernetzung (Typ1) von UFD1. Neben dem Fragmentationsspektrum sind die Peptidsequenzen mit den jeweiligen b- und y-Ionen markiert. Die Farbe der Markierung steht für die relative Intensität der einzelnen Ionen. Unter dem Spektrum ist die Massengenauigkeit der Fragmente in ppm angegeben. Das kleine m steht für ein oxidiertes Methionin.

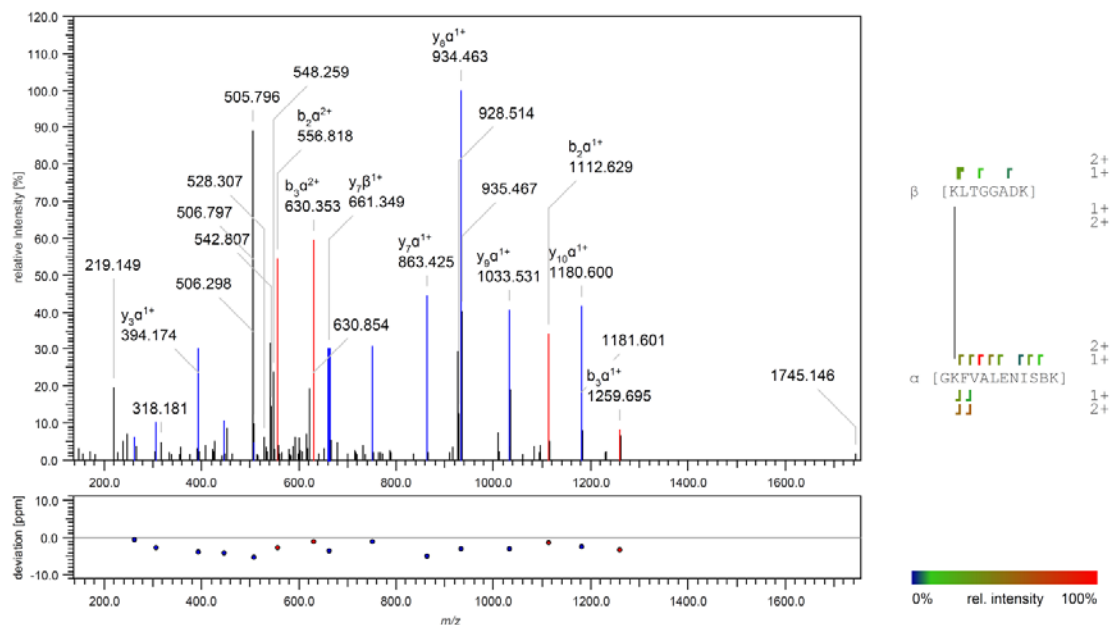


Abbildung A. 24: MS²-Spektrum der Peptide KLTGGADK und GKFVALENISBK, die in Tabelle 8 mit der Nr.23 aufgelistet sind.

Zu sehen ist eine intramolekulare Quervernetzung (Typ2) von NPL4. Neben dem Fragmentationsspektrum sind die Peptidsequenzen mit den jeweiligen b- und y-Ionen markiert. Die Farbe der Markierung steht für die relative Intensität der einzelnen Ionen. Unter dem Spektrum ist die Massengenauigkeit der Fragmente in ppm angegeben.

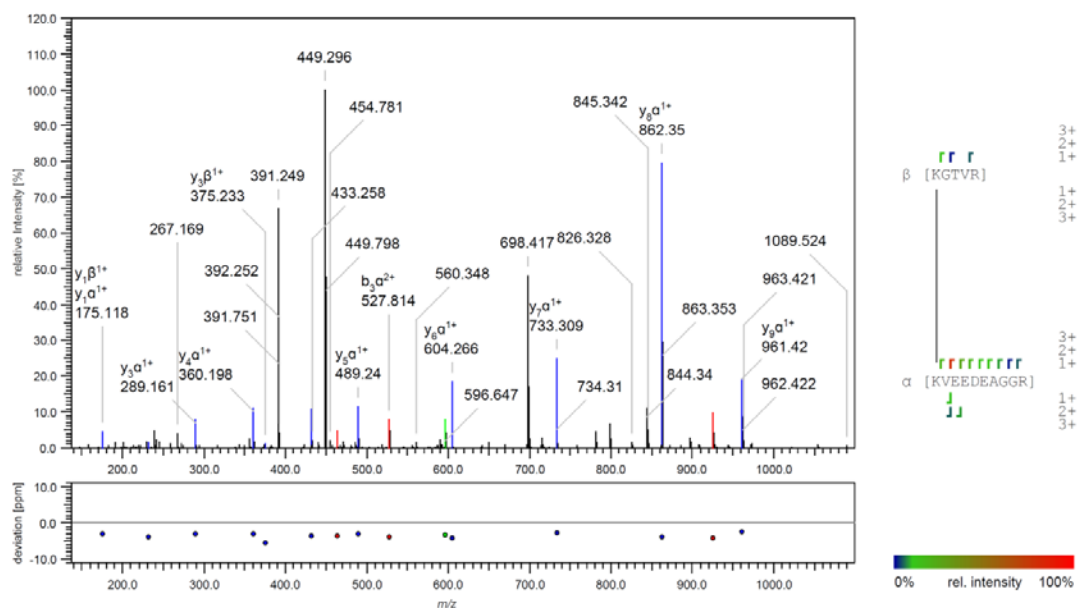


Abbildung A. 25: MS²-Spektrum der Peptide KGTVR und KVEEDEAGGR, die in Tabelle 8 mit der Nr.24 aufgelistet sind.

Zu sehen ist eine intermolekulare Quervernetzung (Typ2) von NPL4 und UFD1. Neben dem Fragmentationsspektrum sind die Peptidsequenzen mit den jeweiligen b- und y-Ionen markiert. Die Farbe der Markierung steht für die relative Intensität der einzelnen Ionen. Unter dem Spektrum ist die Massengenauigkeit der Fragmente in ppm angegeben.

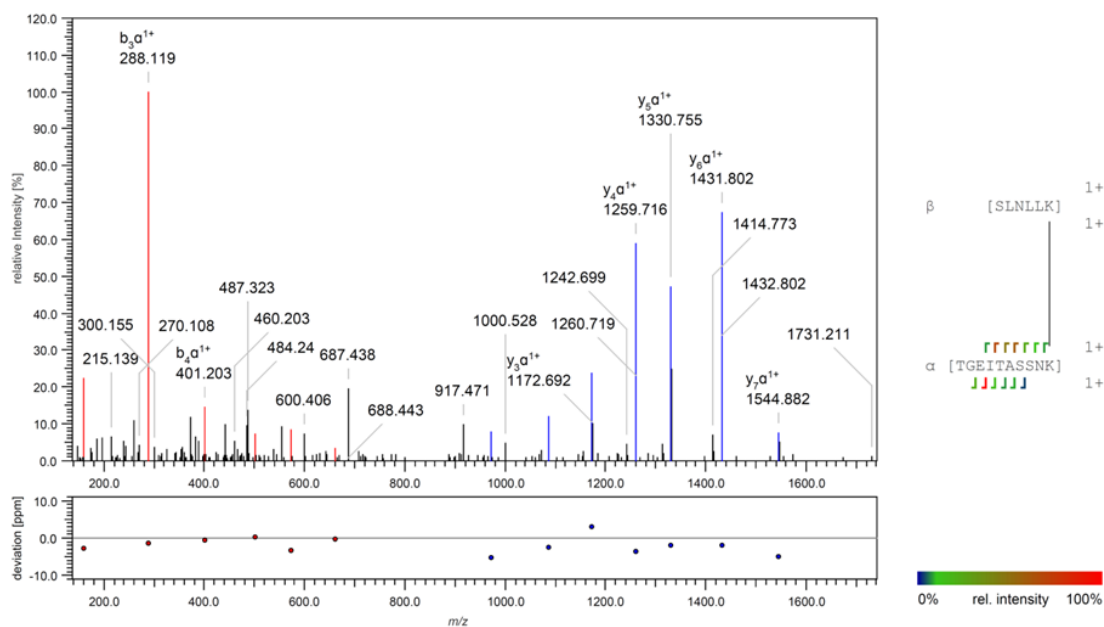


Abbildung A. 26: MS²-Spektrum der Peptide SLNLLK und TGEITASSNK, die in Tabelle 8 mit der Nr.25 aufgelistet sind.

Zu sehen ist eine intramolekulare Quervernetzung (Typ2) von NPL4. Neben dem Fragmentationsspektrum sind die Peptidsequenzen mit den jeweiligen b- und y-Ionen markiert. Die Farbe der Markierung steht für die relative Intensität der einzelnen Ionen. Unter dem Spektrum ist die Massengenauigkeit der Fragmente in ppm angegeben.

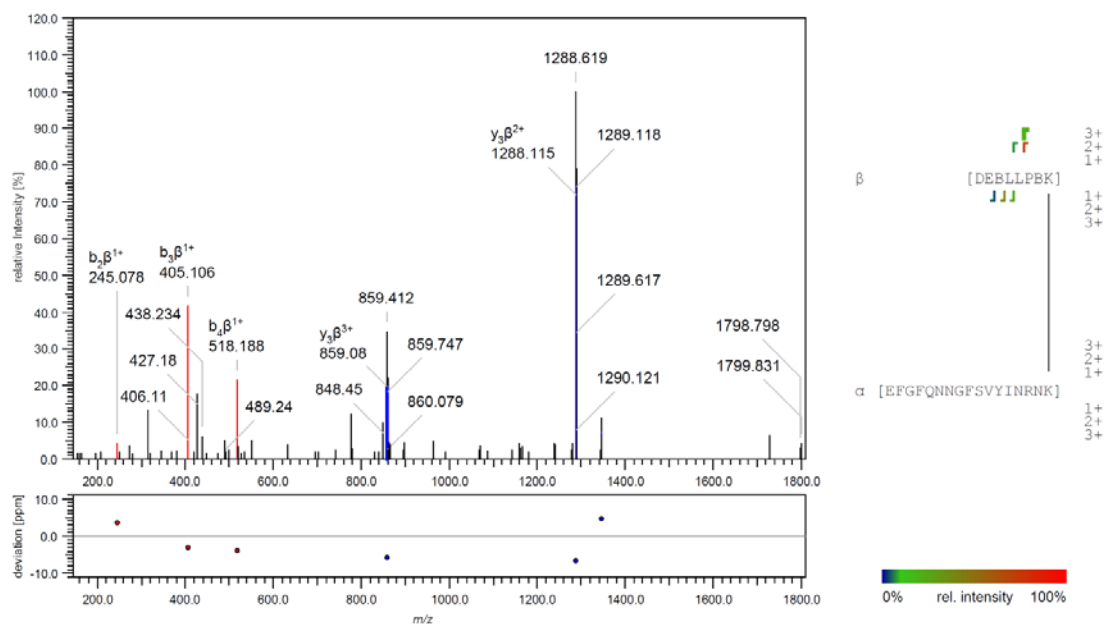


Abbildung A. 27: MS²-Spektrum der Peptide DEBLLPBK und EFGFQNNNGFSVYINRNK, die in Tabelle 8 mit der Nr.26 aufgelistet sind.

Zu sehen ist eine intramolekulare Quervernetzung (Typ2) von NPL4. Neben dem Fragmentationsspektrum sind die Peptidsequenzen mit den jeweiligen b- und y-Ionen markiert. Die Farbe der Markierung steht für die relative Intensität der einzelnen Ionen. Unter dem Spektrum ist die Massengenauigkeit der Fragmente in ppm angegeben. Der Buchstabe B steht für ein alkyliertes Cystein.

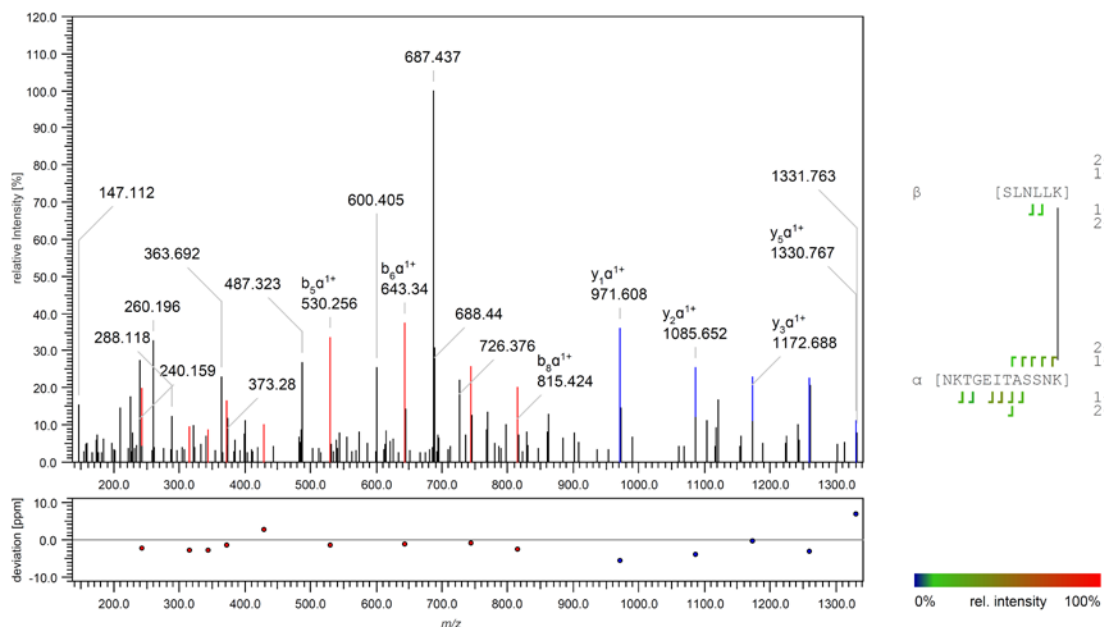


Abbildung A. 28: MS²-Spektrum der Peptide SLNLLK und NKTGEITASSNK, die in Tabelle 8 mit der Nr.27 aufgelistet sind.

Zu sehen ist eine intramolekulare Quervernetzung (Typ2) von NPL4. Neben dem Fragmentationsspektrum sind die Peptidsequenzen mit den jeweiligen b- und y-Ionen markiert. Die Farbe der Markierung steht für die relative Intensität der einzelnen Ionen. Unter dem Spektrum ist die Massengenauigkeit der Fragmente in ppm angegeben.

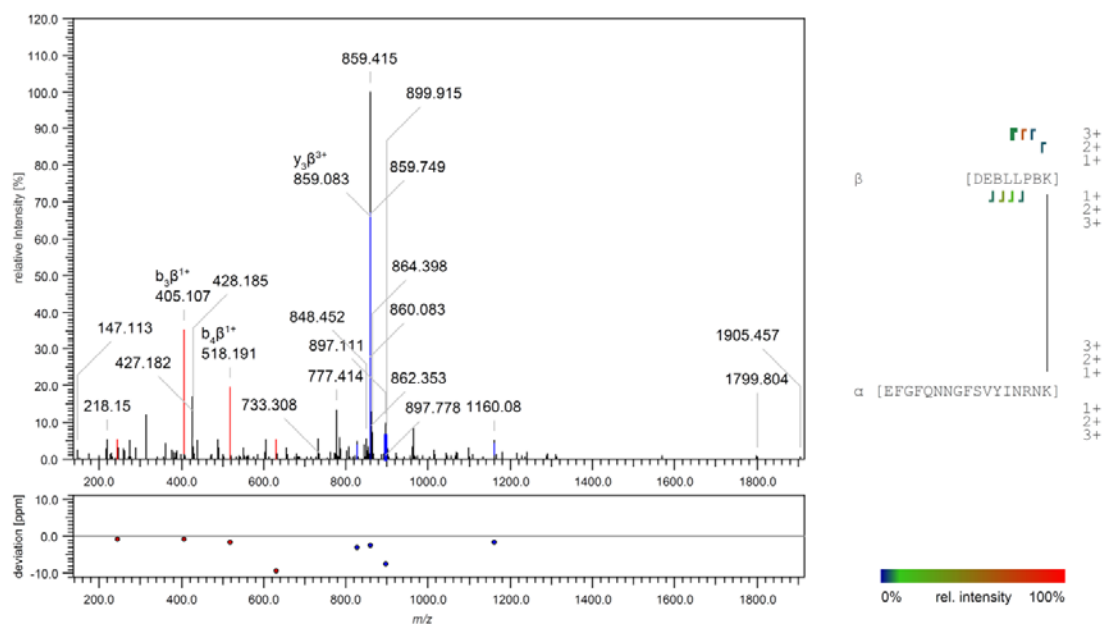


Abbildung A. 29: MS²-Spektrum der Peptide DEBLLPBK und EFGFQNNNGFSVYINRNK, die in Tabelle 8 mit der Nr.28 aufgelistet sind.

Zu sehen ist eine intramolekulare Quervernetzung (Typ2) von NPL4. Neben dem Fragmentationenspektrum sind die Peptidsequenzen mit den jeweiligen b- und y-Ionen markiert. Die Farbe der Markierung steht für die relative Intensität der einzelnen Ionen. Unter dem Spektrum ist die Massengenauigkeit der Fragmente in ppm angegeben. Der Buchstabe B steht für ein alkyliertes Cystein.

8.1.2 Quervernetzung von Med17HA mit BS3

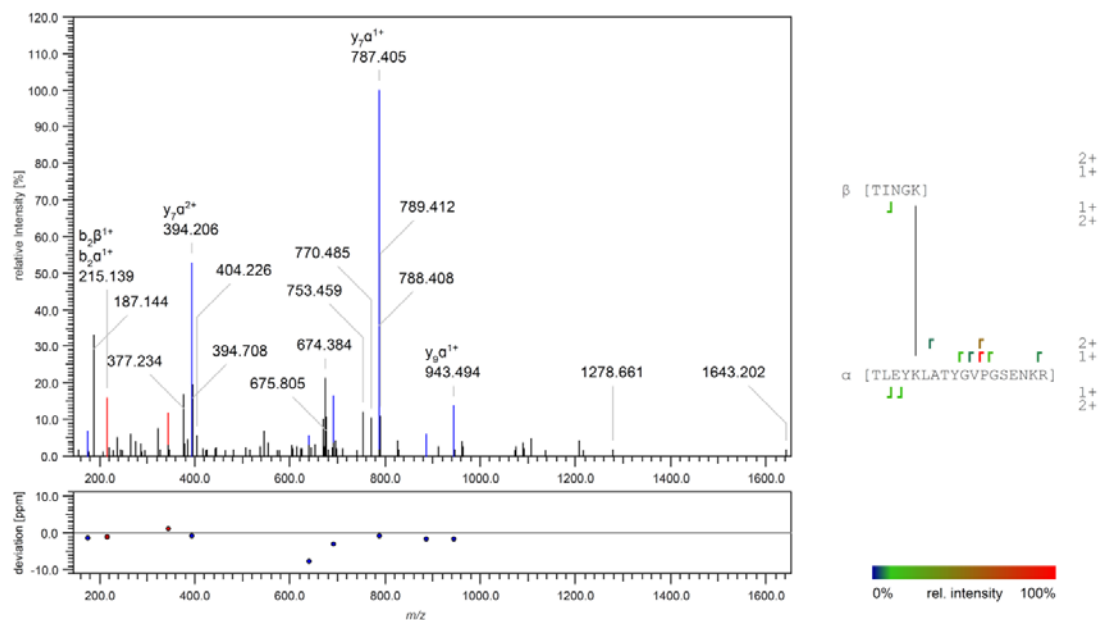


Abbildung A. 30: Ansicht des MS²-Spektrums der Peptide TINGK und TLEYKLATYGVPGSENKR, die in Tabelle 9 mit der Nr.2 aufgelistet sind.

Zu sehen ist eine intermolekulare Quervernetzung (Typ2) von MED15 und MED5. Neben dem Fragmentationenspektrum sind die Peptidsequenzen mit den jeweiligen b- und y-Ionen markiert. Die Farbe der Markierung steht für die relative Intensität der einzelnen Ionen. Unter dem Spektrum ist die Massengenauigkeit der Fragmente in ppm angegeben.

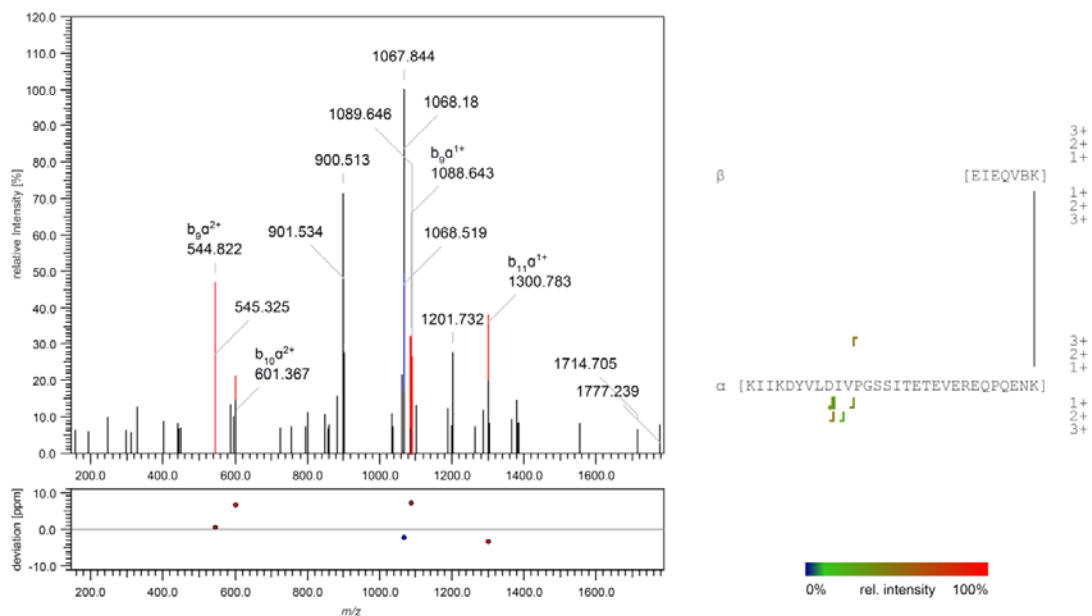


Abbildung A. 31: Ansicht des MS²-Spektrums der Peptide EIEQVBK und KIKDYVLDIVPGSSITETEVEREQQENK, die in Tabelle 9 mit der Nr.3 aufgelistet sind.

Zu sehen ist eine intermolekulare Quervernetzung (Typ2) von MED7 und MED17. Neben dem Fragmentationenspektrum sind die Peptidsequenzen mit den jeweiligen b- und y-Ionen markiert. Die Farbe der Markierung steht für die relative Intensität der einzelnen Ionen. Unter dem Spektrum ist die Massengenauigkeit der Fragmente in ppm angegeben. Der Buchstabe B steht für ein alkyliertes Cystein.

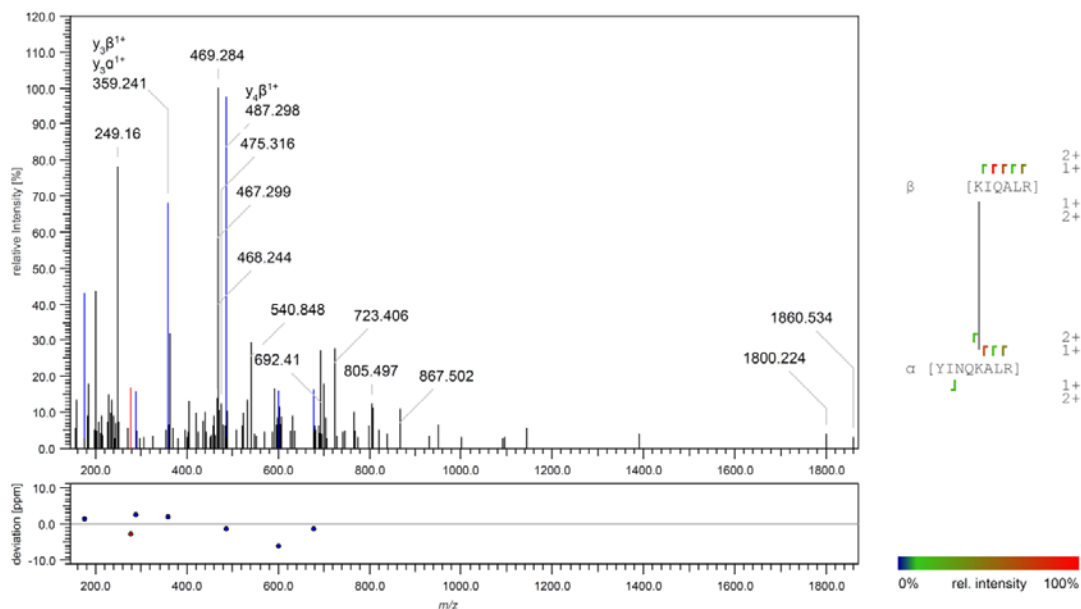


Abbildung A. 32: Ansicht des MS²-Spektrums der Peptide KIQALR und YINQKALR, die in Tabelle 9 mit der Nr.4 aufgelistet sind.

Zu sehen ist eine intramolekulare Quervernetzung (Typ2) von MED15. Neben dem Fragmentationenspektrum sind die Peptidsequenzen mit den jeweiligen b- und y-Ionen markiert. Die Farbe der Markierung steht für die relative Intensität der einzelnen Ionen. Unter dem Spektrum ist die Massengenauigkeit der Fragmente in ppm angegeben.

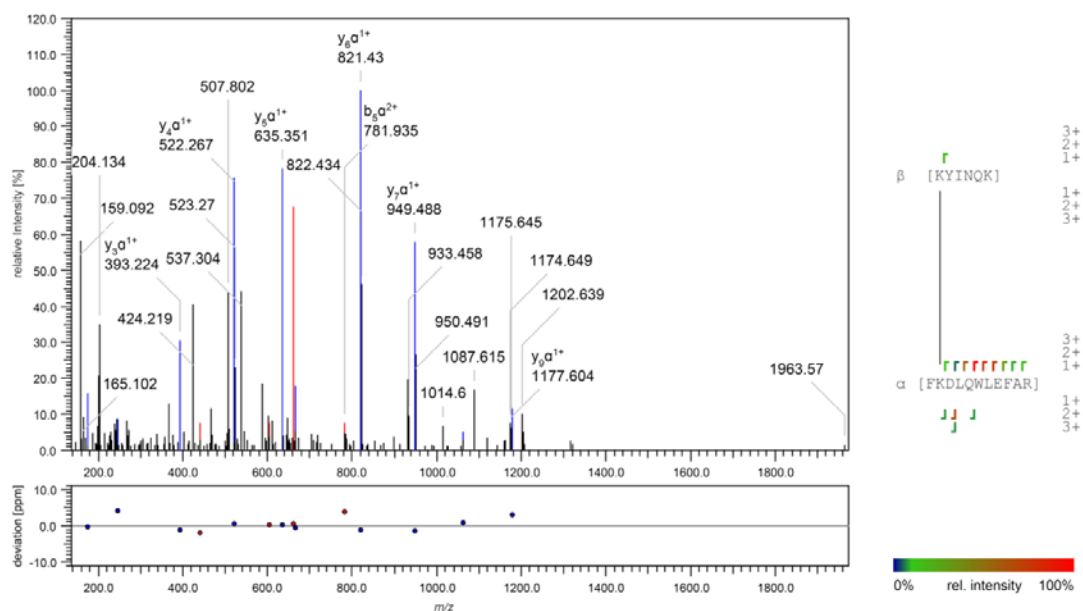


Abbildung A. 33: Ansicht des MS²-Spektrums der Peptide KYINQK und FKDLQWLEFAR, die in Tabelle 9 mit der Nr.5 aufgelistet sind.

Zu sehen ist eine intermolekulare Quervernetzung (Typ2) von MED15 und MED16. Neben dem Fragmentationsspektrum sind die Peptidsequenzen mit den jeweiligen b- und y-Ionen markiert. Die Farbe der Markierung steht für die relative Intensität der einzelnen Ionen. Unter dem Spektrum ist die Massengenauigkeit der Fragmente in ppm angegeben.

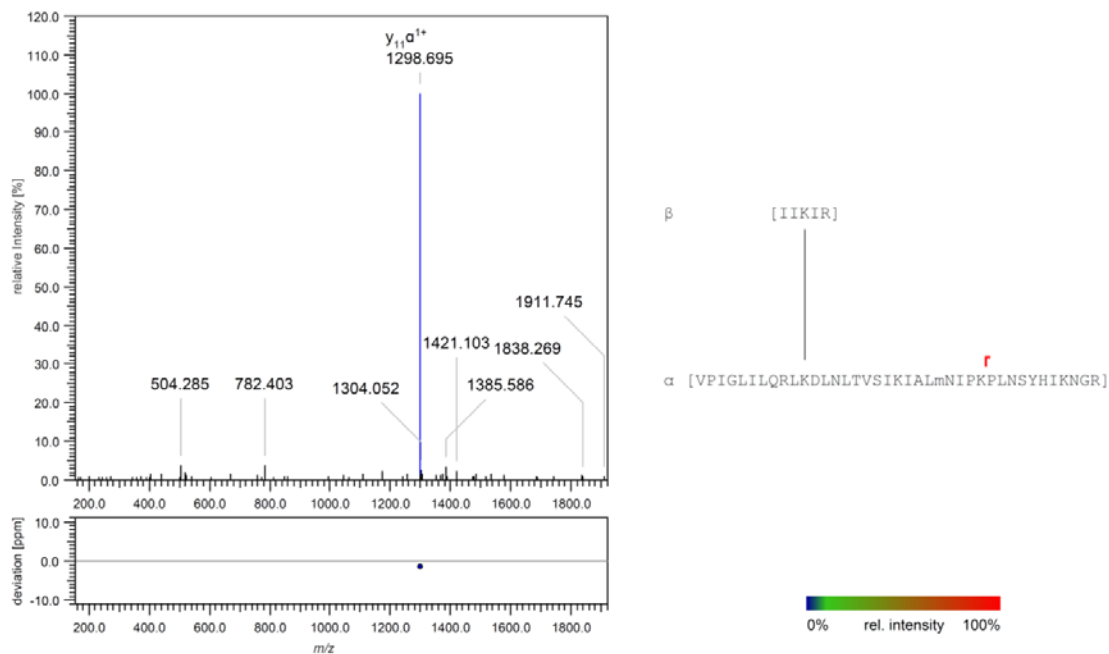


Abbildung A. 34: Ansicht des MS²-Spektrums der Peptide IIKIR und VPIGLILQRLKDLNLTVSIKIALmNIPKPLNSYHIKNGR, die in Tabelle 9 mit der Nr. 6 markiert wurden.

Zu sehen ist eine intermolekulare Quervernetzung (Typ2) von MED12 und MED14. Neben dem Fragmentationsspektrum sind die Peptidsequenzen mit den jeweiligen b- und y-Ionen markiert. Die Farbe der Markierung steht für die relative Intensität der einzelnen Ionen. Unter dem Spektrum ist die Massengenauigkeit der Fragmente in ppm angegeben. Das kleine m steht für ein oxidiertes Methionin.

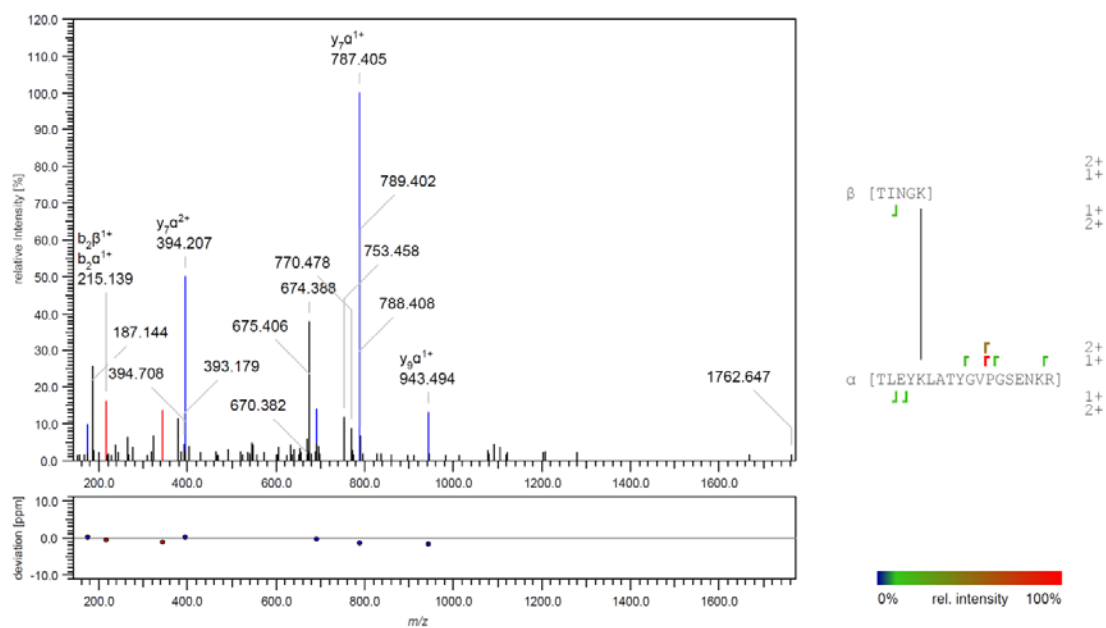


Abbildung A. 35: Ansicht des MS²-Spektrums der Peptide TINGK und TLEYKLATYGVPGSENKR, die in Tabelle 9 mit der Nr.7 aufgelistet sind.

Zu sehen ist eine intermolekulare Quervernetzung (Typ2) von MED15 und MED5. Neben dem Fragmentationsspektrum sind die Peptidsequenzen mit den jeweiligen b- und y-Ionen markiert. Die Farbe der Markierung steht für die relative Intensität der einzelnen Ionen. Unter dem Spektrum ist die Massengenauigkeit der Fragmente in ppm angegeben.

8.1.3 Quervernetzen von Cytochrom C mit DSSO

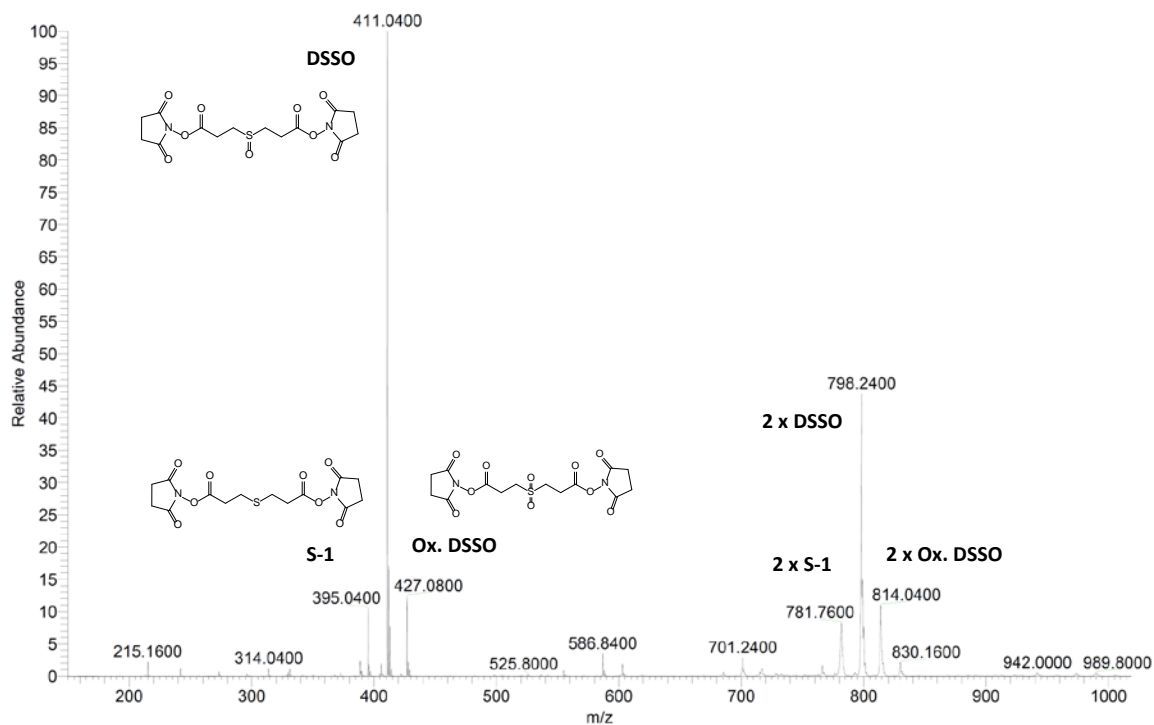


Abbildung A. 36: Massenspektrum von Disuccinimidylsulfoxid, das für das Quervernetzen von Cytochrom C verwendet wurde.

Zu sehen sind DSSO [$M + Na^+$; 411.04], Sulfid S1 [$M + Na^+$; 395.04] und das oxidierte DSSO [$M + Na^+$; 427.08]. Außerdem sind die 3 genannten Formen als Dimere zu sehen: DSSO [$M + M + Na^+$; 798.24], Sulfid S1 [$M + M + Na^+$; 798.24] und oxidiertes DSSO [$M + M + Na^+$; 814.04]. Die Messung wurde an der LTQ Velos Pro per direct infusion durchgeführt.

>sp|P62894|CYC_BOVIN Cytochrome C OS=Bos taurus GN=CYCS PE=1 SV=2

```

      10      20      30      40      50
MGDVEKGGKI FVQKCAQCHT VEKGGKHKHTG PNLHGLFGRK TGQAPGFSYT
      60      70      80      90     100
DANKNKGITW GEETLMEYLE NPKKYIPGTK MIFAGIKKKG EREDLIAYLK

```

KATNE

Abbildung A. 37: Aminosäuresequenz des bovinen Cytochrom C im FASTA-Format, das für die Quervernetzungsversuche mit DSSO verwendet wurde.

Tabelle A. 1: Liste der Peptide von Cytochrom C, die mit DSSO modifiziert und mit Elastase verdaut wurden.

Die Rohdaten der LC-MS/MS Messung vom In-Lösungsverdau wurden mit einem Skript modifiziert und die MS³-Spektren für die Datenbanksuche verwendet. Zwei Peptide, die aus aufeinanderfolgenden MS³-Massenscans stammen, stellen potentielle quervernetzte Peptide dar. Alle Peptide, die nicht aus aufeinanderfolgenden MS³-Massenscans stammen wurden aus dieser Tabelle herausgefiltert.

Nr.	m/z	z	Peptid	Modifikation	Scan
1	835.8751	2	KTGQAPGFSYTDANK	DSSO inter T (K)	2291
2	819.88947	2	KTGQAPGFSYTDANK	DSSO inter A (K)	2292
3	430.748	2	KYIPGTK	DSSO inter A (K)	2922
4	497.26512	2	MIFAGIKK	DSSO inter T (K)	2923
5	572.3414	2	MIFAGIKKK	2 DSSO inter A (K)	3382
6	588.31992	2	MIFAGIKKK	DSSO inter A (K); DSSO inter T (K)	3383
7	760.88698	2	GEREDLIAYLKK	DSSO inter T (K)	3975
8	481.28093	2	MIFAGIKK	DSSO inter A (K)	3976
9	839.77674	3	MIFAGIKKKGEREDLIAYLK	2 DSSO inter A (K); DSSO inter T (K)	4158
10	653.85253	2	GEREDLIAYLK		4159
11	653.85305	2	GEREDLIAYLK		4335
12	430.74909	2	KYIPGTK	DSSO inter A (K)	4336
13	778.04684	3	KKGEREDLIAYLKKATNE	DSSO inter A (K); 2 DSSO inter T (K)	4446
14	767.38965	3	KKGEREDLIAYLKKATNE	2 DSSO inter A (K); DSSO inter T (K)	4447
15	819.88942	2	KTGQAPGFSYTDANK	DSSO inter A (K)	4491
16	835.87535	2	KTGQAPGFSYTDANK	DSSO inter T (K)	4492

Anhang

17	1153.5534	2	NKGITWGEETLMEYLENPK	DSSO inter A (K)	4709
18	1169.5387	2	NKGITWGEETLMEYLENPK	DSSO inter T (K)	4710
19	572.33214	2	MIFAGIKKK	2 DSSO inter A (K)	4882
20	588.31943	2	MIFAGIKKK	DSSO inter A (K); DSSO inter T (K)	4883
21	572.34013	2	MIFAGIKKK	2 DSSO inter A (K)	5075
22	588.31848	2	MIFAGIKKK	DSSO inter A (K); DSSO inter T (K)	5076
23	1096.528	2	GITWGEETLMEYLENPKK	DSSO inter A (K)	5279
24	1112.5146	2	GITWGEETLMEYLENPKK	DSSO inter T (K)	5280
25	1096.5267	2	GITWGEETLMEYLENPKK	DSSO inter A (K)	5549
26	1112.5112	2	GITWGEETLMEYLENPKK	DSSO inter T (K)	5550
27	627.64112	3	KTGQAPGFSYTDANKNK	DSSO inter A (K)	1814
28	638.2989	3	KTGQAPGFSYTDANKNK	DSSO inter T (K)	1815
29	819.8902	2	KTGQAPGFSYTDANK	DSSO inter A (K)	2247
30	835.87516	2	KTGQAPGFSYTDANK	DSSO inter T (K)	2248
31	892.89572	2	TGQAPGFSYTDANKNK	DSSO inter T (K)	2251
32	876.91033	2	TGQAPGFSYTDANKNK	DSSO inter A (K)	2252

Anhang

33	819.8903	2	KTGQAPGFSYTDANK	DSSO inter A (K)	2703
34	835.8757	2	KTGQAPGFSYTDANK	DSSO inter T (K)	2704
35	507.25116	3	HKTGPNLHGLFGR	DSSO inter T (K)	2712
36	496.60228	3	HKTGPNLHGLFGR	DSSO inter A (K)	2713
37	550.28914	3	KKGEREDLIAYLK	DSSO inter T (K)	2912
38	539.63597	3	KKGEREDLIAYLK	DSSO inter A (K)	2913
39	550.29661	3	KGEREDLIAYLKK	DSSO inter T (K)	3148
40	539.63416	3	KGEREDLIAYLKK	DSSO inter A (K)	3149
41	496.93777	3	KGEREDLIAYLK	DSSO inter A (K)	3193
42	507.59796	3	KGEREDLIAYLK	DSSO inter T (K)	3194
43	496.94089	3	KGEREDLIAYLK	DSSO inter A (K)	3361
44	507.59844	3	GEREDLIAYLKK	DSSO inter T (K)	3362
45	568.29435	3	KKGEREDLIAYLK	DSSO inter A (K); DSSO inter T (K)	3259
46	653.8524	2	GEREDLIAYLK		3260
47	496.94034	3	KGEREDLIAYLK	DSSO inter A (K)	3305
48	507.59355	3	KGEREDLIAYLK	DSSO inter T (K)	3306
49	760.89028	2	GEREDLIAYLKK	DSSO inter T (K)	3481
50	744.90484	2	GEREDLIAYLKK	DSSO inter A (K)	3482
51	573.8223	2	EDLIAYLKK	DSSO inter A (K)	3941
52	589.8105	2	EDLIAYLKK	DSSO inter T (K)	3942
53	573.81205	2	EDLIAYLKK	DSSO inter A (K)	4037

54	589.81002	2	EDLIAYLKK	DSSO inter T (K)	4038
55	856.43715	2	GDVEKGKKIFVQK	Acetyl (Protein N-term); 2 DSSO inter A (K);	4116
56	865.44217	2	GDVEKGKKIFVQK	Acetyl (Protein N-term); 2 DSSO inter A (K);	4117
57	571.29259	3	GDVEKGKKIFVQK	Acetyl (Protein N-term); 2 DSSO inter A (K);	4127
58	577.29898	3	GDVEKGKKIFVQK	Acetyl (Protein N-term); 2 DSSO inter A (K);	4128
59	839.77656	3	MIFAGIKKKGEREDLIAYLK	2 DSSO inter A (K); DSSO inter T (K)	4605
60	653.85533	2	GEREDLIAYLK		4606
61	960.98897	2	YIPGTKMIFAGIKKK	DSSO inter A (K); 2 DSSO inter T (K)	4411
62	969.99305	2	YIPGTKMIFAGIKKK	DSSO inter A (K); DSSO inter S (K);	4412
63	876.90969	2	TGQAPGFSYTDANKNK	DSSO inter A (K)	4563
64	892.89513	2	TGQAPGFSYTDANKNK	DSSO inter T (K)	4564
65	819.88963	2	KTGQAPGFSYTDANK	DSSO inter A (K)	4720
66	835.87571	2	KTGQAPGFSYTDANK	DSSO inter T (K)	4721
67	481.27921	2	MIFAGIKK	DSSO inter A (K)	4612
68	497.26726	2	MIFAGIKK	DSSO inter T (K)	4613
69	812.06833	3	NKGITWGEETLMEYLENPKK	DSSO inter A (K)	4872
70	822.72501	3	NKGITWGEETLMEYLENPKK	DSSO inter T (K)	4873

Anhang

71	1112.5145	2	GITWGEETLMEYLENPKK	DSSO inter T (K)	5043
72	1096.5286	2	GITWGEETLMEYLENPKK	DSSO inter A (K)	5044
73	1112.5145	2	GITWGEETLMEYLENPKK	DSSO inter T (K)	4841
74	794.40219	2	MIFAGIKKKGER	2 DSSO inter A (K); DSSO inter T (K);	4842
75	497.25643	2	MIFAGIKK	DSSO inter T (K)	4949
76	731.35586	3	GITWGEETLMEYLENPKK	DSSO inter A (K)	4950
77	1112.5143	2	GITWGEETLMEYLENPKK	DSSO inter T (K)	4956
78	1096.5297	2	GITWGEETLMEYLENPKK	DSSO inter A (K)	4957
79	1112.5178	2	GITWGEETLMEYLENPKK	DSSO inter T (K)	4998
80	786.40676	2	MIFAGIKKKGER	2 DSSO inter A (K); DSSO inter T (K)	4999
81	811.39592	2	MIFAGIKKKGER	DSSO inter A (K); DSSO inter S (K);	5005
82	731.35506	3	GITWGEETLMEYLENPKK	DSSO inter A (K)	5006
83	430.74548	2	KYIPGTK	DSSO inter A (K)	5159
84	446.73763	2	KYIPGTK	DSSO inter T (K)	5160
85	1112.5142	2	GITWGEETLMEYLENPKK	DSSO inter T (K)	5320
86	1096.5276	2	GITWGEETLMEYLENPKK	DSSO inter A (K)	5321

87	1112.5147	2	GITWGEETLMEYLENPKK	DSSO inter T (K)	5326
88	1096.5273	2	GITWGEETLMEYLENPKK	DSSO inter A (K)	5327
89	945.00163	2	YIPGTKMIFAGIKKK	2 DSSO inter A (K); DSSO inter T (K)	5400
90	1112.5097	2	GITWGEETLMEYLENPKK	DSSO inter T (K)	5401

8.1.4 Quervernetzen von UBX und p97N mit DSSO

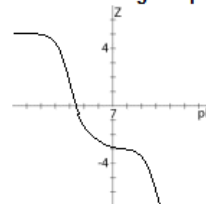
Sequence interpretation

Single letter code: NH₂-GFPWDEYKLLSTFPRIHVLPIDDTVEGITG NLFEVYLPKY FLEAYR-COOH
 Triple letter code: NH₂-Gly - Phe - Pro - Trp - Asp - Glu - Tyr - Lys - Leu - Leu - Ser - Thr - Phe - Pro - Arg - Ile - His - Val - Leu - Pro - Ile - Asp - Asp - Thr - Val - Glu - Gly - Ile - Thr - Gly - Asn - Leu - Phe - Glu - Val - Tyr - Leu - Lys - Pro - Tyr - Phe - Leu - Glu - Ala - Tyr - Arg -COOH

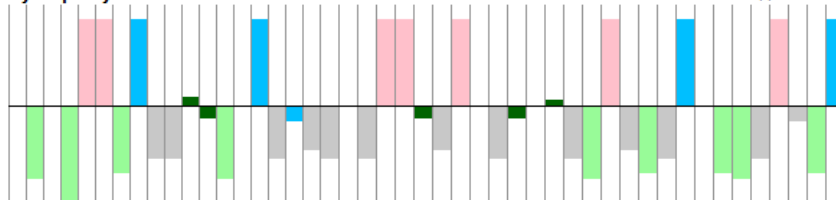
Physicochemical properties

Number of residues: 46
 Molecular weight: 5464.18 g/mol *notes on MW*
 Extinction coefficient: 10810 M⁻¹cm⁻¹ *notes on Ext. Coefficient*
 Iso-electric point: pH 4.38 *notes on pI*
 Net charge at pH 7: -2.9 *notes on net charge*
 Estimated solubility: Poor water solubility. *notes on solubility*

Net charge vs pH



Hydropathy



Top is hydrophilic
 Bottom is hydrophobic
 Color codes:

Acidic Aromatic Basic Aliphatic Polar Cysteine

Abbildung A. 38: Berechnung der Hydrophobizität des Peptids GFPWDEYKLLSTFPRIHVLPIDDT-VEGITGNLFEVYLPKYFLEAYR (Quelle: pepcalc.com Innovagen).

8.1.5 Methodenentwicklung für die Precursor-Selektion von quervernetzten Peptiden

>sp|P00722|BGAL_ECOLI Beta-galactosidase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=lacZ PE=1 SV=2

```

      10      20      30      40      50
MTMITDSLAV VLQRRDWENP GVTQLNRLAA HPPFASWRNS EEARTDRPSQ
      60      70      80      90     100
QLRSLNGEWR FAWFPAPEAV PESWLECDLP EADTVVVPSN WQMHGYDAPI
     110     120     130     140     150
YTNVTYPITV NPPFVPTENP TGCYSLTFNV DESWLQEGQT RIIFDGVNSA
     160     170     180     190     200
FHLWCNRRWV GYGQDSRLPS EFDLSAFLRA GENRLAVMVL RWSDGSYLED
     210     220     230     240     250
QDMWRMSGIF RDVSL LHKPT TQISDFHVAT RFNDDFSRAV LEAEVQMCGE
     260     270     280     290     300
LRDYLRVTVS LWQGETQVAS GTAPFGGEII DERGGYADRV TLRNLNENPK
     310     320     330     340     350
LWSAEIPNLY RAVVELHTAD GTLIEAEACD VGFREVRIEN GLLLLLNGKPL
     360     370     380     390     400
LIRGVNRHEH HPLHGQVMDE QTMVQDILLM KQNNFNAVRC SHYPNHPLWY
     410     420     430     440     450
TLCDRYGLYV VDEANIETHG MVPMNRLTDD PRWLPAMSER VTRMVQRDRN
     460     470     480     490     500
HPSVIIISLG NESGHGANHD ALYRWIKSVD PSRPVQYEGG GADTTATDII
     510     520     530     540     550
CPMYARVDED QPFPVAVPKWS IKKWLSLPGE TRPLILCEYA HAMGNSLGGF
     560     570     580     590     600
AKYWQAFRQY PRLQGGFVWD WVDQSLIKYD ENGNPWSAYG GDFGDTPNDR
     610     620     630     640     650
QFCMNGLVFA DRTPHPALTE AKHQQQFFQF RLSGQTIEVT SEYLFRRHSDN
     660     670     680     690     700
ELLHWMVALD GKPLASGEVP LDVAPQGKQL IELPELPQPE SAGQLWLTVR
     710     720     730     740     750
VVQPNATAWS EAGHISAWQQ WRLAENLSVT LPAASHAI PH LTTSEMDFCI
     760     770     780     790     800
ELGNKRWQFN RQSGFLSQMW IGDKKQLLTP LRDQFTRAPL DNDIGVSEAT
     810     820     830     840     850
RIDPNAWVER WKAAGHYQAE AALLQCTADT LADAVLITTA HAWQHQGKTL
     860     870     880     890     900
FISRKYRID GSGQMAITVD VEVASDTPHP ARIGLNCQLA QVAERVNWLG
     910     920     930     940     950
LGPQENYPDR LTAACFDRWD LPLSDMYTPY VFPSENGLRC GTRELNYGPH
     960     970     980     990    1000
QWRGDFQFNI SRYSQQQLME TSHRHLLHAE EGTWLNIDGF HMGIGGDDSW
    1010    1020
SPSVSAEFQL SAGRYHYQLV WCQK

```

Abbildung A. 39: Aminosäuresequenz des Proteins β -Galactosidase aus *Escherichia coli* im FASTA-Format, das für die Markierungsversuche mit $H_2^{18}O$ und Trypsin verwendet wurde.

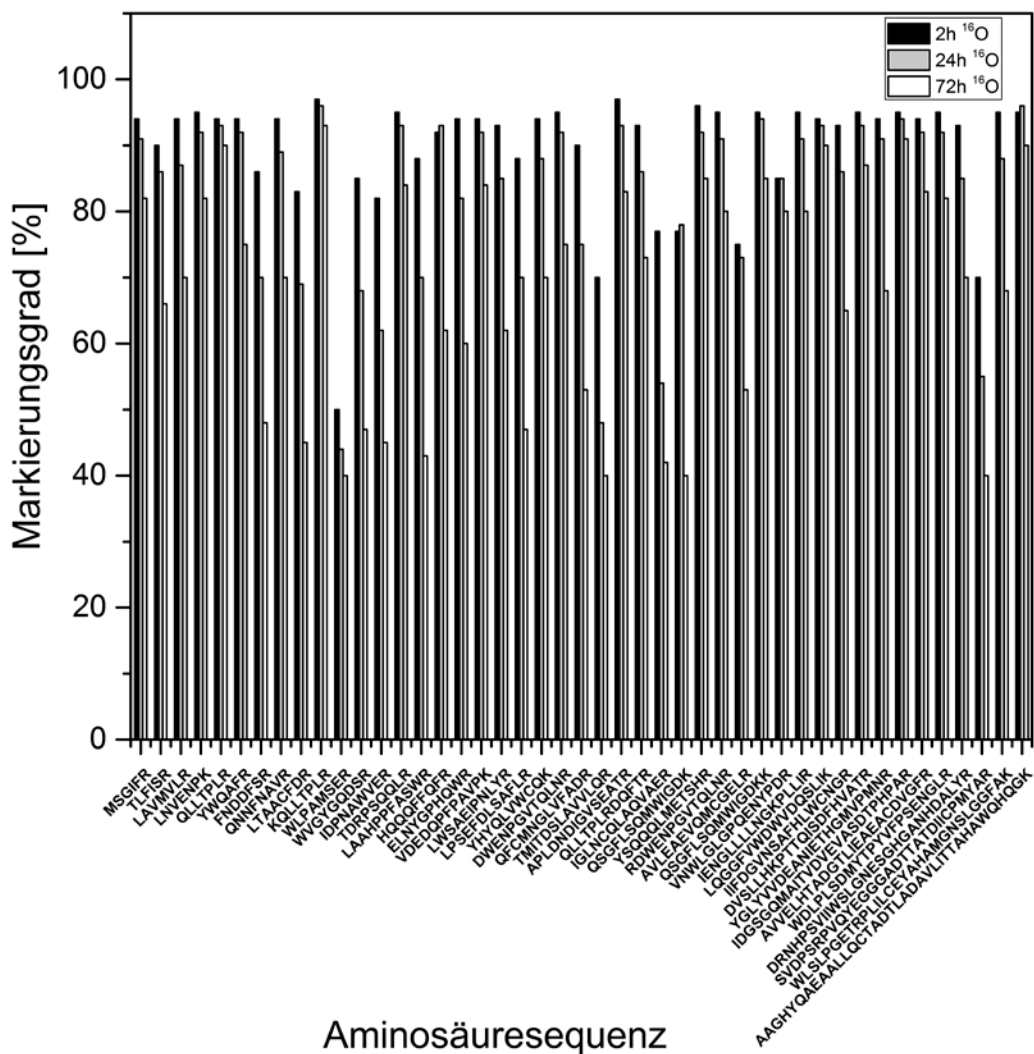


Abbildung A. 40: Enzymatische Markierung der C-Termini von tryptischen Peptiden aus β -Galactosidase mit ^{18}O .

Gezeigt ist der Markierungsgrad der verschiedenen Peptide mit 2-mal ^{18}O am C-Terminus. Der Rücktausch der Markierung, wurde durch die Zugabe von 50 % H_2^{16}O , zu den Zeitpunkten 2, 24 und 72 h nach der Markierung überprüft. Die Auswertung wurde über das Isotopenmuster im Mascot Distiller durchgeführt.

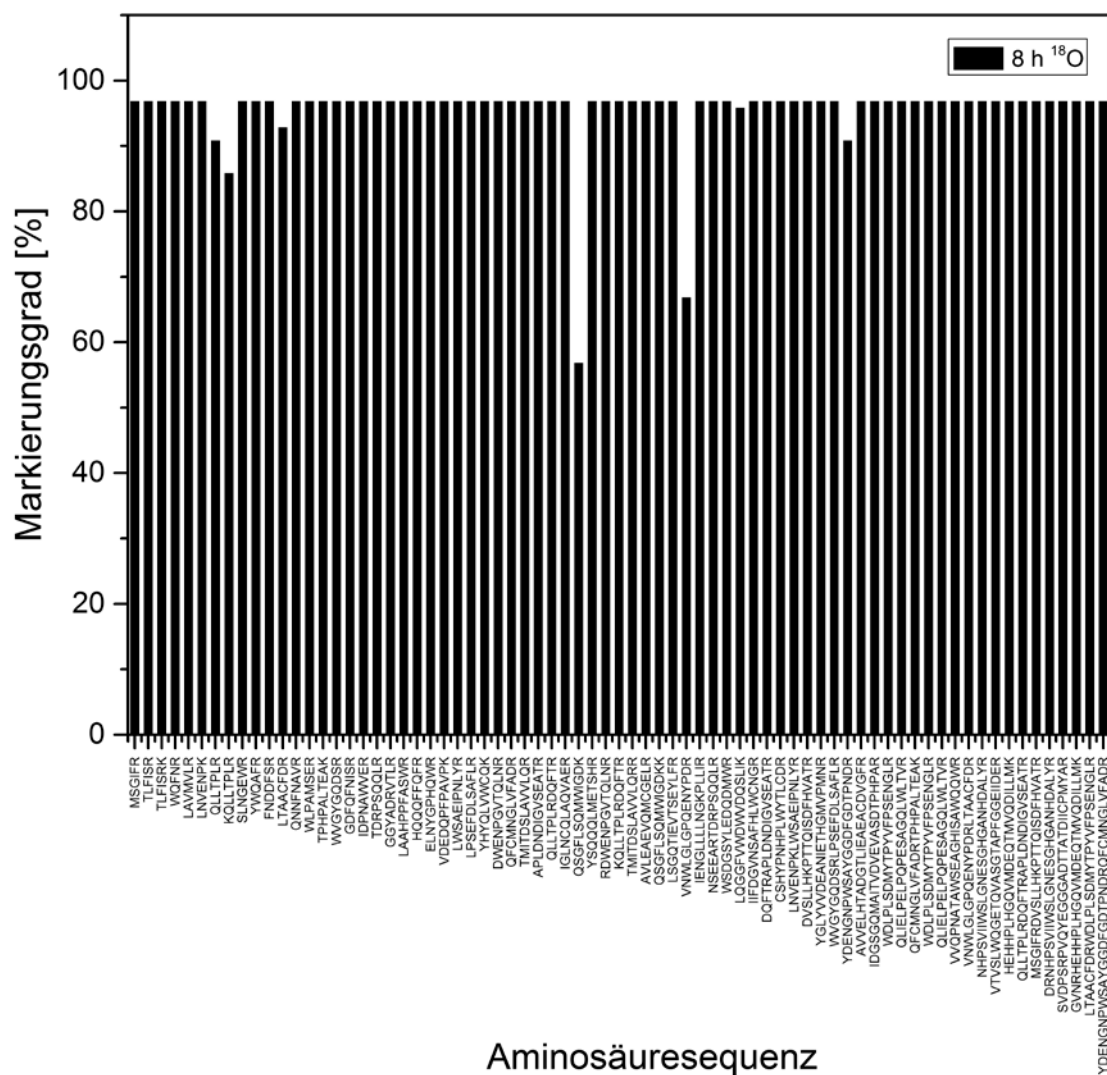


Abbildung A. 41: Enzymatische Markierung der C-Termini von tryptischen Peptiden aus β -Galactosidase mit ^{18}O bei pH 8 in ABC Puffer und bei pH 6 in CA Puffer.

Gezeigt ist der Markierungsgrad der verschiedenen Peptide mit 2-mal ^{18}O am C-Terminus. Die Auswertung wurde über das Isotopenmuster im Mascot Distiller durchgeführt.

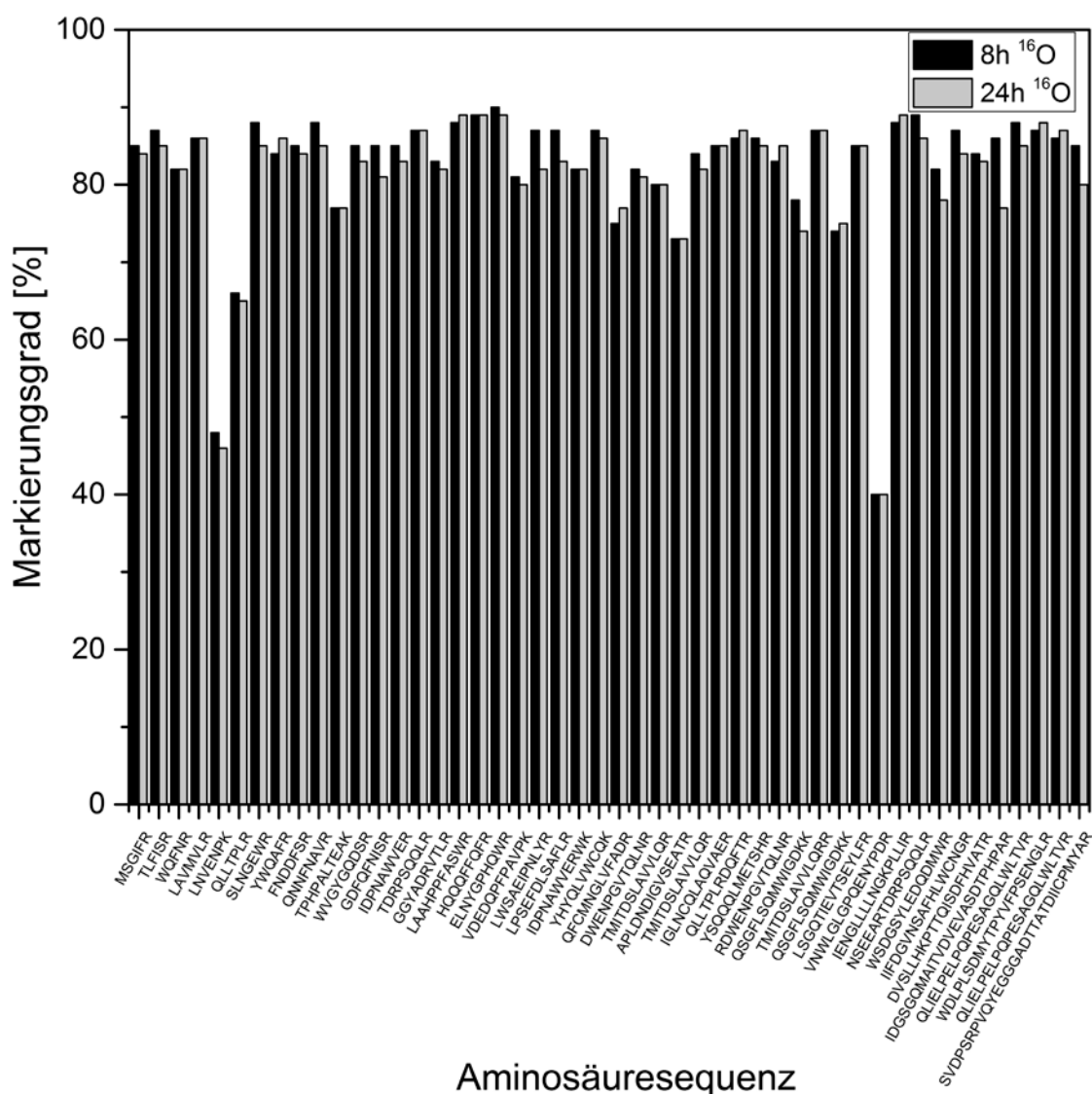


Abbildung A. 42: Enzymatische Markierung der C-Termini von tryptischen Peptiden aus β -Galactosidase mit ^{18}O bei pH 8 in ABC Puffer und danach bei pH 6 in CA Puffer.

Nach der Markierung wurde das restliche Trypsin durch die Zugabe von PeFabloc inaktiviert. Gezeigt ist der Markierungsgrad der verschiedenen Peptide mit 2-mal ^{18}O am C-Terminus. Die Auswertung wurde über das Isotopenmuster im Mascot Distiller durchgeführt.

8.2 Interaktionen von Proteinen mit niedermolekularen Verbindungen

8.2.1 Untersuchung des Gesamtproteins von INA6 Zellen nach der Behandlung mit Inhibitoren

8.2.1.1 Untersuchung des Gesamtproteins von INA6-Zellen nach der Behandlung mit AH390

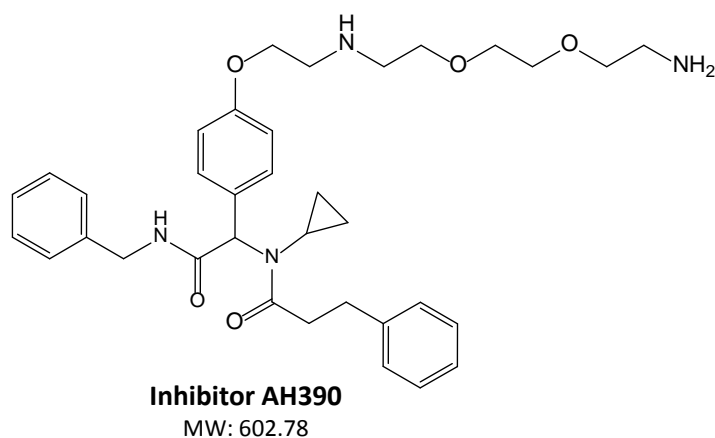


Abbildung A. 43: **Strukturformel des α -acyl Aminocarboxamides AH390.**

AH390 wurde auf INA6 Zellen gegeben, um den Effekt der Substanz auf Proteomebene zu untersuchen.

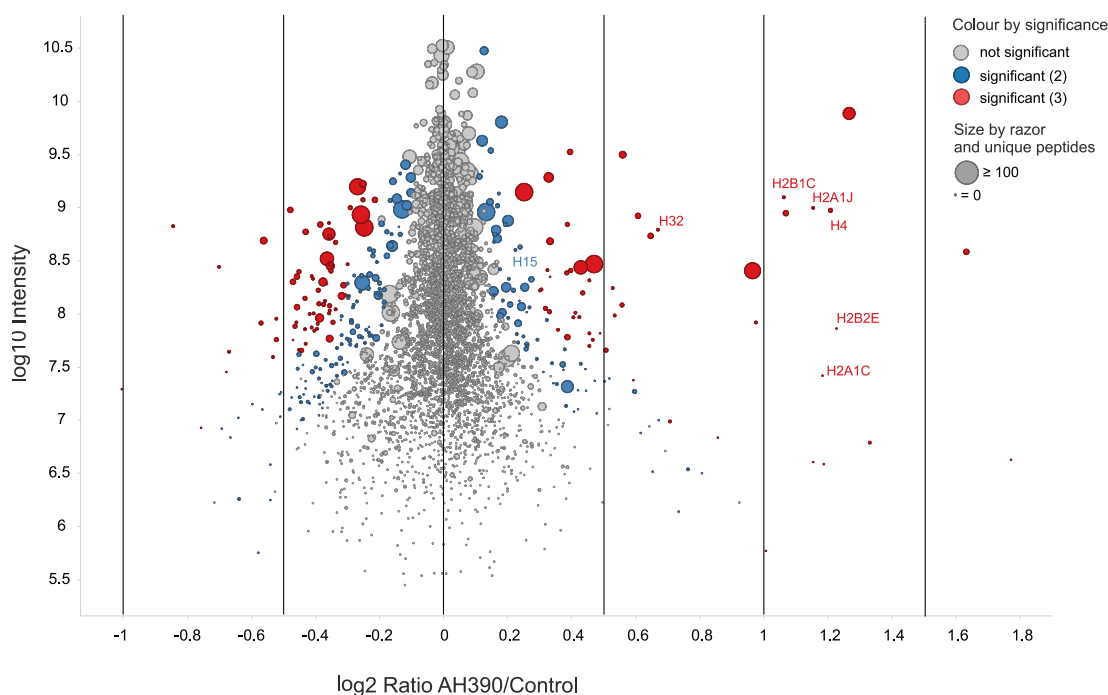


Abbildung A. 44: **Identifizierung von signifikant regulierten Proteinen, nach der Behandlung von INA6-Zellen mit der Substanz AH390.**

Schwer und leicht markierte INA6 Zellen wurden zuerst für 2h mit 25 μ M AH390 oder DMSO inkubiert, gewaschen, vereinigt und anschließend zusammen lysiert. 50 μ g der extrahierten Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit LC-MS/MS analysiert. Proteine, die im Vergleich zur Kontrolle signifikant zu- oder abgenommen haben, sind mit blau oder rot markiert. Proteinverhältnisse und -intensitäten sind Medianwerte von 3 biologischen Replikaten (n Replikate > 1). Die Größe der Kreise korreliert mit der Anzahl der identifizierten Peptide (razor and unique). Die Quantifizierung wurde mittels SILAC und Maxquant durchgeführt. Angereicherte Histone sind mit dem Uniprot Entryname markiert. Die Versuche wurden in Kooperation mit Dr. Daniela Brünner (AG Bargou) durchgeführt.

8.2.1.2 Untersuchung des Gesamtproteins von INA6-Zellen nach AUY922 Behandlung

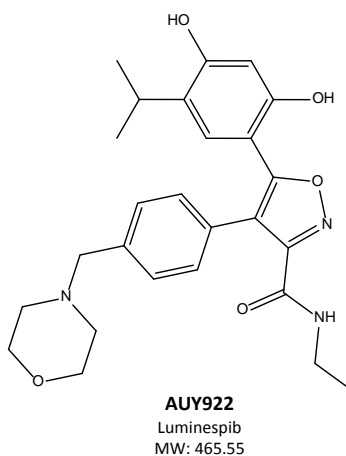


Abbildung A. 45: **Strukturformel des HSP90 Inhibitors AUY922 (Luminespib).**

AUY922 wurde auf INA6 Zellen gegeben, um den Effekt der Substanz auf Proteomebene zu untersuchen.

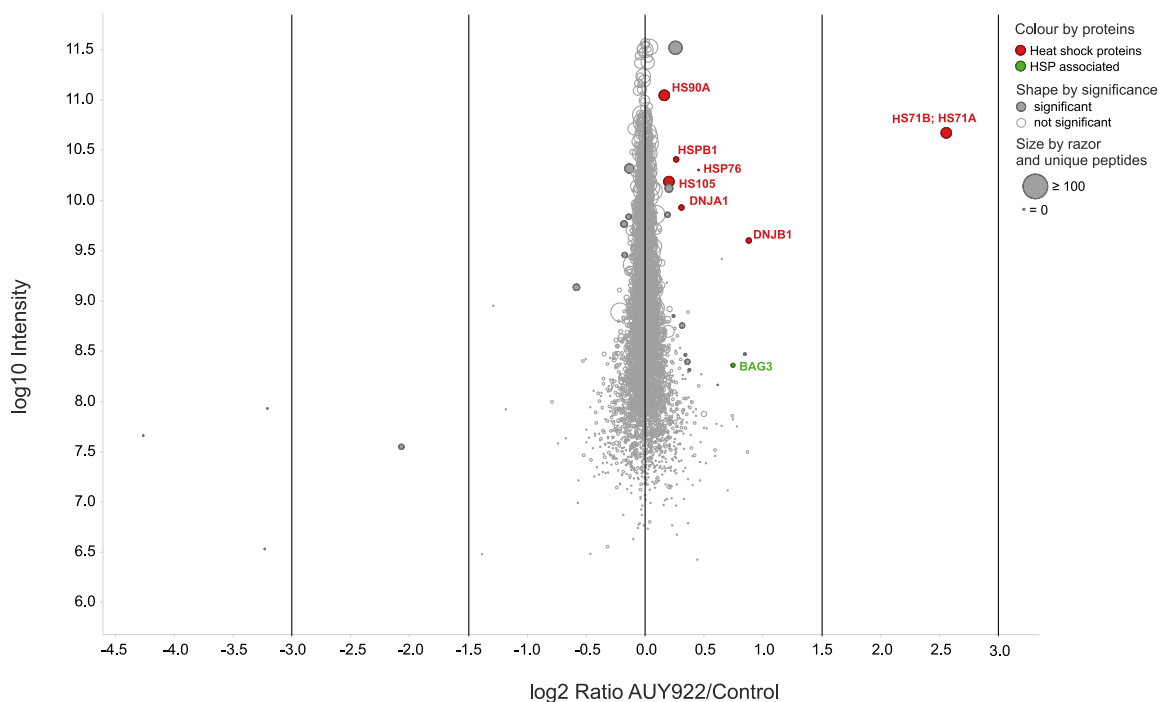
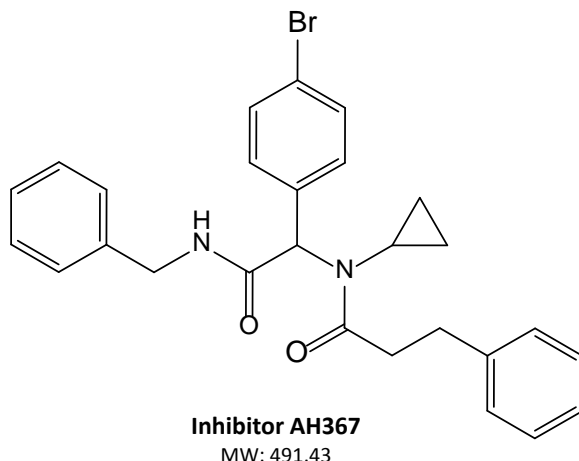


Abbildung A. 46: **Identifizierung von signifikant regulierten Proteinen, nach der Behandlung von INA6-Zellen mit der Substanz AUY922 (HSP90-Inhibitor).**

Schwer und leicht markierte INA6 Zellen wurden zuerst für 4h mit 10 nM AUY922 oder DMSO inkubiert, gewaschen, vereinigt und anschließend zusammen lysiert. 50 μg der extrahierten Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit LC-MS/MS analysiert. Proteine, die im Vergleich zur Kontrolle signifikant zu- oder abgenommen haben, sind als geschlossene Kreise markiert. Proteinverhältnisse und -intensitäten sind Medianwerte von 3 biologischen Replikaten (n Replikate > 1). Die Größe der Kreise korreliert mit der Anzahl der identifizierten Peptide (razor and unique). Proteine von demselben Komplex, der gleichen Familie oder derselben Funktion sind mit derselben Farbe markiert. Die Quantifizierung wurde mittels SILAC und Maxquant durchgeführt. Die Versuche wurden in Kooperation mit Dr. Daniela Brünnert (AG Bargou) durchgeführt.

8.2.1.3 Gesamtprotein von INA6-Zellen nach Behandlung mit AH367 und AUY922

Abbildung A. 47: Strukturformel des α -acyl Aminocarboxamids AH367.

INA6 Zellen wurden mit Substanz AH367 vorbehandelt und anschließend mit AUY922 versehen. Anschließend wurde der Effekt auf Proteomebene untersucht.

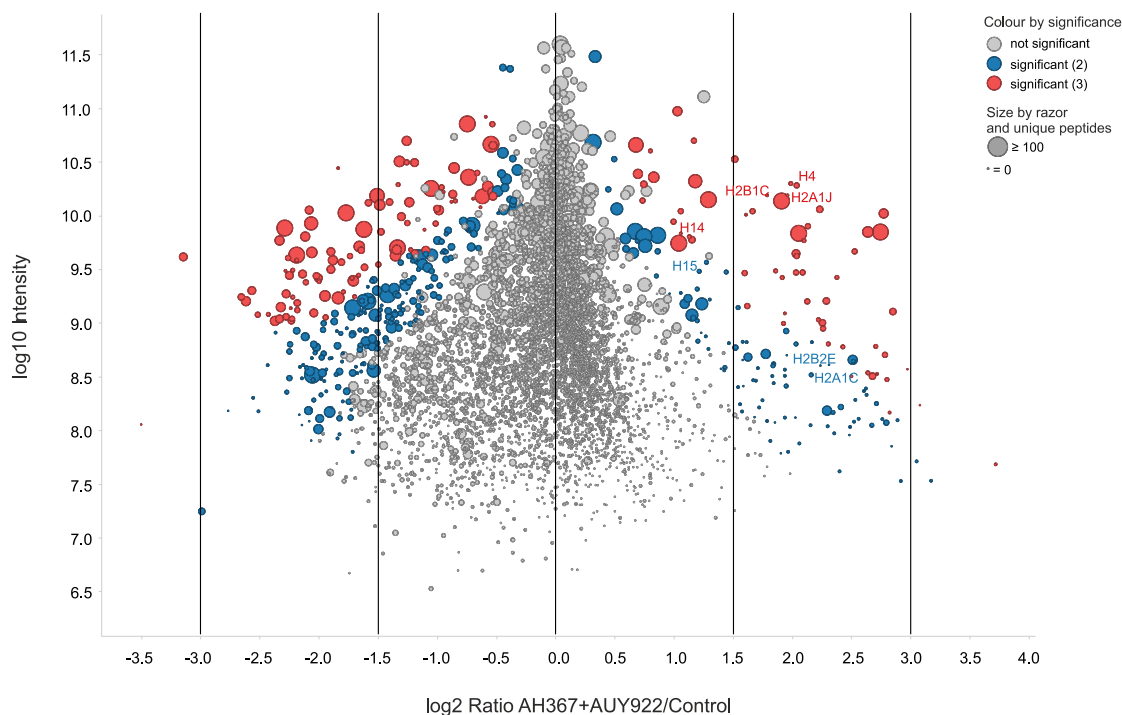
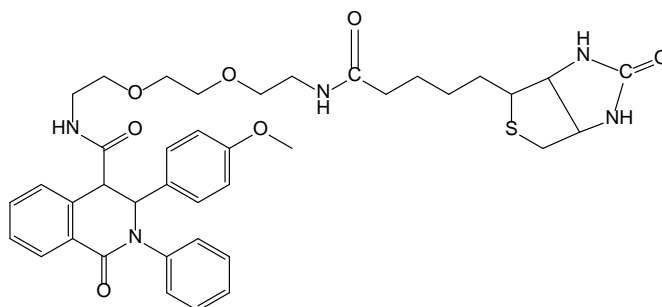


Abbildung A. 48: Identifizierung von signifikant regulierten Proteinen, nach der Behandlung von INA6-Zellen mit der Substanz AH367 und AUY922 (HSP90-Inhibitor).

Schwer und leicht markierte INA6 Zellen wurden zuerst für 3h mit 50 μ M AH367 oder DMSO inkubiert gefolgt von einer Behandlung mit 10 nM AUY922 für 3h. Anschließend wurden die Zellen gewaschen, vereinigt und zusammen lysiert. 50 μ g der extrahierten Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit LC-MS/MS analysiert. Proteine, die im Vergleich zur Kontrolle signifikant zu- oder abgenommen haben, sind mit blau oder rot markiert. Proteinverhältnisse und -intensitäten sind Medianwerte von 3 biologischen Replikaten (n Replikate > 1). Die Größe der Kreise korreliert mit der Anzahl der identifizierten Peptide (razor and unique). Die Quantifizierung wurde mittels SILAC und Maxquant durchgeführt. Angereicherte Histone sind mit dem Uniprot Entryname markiert. Die Versuche wurden in Kooperation mit Dr. Daniela Brünnert (AG Bargou) durchgeführt.

8.2.2 Anreicherung von Proteinen mit dem potentiellen HSP70 Inhibitor AH487



Biotinylierter potentieller HSP70 Inhibitor AH487

MW: 729.32

Abbildung A. 49: **Strukturformel des biotinylierten potentiellen HSP70 Inhibitors AH487.**

Substanz AH487 wurde von Dr. Anna Lehmann (AG Holzgrabe) synthetisiert und an magnetische Streptavidinbeads immobilisiert. Potentielle Zielproteine wurden damit aus einem INA6 Zelllysats angereichert werden.

8.2.2.1 Anreicherung von Proteinen mit Substanz AH487

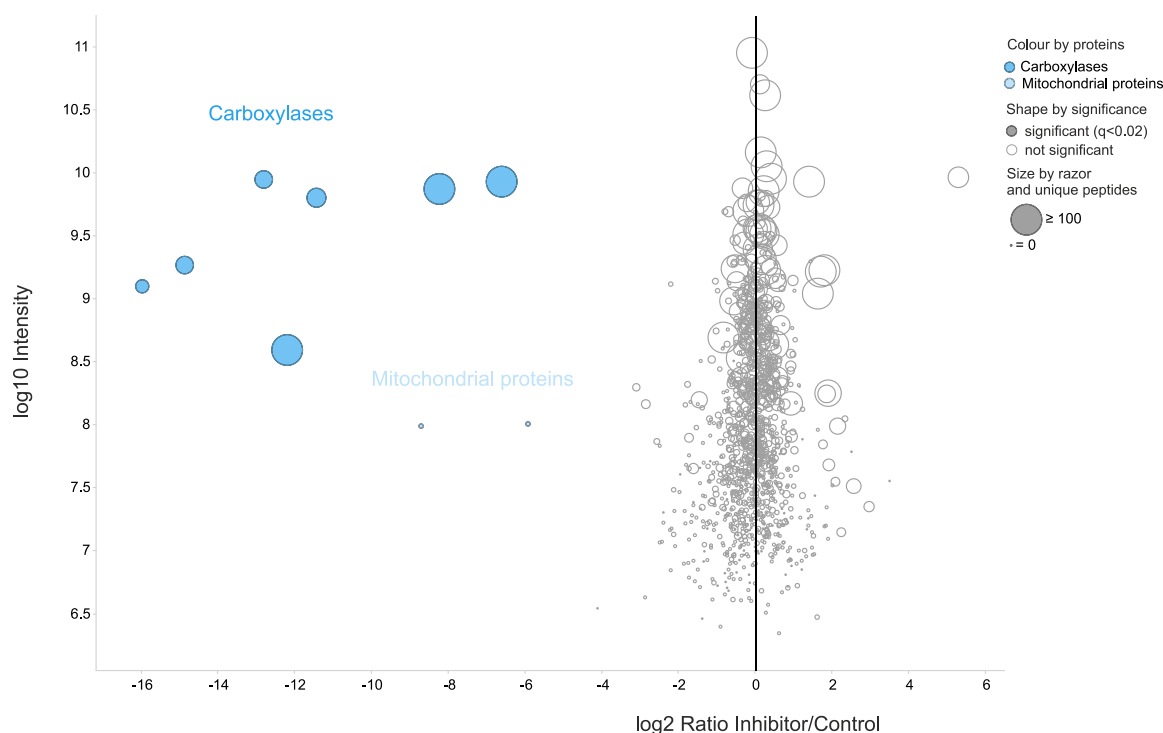
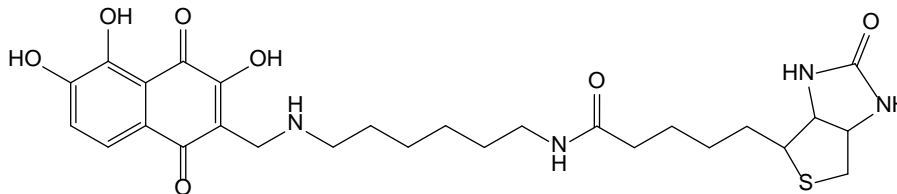


Abbildung A. 50: **Identifizierung von potentiellen Zielproteinen, die mit Substanz AH487 aus einem INA6 Zelllysats angereichert wurden.**

Proteine, die im Vergleich zur Kontrolle signifikant (Benjamini-Hochberg adjusted limma p-value < 0.02) angereichert wurden, sind als geschlossene Kreise markiert. Proteinverhältnisse und -intensitäten sind Medianwerte von 3 biologischen Replikaten (n Replikate > 1). Die Größe der Kreise korreliert mit der Anzahl der identifizierten Peptide (razor and unique). Proteine von demselben Komplex, der gleichen Familie oder derselben Funktion sind mit derselben Farbe markiert. Mit der Beadkontrolle wurden speziell Carboxylasen angereichert, da diese Biotin als prosthetische Gruppe enthalten.

8.2.3 Anreicherung von Proteinen mit Dioncochinon B

8.2.3.1 Anreicherung von Proteinen mit Substanz BG136



Biotinyliertes Dioncochinon B

MW: 560.67

Abbildung A. 51: Strukturformel des biotinylierten Dioncochinon B.

Substanz BG136 wurde von Christina Froschgeiser (AG Bringmann) synthetisiert und an magnetische Streptavidinbeads immobilisiert. Potentielle Zielproteine wurden damit aus einem INA6 Zellysat angereichert werden.

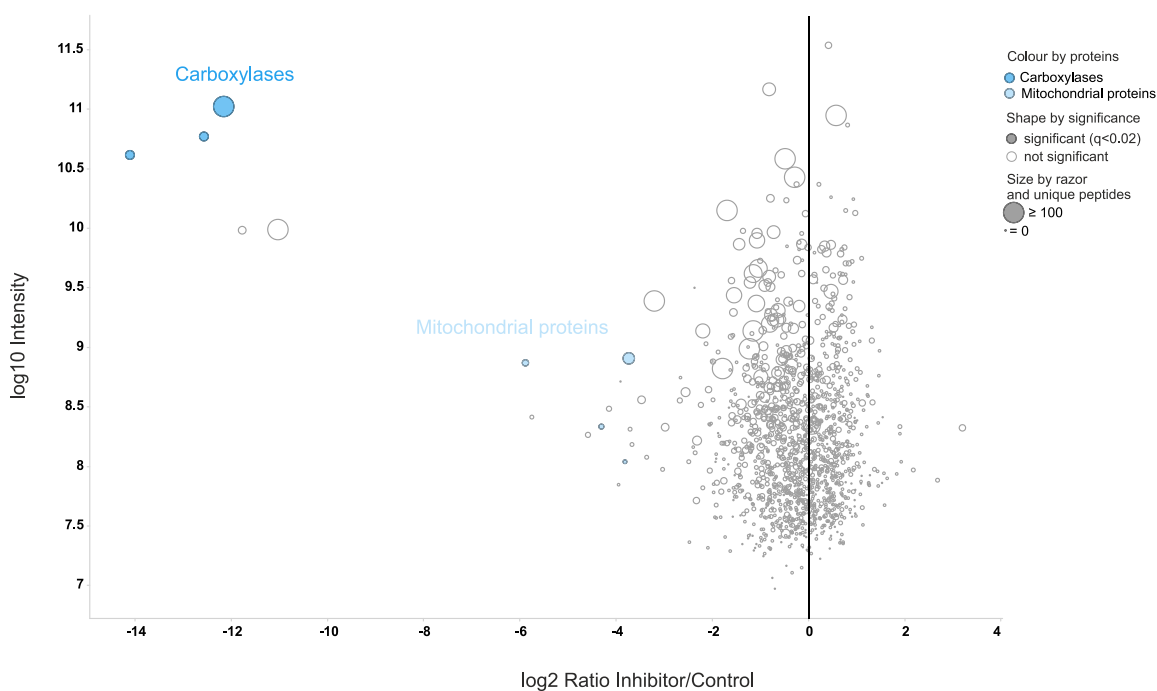


Abbildung A. 52: Identifizierung von potentiellen Zielproteinen, die mit Substanz BG136 aus einem INA6 Zellysat angereichert wurden.

Proteine, die im Vergleich zur Kontrolle signifikant (Benjamini-Hochberg adjusted limma p-value < 0.02) angereichert wurden, sind als geschlossene Kreise markiert. Proteinverhältnisse und -intensitäten sind Medianwerte von 3 biologischen Replikaten (n Replikate > 1). Die Größe der Kreise korreliert mit der Anzahl der identifizierten Peptide (razor and unique). Proteine von demselben Komplex, der gleichen Familie oder derselben Funktion sind mit derselben Farbe markiert. Mit der Beadkontrolle wurden speziell Carboxylasen angereichert, da diese Biotin als prosthetische Gruppe enthalten.

8.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Anordnung der Bauteile eines Massenspektrometers und ein Massenspektrum.	19
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Ionisierung einer Analytprobe während der Elektrosprayionisierung im Positiv-Ionen-Modus.	21
Abbildung 3: Schematische Darstellung der Matrix-unterstützten Laser-Desorption/Ionisation.	22
Abbildung 4: Schematische Darstellung eines Quadrupol Massenanalysators.	25
Abbildung 5: Schematischer Aufbau eines Ionenfallenmassenspektrometers.	26
Abbildung 6: Schematischer Aufbau eines Orbitrap Massenanalysators.	27
Abbildung 7: Schematischer Aufbau der Orbitrap Velos Pro (A) und der Orbitrap Fusion (B).	28
Abbildung 8: Schematische Darstellung des Bottom-up Proteomics Arbeitsablaufes, der für die Messungen von Peptiden mittel LC-MS/MS verwendet wird.	30
Abbildung 9: Reaktionsschema der Reduktion und Alkylierung von Disulfidbrücken wie sie in Cysteinseitenketten vorkommen.	31
Abbildung 10: Schematische Darstellung eines (A) In-Lösungs- und eines (B) In-Gel-Verdaus.	33
Abbildung 11: Experimentelle Anordnung eines LC-MS Experiments.	34
Abbildung 12: Schematische Darstellung der Peptidfragmente nach der Nomenklatur von Biemann.	36
Abbildung 13: Schematische Darstellung der y-Ionen des Peptids YLHMPA in einem Fragmentationenspektrum.	36
Abbildung 14: Identifizierung von Peptiden mittels Datenbanksuche der MS/MS-Spektren.	37
Abbildung 15: Schematische Darstellung verschiedener Markierungsstrategien, die für die relative Quantifizierung von Proteinen und Peptiden mit Massenspektrometrie verwendet werden.	40

Abbildung 16 Schematische Darstellung eines markierungsfreien bottom-up workflows.....	41
Abbildung 17: Reaktionsschema der proteolytischen ¹⁸ O-Markierung von Peptiden am C-Terminus.	43
Abbildung 18: Strukturformel der Aminosäuren Lysin und Arginin, die für das metabolische Labeling mit schweren Isotopen markiert wurden (A). Exemplarische Massenverschiebung eines Peptids, die durch SILAC erzeugt wurde (B).	44
Abbildung 19: Schematische Darstellung einer Co-Immunpräzipitation.	46
Abbildung 20: Schematische Darstellung von verschiedenen Crosslinkern, die zum Quervernetzen von Proteinen verwendet werden können.....	48
Abbildung 21: Reaktionsschema verschiedener funktioneller Gruppen, die zum Quervernetzen von Proteinen verwendet werden.....	50
Abbildung 22: Schematische Darstellung eines Co-IP-XL-MS Experiments.....	52
Abbildung 23: Schematisches MS ² -Spektrum von zwei quervernetzten Peptiden.	53
Abbildung 24: Wirkungsmechanismus und Identifizierung von Zielproteinen mit Hilfe der chemischen Genetik.	55
Abbildung 25: Quantitativer Chemical Proteomics Workflow zur Bestimmung der Interaktionen von niedermolekularen Substanzen mit Proteinen.	57
Abbildung 26: Identifizierung von <i>Drug Targets</i> mittels Thermal shift assay.	58
Abbildung 27: Konzentrationsreihe, die mit Bovinem Serum Albumin (BSA) erstellt wurde und die zugehörige Standardkurve.	74
Abbildung 28: Schematische Darstellung des Aufbaus der Transfereinheit, die für den Tankblot verwendet wurde.....	76
Abbildung 29: Reaktionsschema der Synthese von Disuccinimidylsulfoxid.	78
Abbildung 30: Topology Mapping des Mediator Komplexes mit Hilfe von chemischen Quervernetzungen.....	92
Abbildung 31: Strukturformel von Bis(sulfosuccinimidyl)suberat (BS3).	93
Abbildung 32: Schematische Darstellung der Interaktionen von NPL4 und UFD1...	95

Abbildung 33: Coomassie Gel der quervernetzten Proteine UFD1 und NPL4.	96
Abbildung 34: Ansicht des MS²-Spektrums der Peptide ITATKR und LTNKNSDR, die in Tabelle 8 mit der Nr. 4 aufgelistet sind.	98
Abbildung 35: Schematische Darstellung aller Quervernetzungen der beiden Proteine UFD1 und NPL4.	102
Abbildung 36: Struktur des Mediator Komplexes in Hefe mit den 4 Modulen und den einzelnen Untereinheiten.	104
Abbildung 37: Proteine, die mittels anti-HA Co-Immunpräzipitation aus einem Med17HA-Hefelysat angereichert wurden.	106
Abbildung 38: Schematische Darstellung aller Quervernetzungen, die in Kombination mit einer Med17HA-IP detektiert wurden (A) und der Vergleich mit Literaturdaten (B; (Robinson et al., 2015)).	109
Abbildung 39: Ansicht des MS²-Spektrums der Peptide KQLGYGK und FKDLQWLEFAR, die in Tabelle 9 mit der Nr. 1 aufgelistet sind.	110
Abbildung 40: Strukturformel und Fragmentierungsverhalten von Disuccinimidylsulfoxid (DSSO), das für das Quervernetzen von Proteinen verwendet wurde.	113
Abbildung 41: Exemplarischer Vergleich der Suchoptionen in einer Standardsuche und der Suche von quervernetzten Peptiden.	114
Abbildung 42: Fragmentierungsvarianten von Disuccinimidylsulfoxid bei niedriger Kollisionsenergie.	115
Abbildung 43: MSⁿ-Analyse von zwei Peptiden aus Cytochrom C, die mit DSSO quervernetzt wurden.	117
Abbildung 44: Strukturmodell der Interaktion von p97N und UBX.	118
Abbildung 45: Quervernetzung der beiden Proteine UBX und p97N.	119
Abbildung 46: Aminosäuresequenzen der Subdomänen UBX und p97N.	121
Abbildung 47: Exemplarischer Vergleich der Intensität aus extrahierten Ionenchromatogrammen von einem Peptid und einem XL-Peptid in einer Probe.	125

Abbildung 48: Schematische Darstellung der Strategie, um quervernetzte Peptide mit einer spezifischen Massenverschiebung zu suchen.	126
Abbildung 49: Schematische Darstellung der Verschiebung der Masse des Peptides MSGIFR durch den Einbau von zwei schweren Sauerstoffatomen am C-Terminus.	127
Abbildung 50: Enzymatische Markierung der C-Termini von tryptischen Peptiden aus β -Galactosidase mit ^{18}O	128
Abbildung 51: Enzymatische Markierung der C-Termini von tryptischen Peptiden aus β -Galactosidase mit ^{18}O bei pH 8 in ABC Puffer und bei pH 6 in CA Puffer. ...	129
Abbildung 52: Enzymatische Markierung der C-Termini von tryptischen Peptiden aus β -Galactosidase mit ^{18}O bei pH 8 in ABC Puffer und pH 6 in CA-Puffer mit abschließender Inhibition durch Pefabloc.	130
Abbildung 53: Schematische Darstellung der Auftrennung von Proteinen und quervernetzten Proteinen im Gel und daraus resultierende Intensitätsprofile.	134
Abbildung 54: Western Blot Analyse von Med2-HA, das zuvor mit magnetischen anti-HA Beads aus einem Hefe Zellysat angereichert wurde.	135
Abbildung 55: Intensitätsprofile der verschiedenen Untereinheiten des Mediator Komplexes.	138
Abbildung 56: Intensitätsprofil des Head-Moduls des Mediator Komplexes.	139
Abbildung 57: Schematische Darstellung des Workflows zur Anreicherung von Zielproteinen mittels Affinitätsaufreinigung.	141
Abbildung 58: Strukturformel des biotinylierten Linkers (AH441), der auf magnetischen Beads immobilisiert und als Linkerkontrolle verwendet wurde.	142
Abbildung 59 Identifizierung von Proteinen, die mit der Linkerkontrolle oder der Beadkontrolle aus einem INA6 Zellysat angereichert wurden.	143
Abbildung 60: Die Hitzeschockantwort und potentielle Inhibitoren dafür.	144
Abbildung 61: Strukturformeln verschiedener α -acyl Aminocarboxamide.	145
Abbildung 62: HSP72-Gehalte von INA6-Zellen, die mit verschiedenen α -acyl Aminocarboxamiden behandelt wurden.	147

Abbildung 63: Proteine, die mit AH436-beladenen Streptavidinbeads und der Beadkontrolle aus einem INA6 Zellysat angereichert wurden.....	148
Abbildung 64: Identifizierung von potentiellen Zielproteinen, die mit Substanz AH436 aus einem INA6 Zellysat angereichert wurden.....	150
Abbildung 65: Identifizierung von potentiellen Zielproteinen, die mit Substanz AH495 aus einem INA6 Zellysat angereichert wurden.....	152
Abbildung 66: Vergleich der Proteine, die mit Substanz AH436 und AH495 aus INA6 Zellysat angereichert wurden.	153
Abbildung 67: Potentieller Wirkungsmechanismus der α -acyl Aminocarboxamide basierend auf den massenspektrometrischen Daten aus Abbildung 64.....	154
Abbildung 68: Überprüfung der Anreicherung der PIKKs mit Substanz AH436 mittels Western Blot.	155
Abbildung 69: Schematische Darstellung der Funktionsweise des DNA-PK Kinase Enzyme System.....	156
Abbildung 70: Strukturformeln des α -acyl Aminocarboxamids AH390 und der beiden DNA-PK-Inhibitoren NU7026 und NU7441.....	157
Abbildung 71: Kinaseaktivität der DNA-PK bei Konzentrationsreihen von Substanz AH390 und den beiden DNA-PK-Inhibitor NU7026 und NU7441.....	158
Abbildung 72: Anreicherung von Proteinen mittels anti-DNA-PK Co-Immunpräzipitation aus einem INA6 Zellysat.....	159
Abbildung 73: Strukturformeln der Naphtylisochinoline BG135 und BG138.....	161
Abbildung 74: Identifizierung von potentiellen Zielproteinen, die mit Substanz BG135 aus einem INA6 Zellysat angereichert wurden.	162
Abbildung 75: Identifizierung von potentiellen Zielproteinen, die mit Substanz BG138 aus einem INA6 Zellysat angereichert wurden.	163

8.4 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Auflistung der möglichen Peptidmodifikationen, die bei einer Quervernetzungsreaktion entstehen können.....	51
Tabelle 2: Auflistung aller Chemikalien mit Hersteller	61
Tabelle 3: Auflistung aller Puffer, Kits und Lösungen und deren Zusammensetzung/Hersteller	65
Tabelle 4: Auflistung aller Geräte, Utensilien und Verbrauchsmaterialien und deren Hersteller	66
Tabelle 5: Liste der Programme mit Hersteller, die in dieser Arbeit verwendet wurden.	71
Tabelle 6: Verwendeter Scanzzyklus, der für die Detektion von quervernetzten Peptiden mit DSSO verwendet wurde.....	81
Tabelle 7: Liste der verwendeten festen und variablen Modifikationen mit Masse und elementarer Zusammensetzung.	82
Tabelle 8: Liste der Peptide von NPL4 und UFD1, die mit BS3 verlinkt wurden.....	99
Tabelle 9: Liste der Peptide des Mediator Komplexes, die mit BS3 verlinkt wurden.	107
Tabelle 10: Liste der Peptide von UBX und p97N, die mit DSSO modifiziert und mit Elastase verdaut wurden.	122
Tabelle 11: Liste der Peptide aus allen drei Markierungsversuchen, die einen Markierungsgrad unter 70 % aufweisen.....	132

8.5 Publikationen

Publikationen

- 04/2017 Bach, M.* , Lehmann, A.* , Brünnert, D.* , Vanselow, J.T., Hartung, A., Bargou, R.C., Holzgrabe, U., Schlosser, A., and Chatterjee, M. (2017). **Ugi reaction-derived alpha-acyl aminocarboxamides bind to phosphatidylinositol 3-kinase-related kinases, inhibit HSF1-dependent heat shock response, and induce apoptosis in multiple myeloma cells.** J Med Chem.
- 10/2011 Peer, M.* , Bach, M.* , Mueller, M.J., and Waller, F. (2011). **Free sphingobases induce RBOHD-dependent reactive oxygen species production in Arabidopsis leaves.** Febs Lett 585, 3006-3010.

Präsentationen auf Konferenzen

- 09/2016 Bach, M., Hofmann, A., Brünnert, D., Vanselow, J.T., Holzgrabe, U., Chatterjee M., and Schlosser, A. (2016). **Drug Target Identification in Multiple Myeloma by Chemical Proteomics.** Posterpräsentation auf der HUPO 2016 (18-22 September, Taipei, Taiwan)
- 03/2015 Bach, M., Uthe, H., Vanselow, J.T., Schlosser, A. (2015). **Pinpointing Protein-Protein Interactions of the Yeast Mediator Complex by Glutaraldehyd Cross-linking and GeLCMS.** Posterpräsentation auf dem Proteomic Forum 2015 (22-25 März, Berlin, Deutschland)
- 03/2014 Bach, M., Schlosser, A. (2014). **Cleavage Efficiency of Endoproteinase GluC Nearby to Phosphorylation Sites.** Posterpräsentation auf der DGMS 2014 (02-05 März, Frankfurt am Main, Deutschland)

