

**Quantitative Proteomanalyse der Bindeproteine  
von Histon H3  
und dem  
Four-and-a-Half-LIM 3 (FHL3) Protein**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des  
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie  
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Dipl.-Chem. Rebecca Klingberg  
aus Berlin

2012



Diese Arbeit wurde in der Zeit von Oktober 2007 bis Februar 2012 am Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie (FMP) in Berlin-Buch unter der Anleitung von Prof. Dr. Dirk Schwarzer angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Dirk Schwarzer
2. Gutachter: Prof. Dr. Christian Hackenberger

Disputationstermin: 17.04.2012



### **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst habe und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Rebecca Klingberg



*Für meine kleine Familie.*



# Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich zunächst bei Prof. Dr. Dirk Schwarzer für den interdisziplinären Charakter und die interessante Themenstellung dieser Dissertation sowie ausdrücklich für die gute Betreuung und Unterstützung bedanken.

Herrn Prof. Dr. Christian Hackenberger möchte ich für Bereitschaft danken, das Zweitgutachten zu übernehmen.

Bei meinen lieben Gruppenkollegen Jan-Oliver Jost, Alexander Dose, Dr. Oliver Krätke, Bernhard Geltinger und Till Teschke möchte ich mich vor allem für das sehr angenehme Arbeitsklima bedanken. Zusätzlich möchte ich Jan-Oliver Jost für die stetige Bereitschaft bedanken, sich anfälligen technischen Problemen anzunehmen und stets ein treibender Faktor beim *sozializing* innerhalb der Gruppe zu sein. Außerdem möchte ich mich bei Jan-Oliver Jost und Herrn Alexander Dose für das kritische Durchlesen meiner Dissertation bedanken.

Mein ausdrücklicher Dank geht außerdem an Herrn Dr. Eberhard Krause für die Kooperation bei MS-basierten Fragestellungen und an die Mitglieder seiner Gruppe Massenspektroskopie am FMP. Spezieller Dank gilt hierbei Herrn Dr. Michael Schümann für die regen Bemühung bei der Messung meiner SILAC-Proben, Frau Heike Stephanowitz für die Identifikation einzelner Proteine per MALDI-Messung und Frau Diana Lang für das Erläutern des Auswertungsprinzips für SILAC-Datensätze.

Herrn Prof. Dr. Christian Freund danke ich für die Möglichkeit, im Zellkulturlabor arbeiten zu dürfen. Zusätzlich danke ich Herrn Roland Lehmann aus der Arbeitsgruppe Freund dafür, dass er mich in die Prinzipien der Zellkultivierung eingeführt hat.

Der AG Beyermann möchte ich für die Klärung bestimmter Fragen, in Bezug auf die Peptidsynthese und die stetige Möglichkeit LC-MS-Messungen durchführen zu lassen, danken.

Mein Dank geht außerdem an Herrn Prof. M. S. Cosgrove für das WDR5-Plasmid und an Herrn Prof. B. Bukau für die Bereitstellung der HSC70-, APG2- und ULP1-Plasmide.

Ferner möchte ich Herrn Dr. W. Fischle für die HeLa-S3-Zellkernextrakte danken.

Ein zusätzlicher Dank geht an meinen ehemaligen Praktikanten Herrn Jonas Hanske für seinen Einsatz bei der Klonierung und Expression verschiedener Phosphatasen.

Ein ganz besonderer Dank geht an meinen lieben Robert, der mir nicht nur während der gesamten Bearbeitungszeit dieser Dissertation eine große und rücksichtsvolle Stütze war und ist.



# Zusammenfassung

Die Aufklärung spezifischer Protein-Protein-Interaktionen ist eine Grundvoraussetzung für das Verständnis vieler zellulärer Vorgänge. Durch massenspektrometrische Proteomanalysen wurde eine Vielzahl von posttranslationalen Proteinmodifikationen, wie beispielsweise Phosphorylierungen, entdeckt, die Protein-Protein-Interaktionen regulieren können. Diese regulatorischen Proteinmodifikationen erschweren die Analyse der Protein-Protein-Interaktionen weiterhin, da sie in manchen Fällen Interaktionen erst ermöglichen, in anderen Fällen diese jedoch unterdrücken.

Ziel dieser Arbeit war es, mit den Mitteln der Chemischen Biologie und massenspektrometrischer Proteomanalysen die Protein-Protein-Wechselwirkungen von Histon H3 in Abhängigkeit von Phosphorylierung zu untersuchen sowie die Bindungspartner des Adapterproteins *Four-and-a-Half-LIM 3* (FHL3) zu identifizieren.

Das erste Projekt dieser Arbeit widmete sich den phosphorylierungs-abhängigen Interaktionsproteinen von Histon H3. Histone verpacken DNA in Form von Chromatin und können Genregulation über posttranslationale Modifikationen steuern. Die Phosphorylierung von Serin-10 in Histon H3 ist eine dieser Modifikationen. In diesem Projekt sollten Proteine identifiziert werden, die vermittelt durch diese Modifikation an Histon H3 binden. Des Weiteren war geplant Bindeprotein von H3 zu identifizieren, die durch die Serin-10-Phosphorylierung von Histone H3 unterdrückt werden sowie die zugehörigen Phosphatasen, die diese Modifikation entfernen. Dazu wurde Phosphonomethylenalanin (Pma), ein Mimetikum von Phosphoserin, das nicht durch Phosphatasen gespalten werden kann, an Position 10 in ein Peptid inkorporiert, das vom N-Terminus von H3 abgeleitet wurde. Nach Funktionsüberprüfung dieses Pma-modifizierten Peptids wurde eine Proteomanalyse basierend auf der SILAC-Methode (Stable isotope labeling by amino acids in cell culture) durchgeführt. Durch diese Analyse wurden diverse 14-3-3-Isoformen als Bindeproteine von Serin-10-phosphorylierten Histon H3 identifiziert. Phosphatasen konnten hingegen nicht gefunden werden. Differenzielle SILAC-Analysen mit H3-Peptiden synthetisiert aus L- oder D-Aminosäuren erlaubten weiterhin die Identifikation vieler Proteine, die spezifisch an unmodifiziertes H3 binden. Darunter waren Komponenten eines Deacetylase-Komplexes (NuRD), Hitzeschockproteine (HSC70, APG2), transkriptionellen Aktivatoren (WDR5, MYST2) und Repressoren (EHMT2, KDM5B). Mit HAT1 und RBBP7 wurden ferner zwei Bindeproteine vom unmodifizierten H3 identifiziert, deren Bindung durch die Phosphorylierung von Serin-10 unterdrückt wurde. In nachfolgenden Validierungsexperimenten konnten diese

Beobachtungen bestätigt werden. Für ausgewählte Proteine wurde des Weiteren die Beeinflussung des Bindungsvermögens in Abhängigkeit von allen bekannten Phosphorylierungen in H3-Tail untersucht.

In einem zweiten Projekt wurde das *Four-and-a-Half-LIM 3* (FHL3) Protein einer quantitativen SILAC-Proteomanalyse unterzogen, mit dem Ziel, die bislang noch größtenteils unbekannt Interaktionspartner dieses Adapterproteins zu identifizieren und eine vermutete Interaktion mit Chromatinkomponenten experimentell zu überprüfen. Zunächst konnte gezeigt werden, dass FHL3 sowohl im Zellkern als auch im Cytosol, der für die Proteomanalyse verwendeten Fibroblastenzelllinie (Swiss 3T3) lokalisiert ist. Die nachfolgenden Proteomanalysen erlaubten die reproduzierbare Identifikation von 484 FHL3-Bindeproteinen in Zellkernextrakten und 244 in den cytosolischen Fraktionen dieser Zelllinie, wobei die meisten der identifizierten Protein bis jetzt nicht als Interaktionspartner von FHL3 beschrieben wurden. Eine direkte Interaktion mit Histonen konnte nicht beobachtet werden, wohl aber Proteine, die an Chromatinprozessierungen beteiligt sind. Ausgewählte FHL3-Interaktionspartner wurden durch Pull-Down Experimente und Western Blot Analyse bestätigt. Darunter befanden sich der transkriptionelle Coaktivator CBP, Schlüsselkomponenten der eukaryotischen DNA-Replikation (MCM3 und POLD1) und die mitotische Serin/Threonin-Kinase TLK1. Neben diesen kernlokalisierten Proteinen konnte die FHL3-Interaktion der Ubiquitin-Ligase DTX3L im nuklearen Extrakt und der cytosolischen Fraktion bestätigt werden sowie die FHL3-Bindung der cytosolischen Polyphosphoinositide-Phosphatase FIG4. Durch diese Proteomanalyse und die nachgeschalteten Validierungsexperimente konnte FHL3 mit einer Vielzahl essentieller sowie pathologischer zellulärer Prozesse in Verbindung gebracht werden.

# Abstract

The identification of specific protein-protein interactions is a basic requirement for a comprehensive understanding of many cellular processes. Mass spectrometric proteome analyses have uncovered a multitude of posttranslational protein modifications, such as protein phosphorylation, which regulate protein-protein interactions. These regulatory modifications add a new layer of complexity because they can either facilitate or block protein-protein interactions.

The aim of this thesis was the investigation of protein-protein interaction network of histone H3 and its modulation by protein phosphorylation as well as the identification of binding partners of the adapter protein Four-and-a-Half-Lim 3 (FHL3) by means of chemical biology and mass spectrometric proteomic analysis.

The first project of this thesis focused on the phosphorylation-dependent interaction proteins of histone H3. Histones package DNA in form of chromatin and control gene activity via posttranslational modifications. The phosphorylation of serine-10 is one of those modifications and in this project proteins should be identified that bind to histone H3 in response to this modification. Furthermore, it was planned to identify binding proteins of unmodified H3, which are suppressed by serine-10 phosphorylation and to find associated phosphatases which remove this modification. Therefore, phosphonomethylenalanin (Pma), a mimetic of phosphoserine that cannot be cleaved by phosphatases was incorporated at position 10 in a peptide derived from the N-terminus of H3. After testing the functionality of the Pma-modified peptide, a proteome analysis was performed based on the SILAC method (stable isotope labeling by amino acids in cell culture). The analysis uncovered various 14-3-3 isoforms as binding proteins of serin-10 phosphorylated histone H3. However, phosphatases could not be identified. Differential SILAC analyses with H3 peptides synthesized from L- or D-amino acids identified many proteins that specifically bind to unmodified H3. Among them are components of a deacetylase complex (NuRD), heat shock proteins (HSC70, APG2), transcriptional activators (WDR5, MYST2) and repressors (EHMT2, KDM5B). Furthermore with HAT1 and RBBP7 two binding proteins of the unmodified H3 were identified, whose binding activity was suppressed by the phosphorylation of serine-10. These observations were confirmed in subsequent validation experiments. In addition the modulation of binding capability of selected proteins was examined in dependency of all known phosphorylation sites in H3.

In the second project the Four-and-a-Half-LIM protein 3 was subjected to a quantitative proteome analysis with the aim to identify the interaction partners of this adapter protein and to verify a putative interaction with chromatin components. Initially, it has been demonstrated that FHL3 is localized in both the nucleus and the cytosol of Swiss 3T3 mouse fibroblasts used in this project. The following 484 FHL3 binding proteins were identified in nuclear extracts and 244 in the cytosolic fractions of this cell line. Most of these reproducibly identified proteins have not been described as interaction partner of FHL3. A direct interaction with histones could not be observed but several proteins involved in chromatin processing could be identified. Selected FHL3 interaction partners were confirmed by pull-down experiments and western blot analysis. These proteins include the transcriptional coactivator CBP, key components of the eukaryotic DNA replication (MCM3 and POLD1) and the mitotic serine/threonine kinase TLK1. Beside these nuclear localized proteins, an interaction between FHL3 and the ubiquitin ligase DTX3L could be confirmed in the nuclear and the cytosolic fraction of Swiss 3T3 cells as well as the interaction of FHL3 with the cytosolic polyphosphoinositide phosphatase FIG4. Based on this proteome analysis and the downstream validation experiments FHL3 could be connected to a variety of essential, as well as pathological cellular processes.





# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Chromatin, Histone und Histonmodifikationen</b> .....	<b>1</b>
<b>1.2</b>	<b>Die Histone H3-Tail-Phosphorylierung</b> .....	<b>6</b>
1.2.1	Phosphorylierung von Serin-10 in Histon H3 .....	6
1.2.1.1	H3S10-Phosphorylierung während der Mitose und Meiose .....	7
1.2.1.2	H3S10-Phosphorylierung während der Interphase .....	9
1.2.2	H3S10-spezifische Kinasen .....	10
1.2.3	H3S10-spezifische Phosphatasen .....	11
1.2.4	Weitere Phosphorylierungsstellen am H3-Tail.....	12
<b>1.3</b>	<b>Nichtspaltbare Mimetika von pSer, pThr und pTyr</b> .....	<b>14</b>
<b>1.4</b>	<b>FHL-(<i>Four-and-a-Half-LIM domain proteins</i>)</b> .....	<b>16</b>
1.4.1	Die FHL-Proteinfamilie .....	16
1.4.2	FHL3 ( <i>Four-and-a-Half-LIM domain protein 3</i> ).....	18
<b>1.5</b>	<b>Protein-Pull-Downs</b> .....	<b>19</b>
<b>1.6</b>	<b>Quantitative Proteomanalyse</b> .....	<b>21</b>
1.6.1	SILAC .....	22
1.6.2	SILAC-Pull-Down.....	23
<b>1.7</b>	<b>Aufgabenstellung</b> .....	<b>25</b>
1.7.1	Aufgabenstellung: Projekt 1 .....	25
1.7.2	Aufgabenstellung: Projekt 2 .....	25

<b>2</b>	<b>ERGEBNISSE UND DISKUSSION .....</b>	<b>27</b>
<b>2.1</b>	<b>Projekt 1.....</b>	<b>27</b>
2.1.1	Strategie (Teil 1):.....	27
2.1.1.1	Darstellung von Fmoc-L-Phosphonomethylenalanin (Fmoc-L-Pma) .....	27
2.1.1.2	Design, Synthese und Immobilisierung der H3-Tail-Peptide.....	32
2.1.1.3	Phosphatase-Aktivitätstests.....	36
2.1.1.4	Eignung von Pma als pS10-Mimetikum.....	40
2.1.2	Strategie (Teil 2).....	43
2.1.2.1	Charakterisierung nuklearer und cytosolischer Extrakte .....	43
2.1.2.2	SILAC-Pull-Down mit H3-Tail-Peptiden.....	45
2.1.3	Validierung Phosphorylierungs-abhängiger H3-Tail-Binder .....	59
2.1.3.1	H3tailpS10-spezifische Bindeproteine .....	60
2.1.3.2	H3tail-spezifische Bindeproteine .....	61
2.1.4	Validierung potentieller H3-Tail-Direktbinder .....	62
2.1.4.1	Klonierung und Expression von WDR5, HAT1, RBBP7, FHL3, HSC70 und APG2.....	63
2.1.4.2	Pull-Downs mit rekombinanten Proteinen .....	68
2.1.5	Validierung der Interaktion zwischen HAT1 und dem H3-Tail .....	69
<b>2.2</b>	<b>Projekt 2.....</b>	<b>75</b>
2.2.1	Strategie .....	75
2.2.1.1	Lokalisation von FHL3 in 3T3-Mäusefibroblasten .....	75
2.2.1.2	Klonierung und Immobilisierung von GST-FHL3 und GST .....	76
2.2.1.3	SILAC-Pull-Down mit FHL3 .....	78
2.2.2	Verifizierung ausgesuchter FHL3-Interaktionspartner.....	92
<b>3</b>	<b>MATERIAL .....</b>	<b>99</b>
<b>3.1</b>	<b>Chemikalien.....</b>	<b>99</b>
<b>3.2</b>	<b>Lösungen, Klonierungs-Enzyme und Kits .....</b>	<b>99</b>
<b>3.3</b>	<b>Antikörper.....</b>	<b>100</b>
<b>3.4</b>	<b>pET-Vektoren .....</b>	<b>101</b>
3.4.1	pET23b(+) .....	101
3.4.2	pET42b(+) .....	102
<b>3.5</b>	<b>Proteine und Enzyme .....</b>	<b>102</b>
<b>3.6</b>	<b>cDNA-Klone.....</b>	<b>103</b>
<b>3.7</b>	<b>Bakterienstämme.....</b>	<b>103</b>
3.7.1	<i>E. coli</i> XL1-blue .....	103

3.7.2	<i>E. coli</i> BL21(DE3)pLys und Rosetta (DE3)pLysS (Expressionsstämme) .....	103
<b>3.8</b>	<b>Geräte .....</b>	<b>104</b>
<b>3.9</b>	<b>Programme.....</b>	<b>106</b>
<b>4</b>	<b>METHODEN.....</b>	<b>107</b>
<b>4.1</b>	<b>Analytischer Service .....</b>	<b>107</b>
4.1.1	DNA-Sequenzierung .....	107
4.1.2	Bestimmung der Festphasenbeladung mit Peptiden .....	107
<b>4.2</b>	<b>Chemische Methoden.....</b>	<b>107</b>
4.2.1	Chromatographische Methoden .....	107
4.2.2	Allgemeine massenspektrometrische Methoden (ESI-TOF-MS) .....	108
4.2.3	SILAC-spezifische massenspektrometrische Methoden.....	108
4.2.3.1	MS-Probenpräparation .....	108
4.2.3.2	Nano-LC-ESI-Tandem-MS .....	108
4.2.3.3	MS-Datenverarbeitung und Quantifizierung .....	109
4.2.4	Kernmagnetische Resonanzspektroskopie (NMR) .....	109
4.2.5	Synthesen.....	109
4.2.5.1	Fmoc-L-Phosphonomethylenalanin-Synthese.....	109
4.2.5.2	Peptidsynthese .....	110
4.2.6	Herstellung kovalent gebundener H3-Tail-Peptide an Agarosematrix .....	112
<b>4.3</b>	<b>Molekularbiologische Methoden.....</b>	<b>112</b>
4.3.1	SDS-PAGE .....	112
4.3.2	Agarosegelelektrophorese .....	113
4.3.3	Immundetektion von Proteinen (Western Blotting).....	113
4.3.4	Allgemeines Arbeiten mit <i>E. coli</i> .....	114
4.3.5	Herstellung elektrokompetenter Zellen .....	114
4.3.6	Klonierung .....	114
4.3.7	Elektrotransformation .....	118
<b>4.4</b>	<b>Proteinbiochemische Methoden .....</b>	<b>118</b>
4.4.1	Proteinexpression.....	118
4.4.2	Aufreinigung von Proteinen .....	119
4.4.3	Abspaltung von GST & SUMO von Fusionsproteinen .....	120
4.4.4	Enzym-basierte Assays.....	121
4.4.4.1	Charakterisierung von PP1 $\alpha$ -Phosphatase .....	121
4.4.4.2	HAT1-Aktivitätstest .....	123
4.4.4.3	HAT1-Phosphorylierung durch CDK1-cyclin B-Kinase.....	123

<b>4.5</b>	<b>Protein-Pull-Downs</b> .....	<b>123</b>
4.5.1	Protein-Pull-Downs mit Peptiden.....	123
4.5.2	Protein-Pull-Downs mit GST-FHL3 .....	124
4.5.3	Pull-Downs rekombinanter Proteine mit Peptiden.....	125
<b>4.6</b>	<b>Zellbiologische Methoden</b> .....	<b>125</b>
4.6.1	Zellkultur .....	125
4.6.2	SILAC Zellkultur.....	126
4.6.3	Präparation von cytosolischen und nuklearen Zellextrakten.....	126
<b>5</b>	<b>AUSBLICK</b> .....	<b>129</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>133</b>
<b>7</b>	<b>ANHANG</b> .....	<b>145</b>
7.1	Abkürzungsverzeichnis .....	145
7.2	Aminosäurensymbole .....	148
7.3	Modifizierte Aminosäuren.....	149
7.4	Western Blots.....	150
7.5	MALDI-MS-Ergebnisse .....	150
7.6	Coomassiegele .....	151





# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Chromatin, Histone und Histonmodifikationen

Epigenetik ist das Gebiet, welches sich mit regulatorischen Mechanismen zellulärer Prozesse und ihren Auswirkungen befasst, die nicht durch den Genotyp einer Zelle codiert werden können. Ein sich stetig vertiefender Einblick in die Entschlüsselung epigenetischer Mechanismen bildet das Fundament bei der Entwicklung neuer Medikamente und adäquater Therapieformen im Bezug auf vielerlei Krankheitsbilder und stellt insbesondere bei der Bekämpfung von Tumorerkrankungen einen großen Nutzen dar.

Nach heutigem Verständnis werden epigenetische Effekte durch DNA-Methylierungen, RNAi und kovalente Histonmodifikationen vermittelt.

Ausgangspunkt für letztere ist die Organisation des Genoms eukaryotischer Zellen in Form von Chromatin. Sogenannte Nukleosome stellen die Grundeinheit des Chromatins dar. In Nukleosomen sind ungefähr 146 DNA-Basenpaare um einen oktameren Protein-basierten Nukleosomenkern gewunden, welcher aus einem Histon-(H3-H4)-Heterotetramer und zwei flankierenden H2A-H2B-Heterodimeren besteht.<sup>[1]</sup> Das Linker-Histone H1 sitzt zwischen den Nukleosomen und ist in die Bildung höherer Chromatinstrukturen involviert.<sup>[2]</sup> Diese höheren Organisationsebenen des Chromatins zeichnen sich durch in Schleifen geformte 30 nm-Chromatinfaser aus. Im dem am höchsten kondensierten Zustand sind die Chromosomen, bestehend aus zwei Chromatiden, unter dem Mikroskop sichtbar. Die Chromatiden werden an einer Stelle, die man als Centromer bezeichnet und von der aus die vier Chromosomenarme ausgehen, zusammengeschürt. Durch die kompakte Chromatinstruktur wird die Gesamtlänge eines chromosomalen DNA-Strangs, der beim Menschen einige cm umfasst, auf das ca. acht Tausendstel kondensiert, woraus sich eine Chromosomenlänge von 1,3-10 µm ergibt. In Abb. 1 wird der Chromosomen- und Chromatinaufbau sowie die Chromatinstruktur schematisch dargestellt.

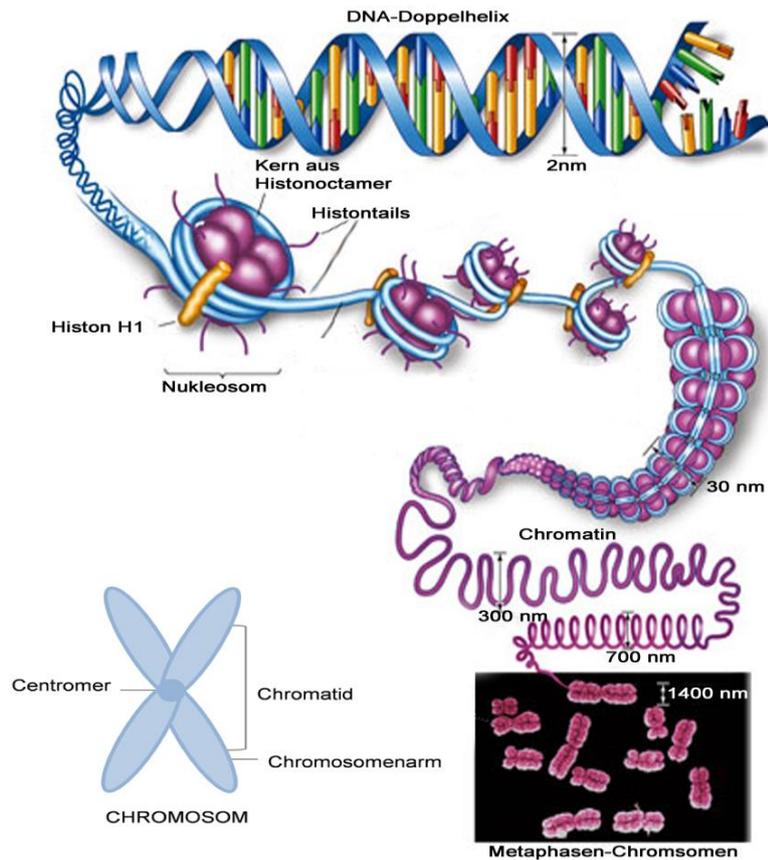


Abb. 1: Chromosomen- und Chromatinaufbau und Chromatinstruktur (leicht abgeändert <sup>[3]</sup>)

Darüber hinaus werden zusätzlich zwei Zustände von Chromatin unterschieden. Das Heterochromatin nimmt dabei den dichter gepackten Anteil ein, während das sogenannte Euchromatin durch eine lockere Struktur charakterisiert ist, an der die Genexpression stattfinden kann.

Bei den Histonen handelt es sich um relativ kleine Proteine, die viele basische Aminosäuren (Arginin, Lysin) enthalten (Tab. 1). Die daraus resultierende positive Ladung sorgt für elektrostatische Wechselwirkung mit dem Phosphodiester der DNA.

Histon	Aminosäuren	Masse [kDa]	% Arg	% Lys
H1	215	23	1	29
H2A	129	14	9	11
H2B	125	13,8	6	16
H3	135	15,3	13	10
H4	102	11,3	14	11

Tab. 1: Histone im Kalbsthymus <sup>[4]</sup>

Die vier hoch konservierten Kern-Histonproteine H3, H4, H2A und H2B bestehen größtenteils aus globulären Domänen und weisen außerhalb des Nukleosoms liegende N-Termini (*histone tails*) auf. Wie in Abb. 2 am Beispiel vom H3-Tail gezeigt, dominieren auch hier die basischen Aminosäuren und führen zu einem erhöhten isoelektrischen Punkt (IEP). Des Weiteren sind die Aminosäurereste der herausstehenden Tails besonders zugänglich für modifizierende Enzyme.



Abb. 2: Ladungsverteilung am H3-Tail

In den letzten zwei Jahrzehnten kristallisierte sich heraus, dass Histone, insbesondere die Histontails, wichtige Vermittlungsstellen für epigenetische Information darstellen und somit maßgeblich an essentiellen Vorgängen, wie DNA-Replikation, Transkription und Zellteilung beteiligt sind.<sup>[5]</sup> Diese regulatorische Eigenschaft erhalten die Histone über reversible kovalente posttranslationale Modifikationen (PTM) der Aminosäurereste (Mono-/Di-/Tri-Methylierung, Acetylierung, Phosphorylierung, Ubiquitinierung, SUMOylierung, ADP-Ribosylierung u.a.). Abb. 3 zeigt eine Auswahl der prominentesten Histon H3-Tail-Modifikationen. Darunter sind Methylierungen unterschiedlichen Grades an Arginin- und Lysinseitenketten, Acetylierungen an Lysinresten sowie Phosphorylierungen an Serin- und Threoninresten. Die Acetylierung wird generell mit der Aktivierung der Transkription assoziiert. Es wird davon ausgegangen, dass aufgrund von Acetylierungsvermittelter Ladungsminderung, die Bindefähigkeit zur DNA herabgesetzt wird, während gleichzeitig die Zugänglichkeit für andere Proteine, wie Transkriptionsfaktoren und DNA-Polymerasen, zur DNA heraufgesetzt wird.

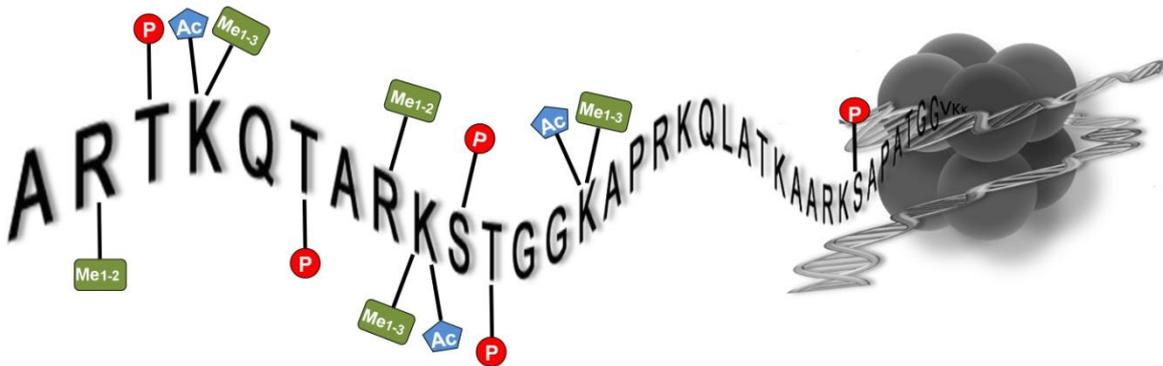


Abb. 3: Ausgewählte Modifikationen am Histone H3-Tail

Im Fall von einigen bestimmten PTM an Histon H3 konnte inzwischen festgestellt werden, dass sie eine direkte Beziehung zu fundamentalen zellulären Prozesse aufweisen. So steht beispielsweise die Methylierung von Lysin-4, die Acetylierung von Lysin-14 und die Phosphorylierung von Serin-10 eng mit der Transkriptionsaktivierung von bestimmten Genabschnitten in Zusammenhang, während Lysin-9-Methylierung mit der Genrepression in Verbindung steht.<sup>[6]</sup>

Die Zuordnung von Histon-Modifikationen zu funktionellen Aufgaben und deren Folge im zellulären Zusammenhang gewinnt an Komplexität, da sie auch in Kombinationsmustern auftreten können.

Diese Modifikationsmuster können zusätzlich an verschiedenen Histontails eines Nukleosoms lokalisiert sein und dazu von Nukleosom zu Nukleosom inhomogen auftreten. Eine weitere veränderliche Größe steuert die Existenz von unterschiedlichen und funktionell-spezifischen Versionen der Histonproteine bei. Ein Beispiel für eine solche Histon-Variante von Histon H3 stellt das exklusiv in Nukleosomen des Centromers vorkommende CENP-A (*Histone H3-like centromeric protein A*) dar. Die C-terminale globuläre Domäne des humanen CENP-A weist 62% Identität mit der von Histon H3 auf, unterscheidet sich jedoch explizit bezüglich des N-terminalen Histontails.<sup>[7]</sup> Kombiniert ergibt sich durch diese Fakten ein enormes Regulierungspotential der Histone. Die Streuung und das Verhältnis von Histonmodifikationen in den verschiedenen Stadien des Zellzyklus werden dabei von sich funktionell gegenüberstehenden Enzymen reguliert. So wird beispielsweise im Bezug auf die Acetylierungen von Lysinresten das entsprechende Enzympaar von Histonacetyltransferasen (HAT) und Histondeacetylasen (HDAC) gestellt, während der Phosphorylierungsgrad an Serin-, Threonin- und an Tyrosinresten durch Enzyme aus der Familie der Protein-Kinasen (PK) und Protein-Phosphatasen (PP) gesteuert wird. Der Methylierungsgrad von Lysin- und Argininseitenketten wird hingegen von Histonmethyltransferasen (HMT) und von Histon-Demethylasen (HDM) eingestellt. In Abb. 4 ist zur Veranschaulichung die Phosphorylierungsreaktion an Serin, die  $\epsilon$ -N-Acetylierung an Lysin und die stufenweise  $\omega$ -N-Methylierung von Arginin gezeigt. Bei der HMT-vermittelten Dimethylierung von Arginin muss zwischen  $\omega$ -N,N-Dimethylierung (asymmetrisch) und  $\omega$ -N,N'-Dimethylierung (symmetrisch) unterschieden werden. Für erstgenannte sind Typ I-Enzyme und für zweigeannte Typ II-Enzyme verantwortlich.

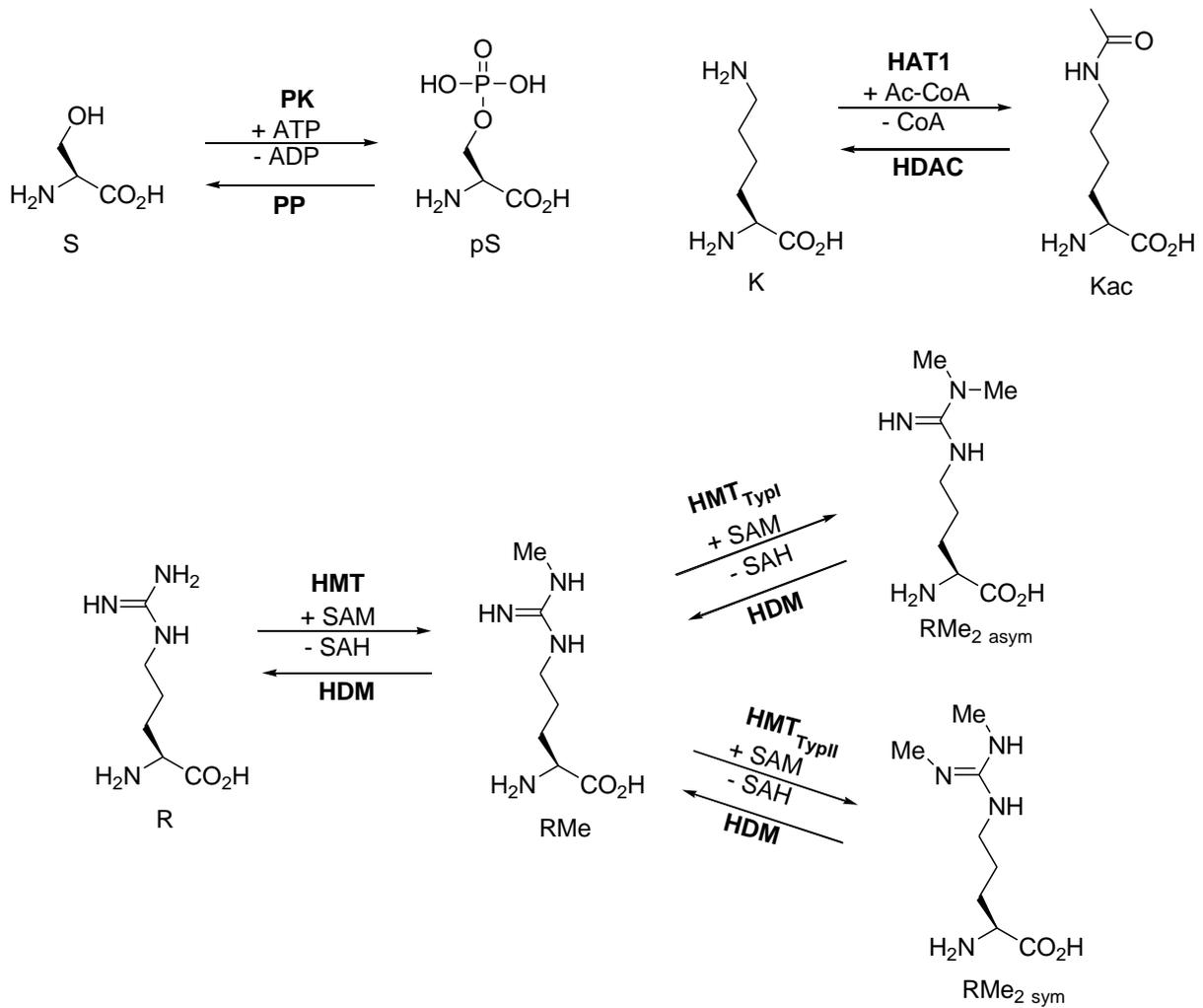


Abb. 4: Beispiele für Modifizierungen an Serin (S), Lysin (K) und Arginin (R) durch entsprechende Enzyme

Diese und weitere enzymatische Proteine sind es, die das Gleichgewicht des Modifikationsstatus an den Histonen regeln und somit den Zugang von anderen Regulatorproteinen gewähren oder verhindern. Diese weisen oftmals konservierte modifikations-spezifische Bindungsdomänen auf. Zu den geläufigsten Bindungsdomänen gehört die Chromodomäne, die selektiv methyliertes Lysin erkennt und die u.a. in HP1 (Heterochromatin Protein 1) und der HMT Suv39 (Suppressor of variation 3-9) vertreten ist. Acetylierte Lysinreste werden durch Bromodomänen-enhaltende Proteine wie z.B. die Histonacetyltransferase GCN5 in Hefe und den Nukleosom-Remodelierungs-Komplex SWI/SNF erkannt.



Aus Beobachtungen, dass Histon-Modifizierungen einen Einfluss auf die Chromatinstruktur haben, definierte PTM-Muster an Histontails die Rekrutierung von bestimmten regulatorischen Proteinen fördern oder unterbinden und an diesen Proteinen spezifische Bindungsdomänen gefunden worden sind, entwickelte sich die Theorie über den „Histon-Code“.<sup>[6]</sup> Zusammenfassend wird durch den Histon-Code beschrieben, dass durch die Art und Positionen der Modifikation(en), die Reihenfolge der Vorgänge und im welchen Kontext die Veränderungen stehen, ein synergistischer Effekt regulatorischer Natur erzeugt wird.

Im aktuellen Stand der Wissenschaft ist die Theorie des Histone-Codes nicht unumstritten, wird aber weitgehend anerkannt, auch wenn die vollständige Entschlüsselung aufgrund der beschriebenen Komplexität bisher nur ansatzweise gelungen ist.

Die Epigenetik ist ein relativ junges Forschungsfeld das intensiv untersucht wird. Im Rahmen dieser Arbeit kann aufgrund der Komplexität der Thematik nur ein Einblick in bisherige Zusammenhänge geleistet werden. Deshalb wird im weiteren Kontext der Fokus vor allem auf die Phosphorylierung am Histon H3-Tail gelegt. Dabei wird insbesondere auf die Phosphorylierung von Serin-10 am H3-Tail eingegangen, welche anteilig auch als Basis zur weiteren Untersuchung in dieser Arbeit gedient hat.

## 1.2 Die Histone H3-Tail-Phosphorylierung

Seit der erstmaligen Beobachtung von Histon-Phosphorylierung in den Sechzigern<sup>[8]</sup> wurden einige Phosphorylierungsstellen, insbesondere an Histone H3 identifiziert: Serin-10 (pS10)<sup>[9]</sup> und Serin-28 (pS28)<sup>[10]</sup>, sowie Threonin-3 (pT3)<sup>[11]</sup>, Threonin-11 (pT11)<sup>[12]</sup> und kürzlich auch Threonin-6 (pT6).<sup>[13]</sup> Die H3-Phosphorylierungen sind im Allgemeinen evolutionär in Tieren und Pflanzen konserviert. Ihre speziellen Funktionen und die Profile nachgeschalteter Signalwege werfen allerdings viele Kontroversen auf, da sie sich nicht nur zwischen Tieren und Pflanzen, sondern bereits beim Vergleich von artverwandten Organismen unterscheiden.<sup>[14-16]</sup> Somit scheint es bisher unmöglich, ihnen eine universelle Aufgabe zuzuordnen. Dieser Aspekt führt dazu, dass bis heute die funktionelle Aufklärung der Histon H3-Phosphorylierungen und ihr Zusammenspiel mit anderen PTM noch in den Anfängen steckt oder anders gesehen noch viel Potential für Entdeckungen bereithält.

### 1.2.1 Phosphorylierung von Serin-10 in Histon H3

Einen besonderen Stellenwert bei der Aufklärung von Funktionen der Histonmodifikationen hat in den letzten zwei Jahrzehnten die Phosphorylierung von Serin-10 an Histon H3 (H3pS10) eingenommen. Ihr Auftreten ist in einem breiten Spektrum unterschiedlichster Organismen dokumentiert. Sie wurde nicht nur in Wirbeltieren und *Tetrahymena thermophila*, sondern auch in Pflanzen, *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) und *Aspergillus nidulans* detektiert.<sup>[17-24]</sup>

Im Gegensatz zur Histonacetylierung, welche eng mit der Genaktivierung verknüpft ist<sup>[25-26]</sup>, ist die physiologische Funktion der Serin-10-Phosphorylierung trotz anhaltender und vielfacher Erforschung immer noch nicht hinreichend aufgeklärt. Dies hängt auch damit zusammen, dass Serin-10-Phosphorylierung in Histon H3 in verschiedenen Phasen des Zellzyklus auftritt, in denen die globale Struktur des Chromatins deutlich variiert. Zum einen, in der für die transkriptionelle Aktivierung nötige aufgelockerte, dekontensierte Form der Chromatinfasern, die für den Zugang von Transkriptionsfaktoren zur DNA und somit für die Genexpression nötig ist. Zum anderen, die für die Mitose sowie Meiose<sup>[19, 23]</sup> nötige kompakte, kondensierte Chromatinstruktur, die erforderlich ist, um den Chromosomensatz bei der Zellteilung auf die zwei neu entstehenden Zellen zu verteilen. Doch trotz bisheriger reichhaltiger Untersuchungen konnte gerade wegen dieser Divergenz der Serin-10-Phosphorylierung keine allgemein gültige Rolle zugewiesen werden, worauf im Folgenden eingegangen wird.

#### **1.2.1.1 H3S10-Phosphorylierung während der Mitose und Meiose**

Das Auftreten der H3 Serin-10-Phosphorylierung während der Mitose ist mehrfach belegt worden.<sup>[9, 19, 24]</sup> In Säugetierzellen tritt sie anfänglich in der späten G2-Phase, zunächst nur lokalisiert am perizentrischen Heterochromatinregionen, auf. Anschließend breitet sie sich bis zur Prophase über das gesamte Chromatin aus, überdauert Prometa- und Metaphase, bis sie in der späten Anaphase teilweise verschwindet und die Dephosphorylierung in der Telophase vollständig abgeschlossen ist<sup>[19]</sup> (siehe auch Abb. 5). Ganz ähnlich verläuft die Phosphorylierung in der Meiose.<sup>[23]</sup>

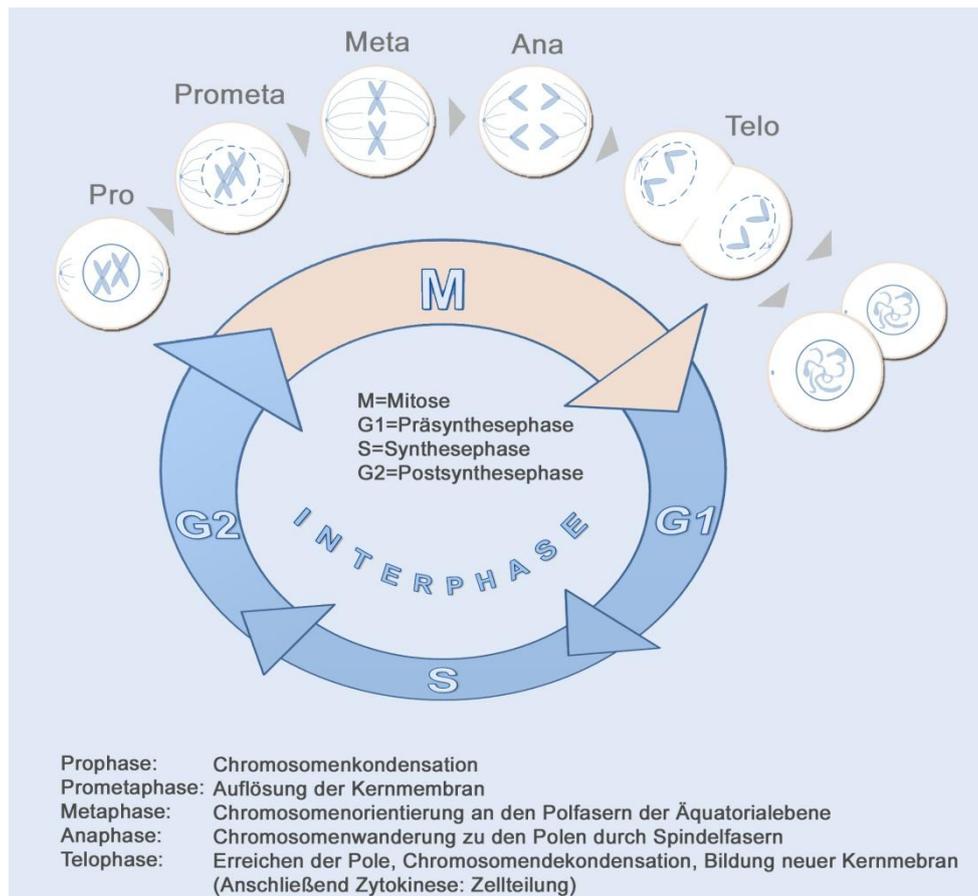


Abb. 5: Zellzyklus mit Phasen der Mitose

Welche Rolle die Serin-10-Phosphorylierung bei Mitose und Meiose genau spielt, ist nicht eindeutig geklärt und offensichtlich Organismus-abhängig. So führte die Inhibition von putativen H3pS10-Kinasen in Untersuchungen an Säugetierzellen zu ausbleibender Chromosomenkondensation und verhindert den Übergang in die Mitose.<sup>[22]</sup> Allerdings wurde die Aussagekraft dieses Experimentes durch das Argument abgeschwächt, dass nicht ausgeschlossen werden konnte, dass auch andere Substrate dieser Kinase die Mitose beeinflusst haben könnten. Doch auch an *Tetrahymena thermophila* wurde mittels einer nicht phosphorylierbaren H3(S10A)-Mutante direkt gezeigt, dass die Chromatinkondensation und Segregation *in vivo* deutlich gestört war.<sup>[24]</sup> Allerdings zeigte eine entsprechende H3(S10A)-Mutante in *Saccharomyces cerevisiae* keinen Einfluss auf den Verlauf der Mitose (und Meiose). Es wird vermutet, dass H2B-Phosphorylierung das Fehlen von H3pS10 funktional kompensieren könnte.<sup>[20]</sup> Untersuchungen von meiotischen Phasen an Mais Meiozyten zeigen keine direkte Korrelation mit der Kondensation der Chromosomen, sondern lediglich, dass die Serin-10-Phosphorylierung mit der Schwesternchromatid-Cohesion einhergeht.<sup>[21]</sup> Somit bleibt die Rolle der Serin-10-Phosphorylierung bezüglich der Chromosomendynamik nicht genau definierbar. Zusätzlich wird diskutiert, ob statt eines direkten Einflusses auf die Chromosomenkondensation, die Phosphorylierung nicht viel eher indirekt auf die chromosomalen Reorganisationsmechanismen wirkt.<sup>[16]</sup> Durch die Entdeckung zusätzlicher Modifizierungen, die zeitgleich mit der Serin-10-Phosphorylierung am selben Histon H3 auftauchen, ergeben sich interessanterweise neue Perspektiven. Was in einer Tandem-massenspektrometrischen (MS/MS) Untersuchung für den Fall

von Acetylierung an K9 oder K14 gezeigt werden konnte.<sup>[27]</sup> Des Weiteren konnte aufgezeigt werden, dass die Phosphorylierung an Serin-10 auch in Gegenwart von trimethylierten Lys-9 vorkommt und diese einen regulatorischen Einfluss auf die Bindung des repressiven HP1 (Heterochromatin Protein 1) zum Heterochromatin hat, indem sie es bei unveränderten Methylierungsgrad während der Mitosephase vom Substrat (H3K9Me3) verdrängt (Abb. 6).<sup>[28]</sup>

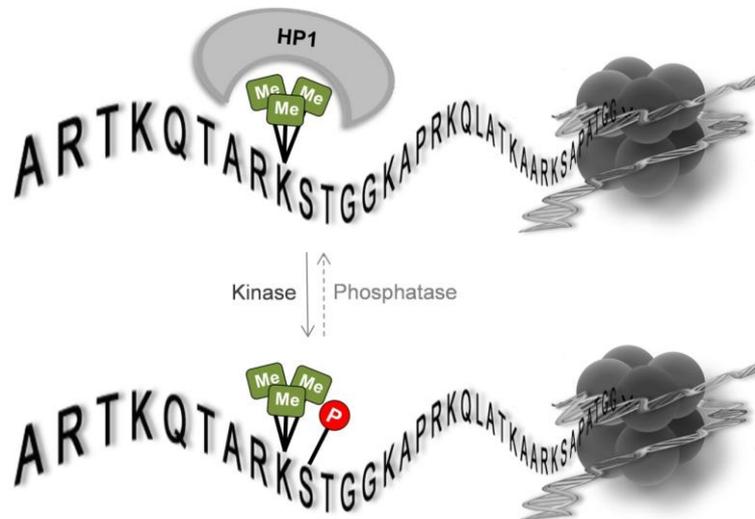


Abb. 6: Einfluss von Ser-10-Phosphorylierung auf HP1-Bindung (Binärer Methyl/Phospho-Schalter)

Mit einem ähnlichen Einfluss wirkt sich die Serin-10-Phosphorylierung auch auf die Splicing-Faktoren SRSF1 und SRSF3 aus, die sich während der mitotischen Phase vom Chromatin lösen.<sup>[29]</sup>

### 1.2.1.2 H3S10-Phosphorylierung während der Interphase

Im Vergleich zur eher globalen Phosphorylierung von H3 während des Großteils an Mitose- und Meiosephasen, ist die Phosphorylierung von Serin-10 an H3 während der Interphase auf bestimmte Regionen im Chromatin beschränkt. Die Phosphorylierung an H3S10 korreliert mit der Aktivierung der dort gelegenen Gene.<sup>[30]</sup> Sie ist allerdings nicht universal für die Transkription aller Gene, sondern taucht nur an spezifischen Promotorregionen von bestimmten Genen auf, was durch Transkriptionsanalyse in Hefe dargestellt werden konnte.<sup>[31]</sup> Untersuchungen zeigten, dass Histon H3 Serin-10-Phosphorylierung mit der Induktion von IER- (*I*mmEDIATE *e*ARLY *r*ESPONSE)-Genen einhergeht<sup>[32-33]</sup>, was am Beispiel von stimulierter Aktivierung von MSK1 und 2 (*N*uclear *m*ITOGEN- and *s*TRESS-activated *p*ROTEIN *k*INASE *1* and *2*) an *fos*-Genen von Säugetierzellen beobachtet wurde.<sup>[34]</sup> MSK1/2 ist eine der Interphase-spezifischen Kinasen von Serin-10 in Histon H3 (siehe Abschnitt 1.2.2). Bemerkenswert ist, dass die H3-Phosphorylierung an Serin-10 an unterschiedlichen Regionen (Promoterregion, Enhancerregion) zur Aktivierung des Genes durch ein und denselben Stimulus beitragen kann, indem durch diesen unterschiedliche Kinasen aktiviert werden können.<sup>[35-37]</sup> An *Drosophila* wurde gezeigt, dass unter Einfluss von thermalem Stress ein deutlicher Anstieg an H3-Phosphorylierungen an Hitzeschock-Loci verzeichnet wird. Dies geht einher mit der Rekrutierung entsprechender Transkriptionsfaktoren<sup>[38]</sup> und der Reduzierung des restlichen H3-

Phosphorylierungslevels im restlichen Genom.<sup>[39]</sup> Doch trotz der Gesamtheit der experimentellen Daten ist man sich im Unklaren über die funktionale Rolle von Phosphorylierungsmarkierungen während der Interphase. Die Aktivierung von Genen könnte dadurch induziert werden, wie im Fall von HP1 $\gamma$  beobachtet, dass pS10-Phosphorylierung repressive Proteine und Proteinkomplexe vom H3-Tail und somit vom Promotorgen verdrängt.<sup>[40]</sup> Auffällig ist allerdings das zusätzliche Auftreten von Lysin-14-Acetylierung am selben H3-Tail.<sup>[33, 41-42]</sup> Hinzu kommt die Beobachtung, dass die Rekrutierung von 14-3-3  $\zeta$  Adapter-Proteinen zu IER-Genen (*c-fos* und *c-jun*) mit H3pS10K14Ac korreliert.<sup>[43]</sup> 14-3-3-Proteine sind direkte Binder von H3pS10, deren Bindungsaffinität in diesem Falle durch K14-Acetylierung zusätzlich verstärkt wird.<sup>[44-45]</sup> Die Adapter-Proteine könnten möglicherweise direkt andere Proteine oder Proteinkomplexe zum H3-Tail führen oder diese nach der Bindung rekrutieren und somit an der Transkription der dort gelegenen Gene beteiligt sein.<sup>[15]</sup> Ähnlich wie in der Mitose wird ein Zusammenwirken von H3pS10 und H3K14Ac als binärer Schalter vermutet. So bindet GCN5, eine Histonacetyltransferase aus Hefe, *in vitro* mit bis zu zehnfacher Substratspezifität an den Serin-10-phosphorylierten H3-Tail, was andeutet, dass die Phosphorylierung die K14-Acetylierung nach sich ziehen könnte und somit auch Auslöser der einhergehenden Transkriptionsaktivierung sein könnte.<sup>[41, 46]</sup> Andere Daten hingegen sprechen gegen eine kausal beeinflussende Wirkung dieser Modifikationen. Zum einen ändert sich die Acetylierungsverteilung an IER-Genen weder durch Rückgang der Phosphorylierung, mittels Eingriff in den MSK-Kinasesignalweg (durch Kinase-Inhibierung oder Mutation)<sup>[33-34]</sup>, noch durch die nur noch an bestimmten Hitzeschock-Genen gebündelte *De-novo*-Phosphorylierung nach Hitzeschock.<sup>[14]</sup> Das deutet darauf hin, dass sich die Phosphorylierung stark nach dem Transkriptionsbedürfnis der Zelle richten kann, während die genomische Verteilung an Histonacetylierung eher als weniger dynamisch erscheint.<sup>[38]</sup>

### 1.2.2 H3S10-spezifische Kinasen

Seit der Entdeckung von H3-Phosphorylierung<sup>[8]</sup> und der Schilderung über die erste *in vitro* pS10-phosphorylierenden Kinase<sup>[47]</sup> wurden eine Reihe von potentiellen *in vivo* S10-Kinasen beschrieben. Diese lassen sich als Mitose- oder Signaltransduktions-spezifische H3pS10-Kinase einteilen. Nach Kinaseinhibitorwirkung oder RNAi-Experimenten, in Bezug auf die Mitglieder der Aurora-Kinasen, zeigte sich eine drastische Reduktion der H3S10-Phosphorylierung während der Mitose.<sup>[29, 48]</sup> Damit haben sich mittlerweile hauptsächlich die Mitglieder der Aurora-Kinase-Familie als spezifische mitotische H3pS10-Phosphorylierungskinasen herauskristallisiert, wobei Aurora B in Säugern<sup>[49]</sup>, *Drosophila*<sup>[50]</sup>, *C. elegans*<sup>[49]</sup>, Aurora A sowie Aurora B in *Xenopus*<sup>[51-52]</sup> und IPL1 in Hefe und Nematoden<sup>[20]</sup> beschrieben wurden. In *Aspergillus nidulans* korreliert die Kinase NIMA mit mitotischer H3-Phosphorylierung und zeigt *in vitro* eindeutige Kinaseaktivität an Histon H3.<sup>[18]</sup> Kinasen, die in der Interphase aktiv an der S10-Phosphorylierung beteiligt sind, können z.T. als Stimulus-abhängig eingeteilt werden. Bei Säugern handelt es sich um Stimulus-spezifische Downstream-Kinasen, die hauptsächlich dem ERK- oder/und p38-MAP-Kinase-Signalweg zugeordnet werden können (Abb. 7).<sup>[53-54]</sup> Zusätzlich zu MSK1 und 2<sup>[34]</sup> können PKA (Protein Kinase A)<sup>[55-56]</sup>, RSK2 (*ribosomal protein S6 kinase*)<sup>[57]</sup> und IKK $\alpha$  (IkB Kinase  $\alpha$ )<sup>[58]</sup> zu den Transkriptions-spezifischen H3pS10-Kinasen gezählt werden. Die Genexpression wird mittels PKA durch das follikelstimulierende Hormon (FSH) ausgelöst<sup>[59]</sup>, während diese Rolle bei IKK $\alpha$  die Cytokine in Form vom Tumornekrosefaktor (TNF)

übernehmen.<sup>[58]</sup> Die Signalkaskade zur Transkriptionsaktivierung durch RSK2 und MSK1/2 wird dagegen beispielweise durch den epidermalen Wachstumsfaktor (EGF) oder Stress bewirkt.<sup>[36, 57]</sup> Des Weiteren zeigten *in vitro* Untersuchungen, dass Serin-10 in Histon H3 ebenfalls effizient von TLK1 (*Tousled-like kinase 1*) phosphoryliert wird.<sup>[60]</sup>

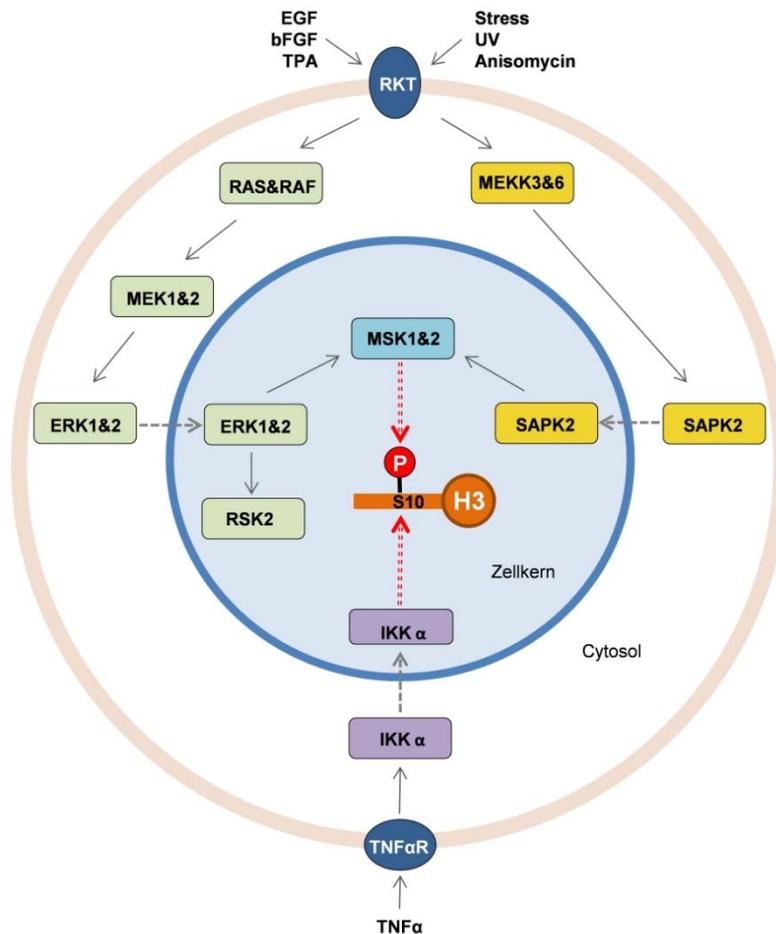


Abb. 7: Signalkaskadenübersicht zur H3S10-Phosphorylierung der Interphase (leicht abgeändert<sup>[14]</sup>)

### 1.2.3 H3S10-spezifische Phosphatasen

Im Gegensatz zu den H3S10-spezifischen Kinasen ist bisher nur wenig über die zugehörigen Phosphatasen und ihre regulatorischen Untereinheiten bekannt. Als mögliche mitotische Phosphatasen werden die Mitglieder aus der Typ 1 Phosphatase (PP1)-Familie angesehen, da sie nachgewiesenermaßen *in vivo* pS10 in H3 in Wirbeltieren, Hefe und *C. elegans* dephosphorylieren.<sup>[20, 51, 61]</sup> Aus dieser Familie stammten sowohl die in Hefe vorkommende GLC7 als auch die in *C. elegans* gefundene CeGLC7 Phosphatase, welche die Gegenstücke zur IPL1-Kinase bilden.<sup>[20, 62]</sup> Die PP1-Phosphatasen sind nicht nur imstande H3pS10 zu dephosphorylieren, sondern inaktivieren gleichzeitig Aurora A und B durch Dephosphorylierung.<sup>[51, 63]</sup> Es ist bekannt, dass die regulatorischen Untereinheiten der PP1 durch das Konsensusmotiv R/K-V/I-X-F mit PP1 assoziierten.<sup>[64-65]</sup> Diese Sequenz ist auch in den Aurora-Kinasen konserviert, wobei Aurora A gleich zwei solcher Domänen aufweist und als direkter PP1-Binder identifiziert worden ist.<sup>[66]</sup> Das ein Komplex zwischen Aurora B

und PP1 an der Regulierung der mitotischen H3-Phosphorylierung involviert ist, zeigt sich durch Behandlung von PP1 mit Okadainsäure (einem PP1/PP2A-Inhibitor) und der damit verbundenen Aktivierung der Kinase.<sup>[67]</sup> Eine direkte Interaktion zwischen Aurora B und PP1 ist dagegen bisher noch nicht nachgewiesen worden.<sup>[16]</sup> Die vier beschriebenen PP1-Isoformen ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma_1$  und  $\gamma_2$ )<sup>[68]</sup> stimmen in Säugetieren zu ca. 90% überein und weisen fast identische katalytische Domänen auf, unterscheiden sich aber besonders stark am C-Terminus.<sup>[69]</sup> Im Allgemeinen sind sie während Mitose und Interphase im Cytoplasma sowie im Nukleus zu finden, wobei davon ausgegangen wird, dass die Heterogenität der Termini dafür sorgt, dass sie zu bestimmten Phasen des Zellzyklus an verschiedenen Orten lokalisiert sind.<sup>[65]</sup>

Über spezifische Phosphatasen der Interphase ist noch sehr wenig bekannt. Lediglich für die globale Dephosphorylierung nach thermalen Stress und der zugrundeliegenden exklusiven *De-novo*-Phosphorylierung an Hitzeschock-Genen in *Drosophila melanogaster* wird ein Zusammenspiel mit PP2A (Serin/Threonin-Protein-Phosphatase 2A) vermutet, da sich deren Inhibition oder Mutation negativ auf den H3-Dephosphorylierungsgrad auszuwirken scheint.<sup>[70]</sup> Ferner sind die regulatorischen Untereinheiten, die mit Phosphatasen Komplexe bilden und somit deren Aktivität beeinflussen können, weitestgehend unbekannt.

#### 1.2.4 Weitere Phosphorylierungsstellen am H3-Tail

Die Phosphorylierung an Threonin-11 (T11) und Serin-28 (S28) sind ebenso wie die Phosphorylierung an Serin-10 während der Mitose<sup>[10, 12]</sup> als auch bei der Translationsaktivierung bestimmter Gene beobachtet worden.<sup>[30, 71-72]</sup> Somit spielt ihre Funktion durch ihr Auftreten in ebenfalls gegenüberstehenden Chromosomenzuständen auch eine kontrovers diskutierte Rolle.

Die Phosphorylierung von Serin-28 wird oft mit der Serin-10-Phosphorylierung verglichen, da ihr Auftreten und ihre Verteilung während der Mitose und Meiose sehr ähnlich sind<sup>[10]</sup> und der mitotische Phosphorylierungsstatus ebenfalls durch Mitglieder der Aurora Kinasefamilie<sup>[16, 52]</sup> und PP1<sup>[51]</sup> geregelt ist. Dies ist nicht erstaunlich, da die beiden Serine in derselben Konsensussequenz -ARKS- vorliegen. Serin-28-Phosphorylierung taucht allerdings erst etwas später auf (Prophase), ist nicht so verbreitet wie die Phosphorylierung von Serin-10 und verschwindet bereits in der frühen Telophase, was vermutlich einer höheren Sensitivität gegenüber PP1 zuzuschreiben ist.<sup>[73]</sup> Während das Auftreten von Methylierungen an Lysin-27 und Lysin-36 in Kombination mit S28-Phosphorylierung am selben Histon H3-Tail *in vivo* bereits nachgewiesen wurde<sup>[27]</sup>, konnte die Existenz von gemeinsam auftretenden Phosphorylierung in Form von H3pS10pS28 während der Mitose bisher nicht detektiert werden. Bei Untersuchungen an Mäusefibroblasten in der Interphase konnte die Kolo-kalisation beider Phosphorylierungspositionen an einem H3-Tail per Immunfluoreszenz-<sup>[74]</sup> und Chromatin-Immunpräzipitations-(ChIP)-Experimenten<sup>[75]</sup> allerdings ausgeschlossen werden. Trotz der unterschiedlichen lokalen Verteilung der beiden Phosphorylierungen sind diese auch während der Interphase durch dieselbe Kinase, wie im Fall von TPA (12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetat)-stimulierter MSK1/2 gezeigt, induzierbar. Die Serin-28-Phosphorylierung wurde dabei an Promotorregionen von IER-Genen wie *c-jun* beobachtet.<sup>[34, 76]</sup>

Ebenso wie pS10 und pS28 korreliert die Threonin-11-Phosphorylierung mit der Chromosomenkondensation während der Mitose, unterscheidet sich aber deutlich durch ihre reziproke

Lokalisierung. Sie ist lediglich auf die Zentromere beschränkt und ist zwischen früher Prophase und früher Anaphase existent.<sup>[12]</sup> Die mitotische Threonin-11-Phosphorylierung wird durch die ubiquitär exprimierte DLK (*DAP-like kinase*), ein Mitglied der DAP (*death-associated protein*)-Kinasefamilie, vermittelt.<sup>[12]</sup> Zusätzlich kann die T11-Phosphorylierung in der Interphase durch die Serin/Threonin-Protein-Kinase CHK1 mit der Genexpressionen an Cyclin B1- und Cdk1-Promotoren in Zusammenhang gebracht werden.<sup>[72]</sup> Die Phosphorylierung scheint, ebenso wie die benachbarte Serin-10-Phosphorylierung, einen Einfluss auf Rekrutierung der Histonacetyltransferase GCN5 und die dadurch vermittelte Transkriptionsaktivierung zu haben.<sup>[71]</sup> Erniedrigt sich das pT11-Level, durch DNA-Schädigung induzierte CHK1-Dissoziation von Histon H3, korreliert dies mit der Reduktion der Acetylierung von Lysin-9 und transkriptioneller Repression.<sup>[72]</sup> Die Kinase PRK1 (*protein kinase C related kinase 1*) hingegen verknüpft die pT11-Phosphorylierung mit der Transkription Androgen-stimulierter Gene durch die Phosphorylierungs-stimulierte Demethylierung von Lysin-9.<sup>[77]</sup>

Der Ablauf der Phosphorylierung von Threonin-3 während der Mitose ist zeitlich gesehen der von S10 und S28 sehr ähnlich, doch zeigen sich in der lokalen Präferenz deutliche Unterschiede. So beginnt die Phosphorylierung punktuell, allerdings über das ganze Chromosom verteilt, bis sie sich über alle Chromosomenarme ausbreitet. Die stärkste Konzentration ist dabei jedoch im inneren Centromer zu finden.<sup>[78]</sup> In Säugetierzelllinien scheint HASPIN (*haploid germ cell specific nuclear protein kinase*), welche ebenfalls am Centromer angereichert zu finden ist, die vermittelnde Kinase zu sein.<sup>[79]</sup> Interessanterweise scheinen laut massenspektrometrischen Untersuchungen *in vivo* Doppelposphorylierungen in Form von H3pT3pS10 zu existieren.<sup>[27]</sup> Welche Rolle die T3-Phosphorylierung bei der Mitose, insbesondere bei der Chromosomenkondensation, einnimmt ist nicht ausführlich geklärt. Diskutiert werden u.a. die Regulation der Chromosomenorientierung während der Metaphase und die Schwesternchromatid-Kohäsion sowie der Einfluss auf die Spindelanlagerung.<sup>[78-79]</sup> Inwiefern die T3-Phosphorylierung außerhalb des Mitosekontextes zelluläre Vorgänge beeinflusst, ist eher unklar. Eine Rolle der Threonin-3-Phosphorylierung scheint die Beeinträchtigung der transkriptionellen Repression zu sein, indem durch die Modifikation die Bindung von zwei Untereinheiten (SET und pp32) des INHAT-(*inhibitor of acetyltransferases*)<sup>[80]</sup> zum H3-Tail unterdrückt wird.<sup>[81]</sup> Die Methylierbarkeit der direkt umgebenden Aminosäuren (Arg-2 und Lysin-4) favorisiert Threonin-3 außerdem als potentiellen Bestandteil eines binären Schalters<sup>[82]</sup>, dessen Existenz und Rolle aber bisher unaufgeklärt ist. Tab. 2 gibt einen zusammenfassenden Überblick über das Auftreten und Verschwinden der H3-Tail-Phosphorylierungen und über das korrespondierende Enzym-paar während der Mitose von Säugetierzellen.

Phosphorylierungsstelle	Auftritt während Mitose		Lokalisation	Mitotische Kinase/Phosphatase
pS10	Späte G2	- Telo	Perizentrisch →ges. Genom	Aurora B/PP1?
pS28	Pro	- Frühe Telo	Perizentrisch →ges. Genom	Aurora B/PP1?
pT11	Frühe Pro	- Frühe Ana	Zentromer	DLK/?
pT3	Späte G2	- Telo	Gesprenkelte Ausbreitung →ges. Chromosom (+Zentromer)	HASPIN/?

Tab. 2: Übersicht über H3-Tail-Phosphorylierungen während der Mitose von Säugetieren

Hinzu kommt eine kürzlich entdeckte neue H3-Modifikation, die Phosphorylierung von Threonin-6, welche einen maßgeblichen Einfluss auf die Interaktion von H3-Tail-Bindern zu haben scheint.<sup>[83]</sup> In Prostatazellen wird die Threonin-6-Phosphorylierung durch PKC $\beta_1$  (Protein Kinase C beta type I) vermittelt. Dies führt zur Transkription von Zielgenen des Androgenrezeptors, indem es die Demethylierung von Lysin-4 durch LSD1 (Lysin-spezifische Demethylase 1) verhindert.<sup>[13]</sup>

In CENP-A, der H3-Histonvariante des inneren Kinetochors von Säugetieren, ist Ser-7 im Tail-Abschnitt konserviert, wobei die Ser-7-Phosphorylierung während der Mitose der von Ser-10 in H3 folgt (frühe Prophase) und die Dephosphorylierung in der frühen Anaphase schon abgeschlossen ist.<sup>[84]</sup> Zu Beginn der Mitose scheint Aurora A für die Initiativphosphorylierung von Ser-7 verantwortlich zu sein, die Aurora B für die weitere Phosphorylierung an diese Position, rekrutiert.<sup>[85]</sup> PP1 $\gamma$ 1 scheint die korrespondierende Phosphatase zu sein.<sup>[86]</sup> Das Ser-7 die Funktion von Ser-10 ersetzt, wird durch das nicht komplett zeitgleiche Auftreten der Phosphorylierung ausgeschlossen. Dafür wird Ser-7-Phosphorylierung allgemein eine wichtige Rolle bei der Funktion des Kinetochors zugesprochen, die allerdings noch nicht genau aufgeklärt ist.<sup>[85]</sup> So zeigte sich beispielsweise bei Untersuchungen an S7A-Mutanten, dass die Zellseparation durch die fehlende Phosphorylierung gestört wird.<sup>[86]</sup>

Sehr deutlich wird die Komplexität der Funktionen von H3-Phosphorylierungen, wenn man im Vergleich zu den vielzelligen Tieren (Metazoa) zusätzlich die Pflanzen betrachtet. So ist die räumliche Ausbreitung über die Chromosomen während der mitotischen Phasen, wie am Beispiel von pT11 und pS28 in *Vicia faba* und *Arabidopsis thaliana* geradezu reziprok zu der in Säugerzellen, was die Interpretation zulässt, dass in fast allen Organismen die mechanistische Rolle der Histon H3-Phosphorylierungen sehr dynamisch wechseln kann.<sup>[87]</sup>

### 1.3 Nichtspaltbare Mimetika von pSer, pThr und pTyr

Bei der Untersuchung von phosphorylierten Proteinen, der funktionellen Aufklärung von Phosphorylierungsreaktionen und bei der Entwicklung von Phosphatase-Inhibitoren hat sich der Einsatz von Phosphat-Analoga der Aminosäuren Serin, Threonin und Tyrosin als nützliches Mittel erwiesen.<sup>[88-93]</sup> Für die o.g. Anwendungen sollten sich diese möglichst stabil gegenüber enzymatischer

Aktivität erweisen und sich ebenfalls durch eine hohe Affinität auszeichnen. Diese Anforderungen konnten bereits durch Verbindungen, bei denen der Estersauerstoff gegen eine Methyl- oder Difluormethylengruppe ausgetauscht worden ist, erfüllt werden. Entsprechende nicht-hydrolysierbare Phosphatmimetika für Phosphothreonin und Phosphoserin stellen Phosphonomethylenalanin (Pma) und Phosphonodifluormethylenalanin (Pfa) sowie Phosphonomethylenphenylalanin (Pmp) und Phosphonodifluormethylenphenylalanin (F<sub>2</sub>Pmp) für Phosphotyrosin dar (Abb. 8).

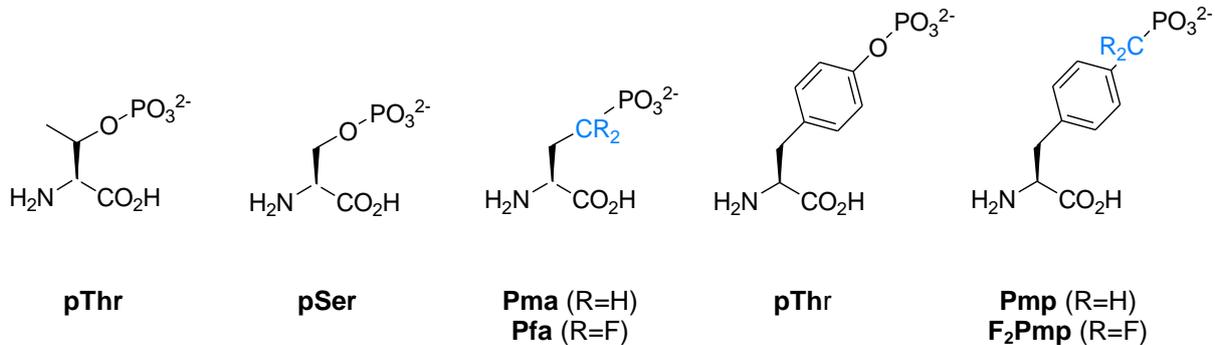


Abb. 8: Phosphothreonin, -serin und -tyrosin und einige ihrer gängigen Phosphonat-Mimetika

Mittels Festphasenpeptidsynthese (SPPS, solid phase peptide synthesis)<sup>[94]</sup> können diese an beliebiger Stelle einer jeweiligen Peptidsequenz integriert werden. Diese Phosphonat-haltigen Verbindungen zeichnen sich durch hohe Resistenz gegenüber Phosphatasen aus und zeigen hinreichende Bindungseigenschaften zu ausgewählten phospho-spezifischen Zielproteinen.<sup>[91-93]</sup> Schon relative kleine Peptid-basierte Verbindungen mit inkorporierten Pmp oder F<sub>2</sub>Pmp-Anteil können diesen Ansprüchen gerecht werden. So haben sie beispielsweise eindeutige Auswirkung auf die Insulinrezeptor-Dephosphorylierung durch Protein-Tyrosin-Phosphatase (PTP)-Inhibierung<sup>[88]</sup> oder inhibieren das Growth factor receptor-bound protein 2 (Grb2) durch Bindung zur SH2-Domäne.<sup>[91]</sup> Da bis jetzt der rekombinante Einbau von Phosphonaten noch nicht erzielt wurde stellen die chemoselektiven Ligationsstrategien der Proteinsemisynthese die einzige Möglichkeit dar, um diese Bausteine in Proteine zu inkorporieren. So besteht die Möglichkeit ausgewählte Proteine bezüglich ihres Phosphorylierungszustandes durch den gezielten Einbau von Phosphonaten zu untersuchen. Die Möglichkeit Proteine mit definierten Proteinmodifizierungen in Form von nicht hydrolysierbaren Phosphat-Mimetika gezielt herzustellen wurde beispielsweise durch Methoden wie Native Chemische Ligation (NCL)<sup>[95]</sup> oder Ligation exprimierter Proteine (Expressed Protein Ligation, EPL)<sup>[96]</sup> geschaffen.<sup>[90, 92-93]</sup> Im Grunde wird das interessierende Protein aus zwei Teilen erzeugt, ein Teil des Proteins rekombinant (ohne Modifikationen) und der andere Modifikations-tragende peptidische Anteil synthetisch. Wie in Abb. 9 anhand eines NCL-Beispielschemas gezeigt, müssen die beiden Bestandteile bestimmte reaktive Gruppen tragen. So wird der synthetische Peptidanteil als C-terminaler Thioester erzeugt, während das rekombinante Proteinfragment ein N-terminales Cystein aufweisen sollte. Die eigentliche Ligation der beiden Fragmente erfolgt durch intramolekulare S→N-Verschiebung einer Thiol-Thioester-Vorstufe.

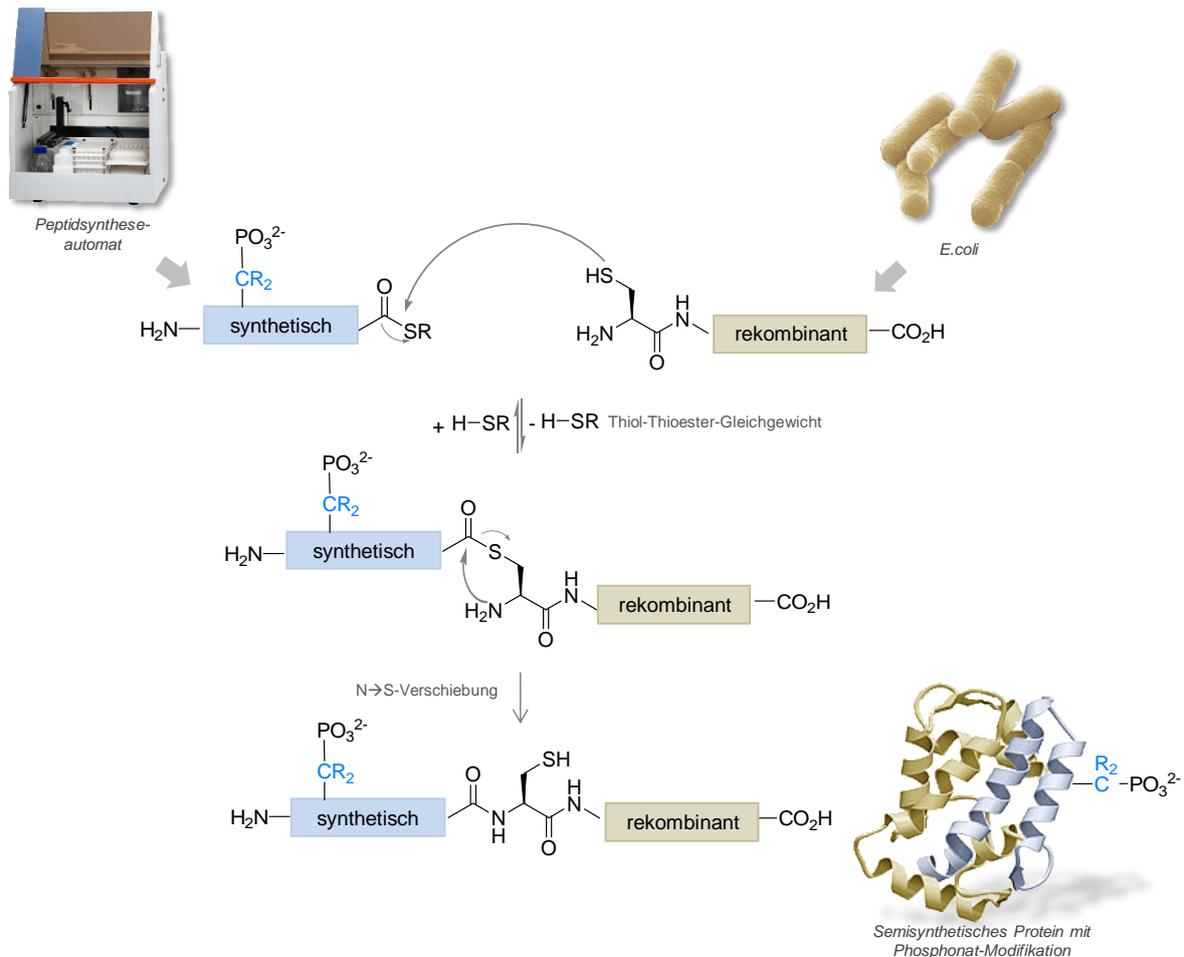


Abb. 9: Proteinsemisynthese auf Thiol-Thioester-Basis zur Herstellung eines Phosphonat-taggen Proteins

Folglich können mit einem solchen semisynthetischen Protein Phospho-spezifische Interaktionspartner auffindig gemacht werden und Verknüpfungen zu komplexen zellulären Transduktionswegen aufgeklärt werden. So konnte nach dieser Strategie der Serotonin-N-Acetyltransferase (AANAT)-Phosphorylierung nach Injektion eines entsprechenden semisynthetisch hergestellten Pma-Konstrukts in Zellen eine stabilisierende Rolle durch 14-3-3-Interaktion zugeordnet werden und somit wurde auch der Bezug auf die Regulation der Melatoninproduktion offengelegt.<sup>[93]</sup> Des Weiteren konnten Mikroinjektionsexperimente mit Pmp-modifizierter Tyrosin-Phosphatase SHP-2 den Einfluss einer bestimmten SHP-2-Phosphorylierung auf den MAP-Kinase-Weg zeigen.<sup>[89]</sup>

## 1.4 FHL-(*Four-and-a-Half-LIM domain proteins*)

### 1.4.1 Die FHL-Proteinfamilie

Der Name LIM geht aus dem Akronym „Lin-11 Isl-1 Mec-3“ hervor. Bei den Bezeichnungen handelt es sich um Gene, die für Tandemkopien des LIM-Motivs (=LIM-Domäne) kodieren.<sup>[97-99]</sup> Charakteristisch für Proteine mit LIM-Domänen ist das  $\text{Zn}^{2+}$ -koordinierende Cystein-reiche Doppel-Zinkfingermotiv, formal  $(\text{CX}_2\text{CX}_{16-23}\text{HX}_2\text{CX}_2\text{CX}_2\text{CX}_{16-21}\text{CX}_2(\text{C}/\text{H}/\text{D}))$ .<sup>[100]</sup> Dieses kommt in Wirbellosen sowie

Säugetieren hoch konserviert vor.<sup>[101]</sup> Obwohl ihr Aufbau der DNA-bindenden GATA-Zinkfingerstruktur ähnlich ist<sup>[102]</sup>, scheinen sie keine entsprechende direkte Affinität zur DNA aufzuzeigen.<sup>[103]</sup> Es handelt sich vielmehr um Adapterdomänen, deren Funktion es ist, als Bindungsvermittler zwischen Proteinen zu fungieren und die Bildung von Multiproteinkomplexen zu ermöglichen. Im Allgemeinen sind sie in wichtige Prozesse der Zelle involviert, wie Genexpression, Signaltransduktion und Umformung des Cytoskeletts.<sup>[103-104]</sup> Zu den Vertretern der LIM-Protein-Superfamilie gehören auch die fünf Mitglieder der *Four-and-a-half-LIM domain*-Proteinfamilie (FHL1-5). Diese bestehen, wie in Abb. 10 schematisch dargestellt, jeweils aus einem N-terminalen LIM-Zinkfinger (half-LIM) und vier darauf folgenden LIM-Domänen (LIM1-4). Da sie ausschließlich aus LIM-Domänen bestehen, werden sie zur Untergruppe der *LIM-only*-Proteine gezählt.

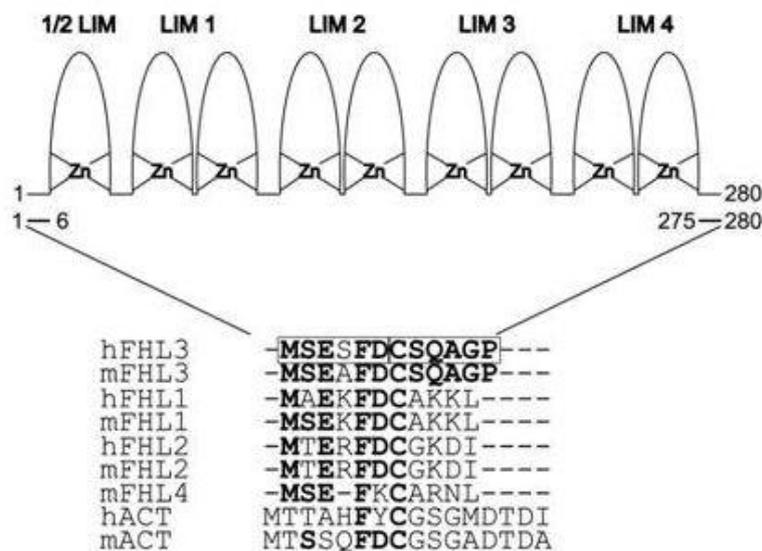


Abb. 10: Schematische Darstellung der LIM-Domänen von FHL3 <sup>[105]</sup>

Während FHL1-3 vor allem stark in Muskelzellen exprimiert werden, kommen FHL4 und FHL5 (ACT) nur im Zellen des Hoden vor. FHL1 und FHL3 befinden sich hauptsächlich in Skelettmuskelzellen, während FHL2 in Herzmuskelzellen angereichert zu finden ist.<sup>[106-107]</sup> Vergleicht man die Proteinsequenzen von dem am besten untersuchten Vertreter (FHL2) mit denen der anderen vier Mitgliedern ergibt sich eine Identität zwischen 50-60%.<sup>[108]</sup> An Mäusen wurde gezeigt, dass ein FHL2-Knock-Out unter  $\beta$ -Adrenozeptoren-Stimulation zur Herzhypertrophie führt und das Fehlen von FHL2, trotz der Sequenzähnlichkeit, nicht durch eines der anderen zwei Mitglieder kompensiert wird.<sup>[109]</sup> Für FHL2 sind mittlerweile 50 Interaktionspartner bekannt, die allerdings untereinander kaum Homologien aufweisen und teilweise in viele grundverschiedene regulierende Signalwege (Zellproliferation, Genexpression, Apoptose) innerhalb der Zelle verwickelt sind.<sup>[108]</sup> So agiert FHL2 beispielsweise als transkriptioneller Coaktivator von CREB/CREM (*cAMP-responsive element-binding protein* bzw. *modulator*).<sup>[110]</sup> Weiterhin wurde gezeigt, dass es als Interaktionspartner von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten des Integrin-Rezeptors fungiert und der Homodimerisierung unterliegen kann sowie sogar Heterodimere mit FHL3 gebildet werden können.<sup>[110-111]</sup> FHL1 in Skelettmuskeln scheint u.a. an der Ausdifferenzierung von Muskelzellen und an der Sarkomeranordnung beteiligt zu sein.<sup>[112-113]</sup> Vom

Cytoplasma-lokalisierten FHL1 sind zwei Splicevarianten (KyoT2 und KyoT3) bekannt. KyoT2 enthält nur zwei N-terminale LIM-Domänen (LIM1-2) und ist im Cytosol sowie im Kern zu finden, während KyoT3 vor allem im Kern von Gehirnzellen auftritt.<sup>[114-115]</sup> FHL5 ist in Mäusen subzellulär im Nukleus von Hodenzellen zu finden und übernimmt hier die Transkriptionsaktivierung von CREM/CREB unter Einfluss von CBP (*CREB-binding protein*).<sup>[116]</sup>

### 1.4.2 FHL3 (*Four-and-a-Half-LIM domain protein 3*)

Wie bereits erwähnt, gehört das stark in Skelettmuskulatur exprimierte FHL3 (*Four-and-a-Half-LIM domain protein 3*), wie vier seiner bisher bekannten Subfamilienmitglieder (FHL1, FHL2, FHL4 und FHL5), zu einem Vertreter der LIM-Protein-Superfamilie. Humanes FHL3 hat eine molekulare Masse vom 31 kDa, setzt sich aus 280 Aminosäuren zusammen und ist zu 94% mit der Isoform aus der Maus (289 AS, 32 kDa) identisch. Ein Vergleich mit der aus der Sequenzierung von cDNA gewonnenen EST (*Expressed Sequence Tag*)-Sequenz von FHL3 zeigt, dass das FHL3-kodierende Gen zwischen den Positionen 1p34.2-p32.3 auf Chromosom 1 zu finden ist.<sup>[107, 117]</sup> Damit sitzt es zwischen den Allelen von *Congenial Ptosis* (PTOS1)<sup>[118]</sup> und vom *Schwartz-Jampel-Syndrome* (SJS)<sup>[119]</sup>, welche beide mit Myopathien (Muskelkrankungen) in Zusammenhang stehen. Die subzelluläre Lokalisation des FHL3-Proteins in Mäusemyoblasten beschränkt sich vor allem auf den Zellkern sowie Bereiche an der Zellmembran.<sup>[120]</sup> Letzteres schließt fokale Adhäsionen ein, was mit der Beobachtung, dass FHL3 durch Interaktion mit  $\alpha$ -Actinin regulatorisch auf Aktinbündelung einwirken kann, harmoniert.<sup>[105]</sup> Das vermehrte Auftreten im Nukleus ist konform mit der Beeinflussung von FHL3 auf Transkriptionsfaktoren wie CREB<sup>[110]</sup>, MZF1<sup>[121]</sup>, BLF3 und CtBP2<sup>[122]</sup>. Hinzu kommen Interaktionen mit Muskel-spezifischen Transkriptionsfaktoren. So hat sich beispielsweise herausgestellt, dass FHL3 als Regulator der MyoD-gesteuerten Transkription diese negativ beeinflussen kann und dadurch die Bildung von Myotuben während der Myogenese behindert.<sup>[123]</sup> Außerdem ist bekannt, dass sich resultierend aus der Rekrutierung von FHL3 durch den Transkriptionsfaktor Sox15 ein entsprechender Komplex formiert, der das Foxk1-Gene coaktiviert, was Einfluss auf die Regenerierung von Skelettmuskeln in myogenen Vorläuferzellen hat.<sup>[124]</sup> Die Grafik in Abb. 11, generiert mit der STRING-Datenbank (Version 9.0), gibt einen Überblick über die bisher veröffentlichten, bestätigten bzw. vermuteten Bindungspartner von FHL3.

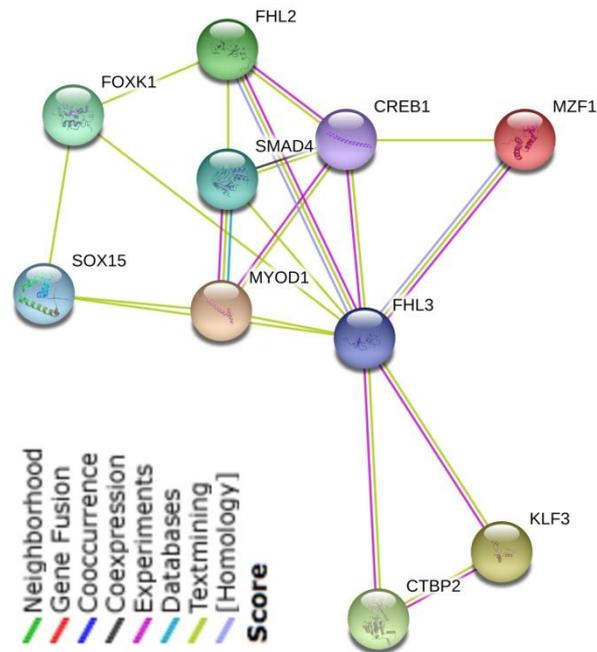


Abb. 11: Übersicht nachgewiesener und vorhergesagter FHL3-Interaktionspartner (STRING 9.0-Datenbank, <http://string-db.org/>)

Vor einigen Jahren wurde die CDC25B2-Phosphatase als weiterer Bindungspartner im Kern von Mäusemyoblasten entdeckt, wobei der Einfluss von FHL3 auf den G2-Zellzyklusregulator allerdings ungeklärt blieb.<sup>[125]</sup> Aus der Gesamtheit der aufgeführten Informationen lässt sich bislang ableiten, dass FHL3 spezifische Rollen bei der Myogenese und Umformung des Cytoskeletts sowie bei der Transkriptionsregulierung und dem Zellwachstum übernimmt. Außerhalb des Muskelzell-Kompartiments, also in anderen Gewebe bzw. Zelltypen, sind Hinweise über potentielle Bindungspartner und der Einfluss von FHL3 auf zelluläre Vorgänge spärlich dokumentiert. Die Tatsache, dass weder eine Vorhersage potentieller Interaktionspartner noch enzymatische Aktivitäten der FHL-Proteine nachweisbar sind, macht es schwierig sich einen entsprechenden Überblick über die Funktionalität von FHL3 innerhalb der Zelle zu verschaffen.

## 1.5 Protein-Pull-Downs

Durch Affinitäts-basierte Immobilisierung können gelöste Zielverbindungen mittels einer Festphasen-gekoppelten Köderverbindung gebunden und somit aus ihrer Ursprungslösung isoliert werden. Diese Methode kann zum einen dazu genutzt werden Proteine aufzureinigen (z.B. mit speziell getaggtten Proteinen nach der Proteinexpression in *E. coli*) und zum anderen kann sie zur Auskunft über die Wechselwirkungen zwischen den Interaktionspartnern genutzt werden. Die Festphasen bestehen aus kleinen Kügelchen (*beads*), die sich durch Zentrifugation oder Filtration von Inkubations- und Waschlösungen abtrennen lassen.

Bei Affinitätsuntersuchungen werden als Köder oftmals Proteine, Proteindomänen oder Peptide eingesetzt, wobei Veränderungen in der Proteinsequenz wie z.B. Austausch von einzelnen Aminosäuren (durch Mutation) oder Posttranslationale Modifikationen wie Acetylierungen,

Phosphorylierungen oder Methylierungen veränderte Affinitäten zur entsprechenden Vergleichsverbindung aufweisen können. Für Pull-Downs mit Peptiden als Köder hat es sich als nützlich erwiesen, eine kovalente Bindung zwischen Trägermaterial und Peptid herzustellen. Dies ist z.B. durch Verwendung vom SulfoLink-Kupplungsharz (Pierce) möglich. Dabei wird dem Peptid ein meist Sequenz-unabhängiges Cystein N- oder C-terminal zugefügt, welches in diesem Fall als reaktive Gruppe dient und durch Reaktion mit der Iodacetylgruppe der Festphase, in Form einer Agarosematrix, einen stabilen Thioether bilden kann (Abb. 12).

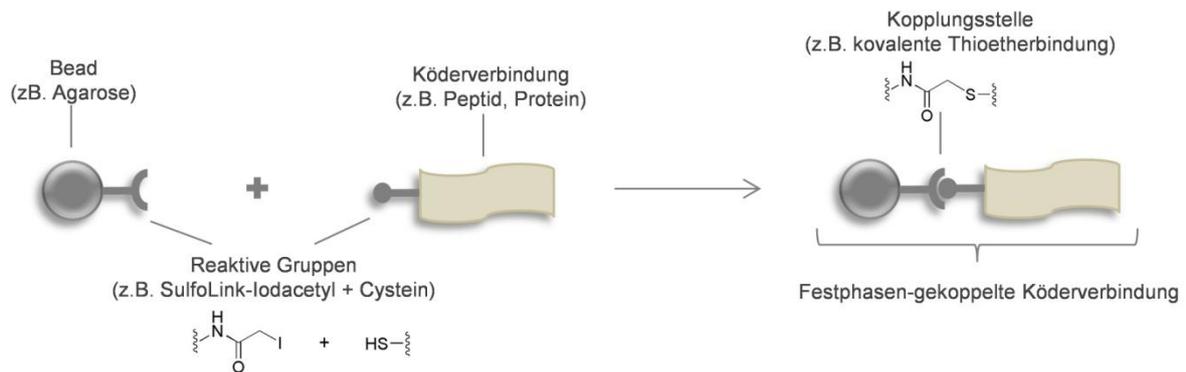


Abb. 12: Herstellung Festphasen-gekoppelter Köderverbindungen

Die SulfoLink-Methode kann potenziell bei vielen Peptiden angewendet werden, da die relative Häufigkeit von Cystein (1-2%) in natürlichen Proteinsequenzen gering ist. Als Alternative, z.B. bei Sequenzen die im vornerein ein oder mehrere Cysteine enthalten, können auch biotinylierte Peptide verwendet werden, die an Avidin- oder Streptavidin-Agarose ( $K_d = 10^{-14}$ - $10^{-16}$  mol/L)<sup>[126]</sup> mit nahezu kovalenten Charakter binden. Allerdings sind die Bindungskapazitäten hier etwas niedriger als bei einer vergleichbare Menge an SulfoLink-Material. Proteinköder lassen sich in Form von Fusionsproteinen durch eine relativ starke Protein/Substrat-Affinität an Festphasen kuppeln, so wie es z.B mit GST-Fusionsproteinen an Glutathion-Sepharose möglich ist.

Bei den Zielverbindungen handelt es sich oft um Proteine oder Proteinkomplexe, welche auch selektiv aus einer komplexen Lösung, wie z.B. einem Zellextrakt, isoliert werden können. Das Pull-Down („Runterzieh“)-Experiment besteht darin, dass auch die Zielverbindungen über die Köder an die Festphase gebunden werden und diese somit aus ihrer ursprünglichen Lösung abgetrennt werden können. Die Pull-Down-Methode wurde beispielsweise für die Identifikation von speziellen Histonmodifikations-registrierenden Proteinen schon erfolgreich genutzt und hat sich mittlerweile etabliert.<sup>[127]</sup>

In Abb. 13 ist beispielhaft der Vergleich zwischen zwei Pull-Downs gezeigt. Dabei wird als Festphasen-gekoppelte Köderverbindung ein Peptid ohne und mit Modifikation (hier Phosphorylierung) eingesetzt und diese jeweils mit der Proteinmischung inkubiert. In dem Schema wird deutlich, dass einerseits allein durch den Einfluss der Phosphorylierung Proteine oder Proteinkomplexe (schematisch dargestellt durch Protein 2) spezifisch an die modifizierte Peptidsequenz binden können und andererseits Bindungsaffinitäten von anderen Proteinen (Protein 1) erniedrigt werden.

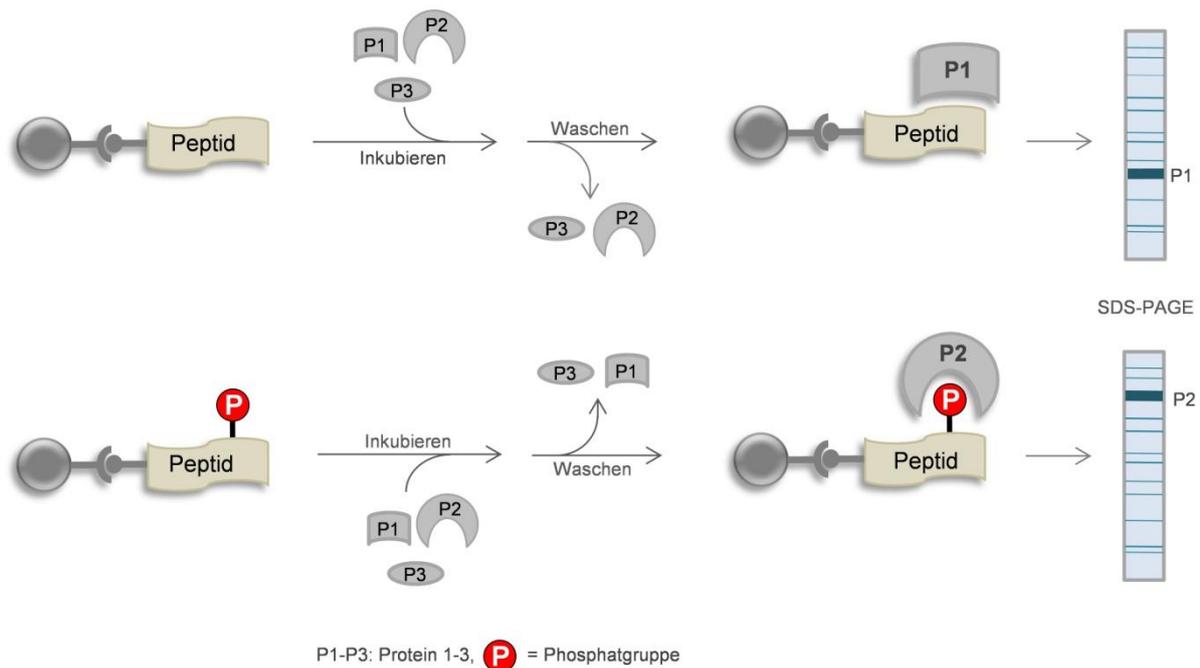


Abb. 13: Protein-Pull-Down mit unterschiedlich modifiziertem Peptid

Über solche Vergleiche können nicht nur Proteinwechselwirkungen aufgedeckt werden, sondern auch oft direkt Rückschlüsse auf die Funktion von Proteinen und Proteinkomplexen sowie von Proteindomänen oder Proteinmodifikationen gemacht werden.

## 1.6 Quantitative Proteomanalyse

Die Gesamtheit aller vorhandenen Proteine in einem Lebewesen, einer Zelle, einem Gewebe oder einem Zellkompartiment zu einem bestimmten Zeitpunkt und unter definierten Bedingungen, wird als Proteom bezeichnet. Das Proteom ist sozusagen eine Momentaufnahme einer dynamischen Zusammensetzung von Proteinen einer spezifischen Probe. Mit quantitativer Proteomanalyse ist es möglich, Aussagen über die Menge der einzelnen Proteine zu machen. Das ist besonders nützlich, wenn das Proteom beispielsweise von verschiedenen Zellzyklusstadien oder nach Einwirkung von äußeren Faktoren verglichen werden soll. Die Analysen multipler Veränderung auf Proteinebene können dazu genutzt werden Krankheitsbilder zu definieren. Dies kann für die Entwicklung von Therapien genutzt werden. In Kombination mit anderen biologischen Methoden besteht außerdem die Möglichkeit die Funktionalität von Proteinen oder Proteindomänen und ihrer posttranslationalen Modifikationen (PTM) zu bestimmen sowie ihre Interaktionspartner auffindig zu machen und somit komplexe Mechanismen aufzudecken und aufzuklären. Hierbei hat sich unterdessen die quantitative Massenspektrometrie (MS) gegenüber der 2D-Gelelektrophorese<sup>[128-129]</sup> als standardisierte Methode der Wahl für replizierbare Ergebnisse etabliert. Die Kopplung von automatisierter nano-HPLC, mit den mittlerweile sehr sensitiven und hochauflösenden Massenspektrometern in Kombination mit der Verwendung von stabilen Isotopen zur Proteinmarkierung, machen eine quantitative Analyse unter relativ einfachen experimentellen Bedingungen möglich. Der Einsatz von Isotopen ist dabei der

entscheidende Faktor, um von einer quantitativen Technik zu sprechen. Im Vergleich zu unmarkierten Proben können unterschiedlich Isotopen-markierte Proben zusammen kombiniert gemessen werden und somit spielt ungenügende Reproduzierbarkeit bei der Ionisierung keine Rolle mehr. Die Quantifizierung erfolgt hierbei auf Peptidebene, indem die Proteine vor der MS-Messung mit einer Protease gespalten werden. Die Markierung kann erst während der enzymatischen Hydrolyse durch Verwendung von  $\text{H}_2^{18}\text{O}$  ( $^{18}\text{O}$ -Methode<sup>[130-132]</sup>) oder *in vivo* durch den metabolischen Einbau von isotopenmarkierten Aminosäuren während der Zellkultivierung erfolgen. Die zuletzt erwähnte Methode wird als SILAC (*stable isotope labeling by amino acids in cell culture*)<sup>[133-134]</sup> bezeichnet und hat gegenüber der  $^{18}\text{O}$ -Methode den Vorteil einer höheren Nachweisempfindlichkeit.<sup>[135]</sup> Ein weiterer Vorzug von SILAC ist die Möglichkeit mehr als zwei Zustände direkt miteinander vergleichen zu können.<sup>[136]</sup> SILAC wird im folgenden Absatz genauer beschrieben.

### 1.6.1 SILAC

Das Prinzip von SILAC beruht auf der Kultivierung von Zellen in unterschiedlich Isotopen-markierten Medien. Der metabolische Einbau der Markierungen erfolgt dabei durch Zugabe definierter isotopenmarkierter Aminosäuren zum Kulturmedium, wobei diese von den Zellen in alle neu synthetisierten Proteine eingebaut werden. Nach einigen Zellzyklen sind die markierten Aminosäuren somit quantitativ ins Proteom eingefügt. Die unterschiedlich gelabelten Proben werden anschließend im 1:1 Verhältnis gemischt und nach Größenauftrennung im SDS-Gel durch ausgewählte Proteasen gespalten. Die entstandenen Peptide werden einer massenspektrometrischen Messung unterzogen; dabei wird für jedes Peptid ein Signalpaar mit spezifischem Massenunterschied erzeugt. Die Intensitäten des Signalpaars können verglichen werden und entsprechende Verhältnisse in Form von Anreicherungsfaktoren bestimmt werden. Über die eindeutige Zuordnung vom den Peptidsignalen zu den Proteinen über sogenannte *unique peptides* (UP) und dem Abgleich mit Proteindatenbanken können quantitative Aussagen zu Proteinmengen getroffen werden. Nachteilig ist, dass die Sequenzierungsergebnisse nur gegen eine Datenbank abgeglichen werden, was dazu führt, dass nicht annotierte Proteine nicht identifiziert und quantifiziert werden.

Allgemein können mehrere verschieden proteomische Zustände bzw. unterschiedlich gelabelte Proben untereinander verglichen werden. Die Möglichkeiten mehr als fünf verschieden Proben<sup>[136]</sup> herzustellen wird allerdings stark durch die Verfügbarkeit entsprechender isotopenmarkierter Aminosäuren limitiert. „Leichte“ und „schwere“ Aminosäuren sollten sich mindestens um vier Masseneinheiten (4 Da) unterscheiden, um eindeutig von den Signalen der natürlichen Isotopenverteilung unterschieden werden zu können. Am häufigsten werden die beiden essentiellen Aminosäuren Lysin und Arginin in Kombination mit der Protease Trypsin genutzt. Trypsin spaltet Proteine C-terminal nach Lysin und Arginin und somit werden Peptide erzeugt die idealerweise einfach markiert und leicht zuzuordnen sind. Die Quantifizierung der massenspektrometrischen Daten kann über die Auswertungssoftware MaxQuant<sup>[137-138]</sup> erfolgen. Das SILAC-Verfahren zur Untersuchung von unterschiedlichen proteomischen Zuständen wird im Abb. 14 schematisch dargestellt.

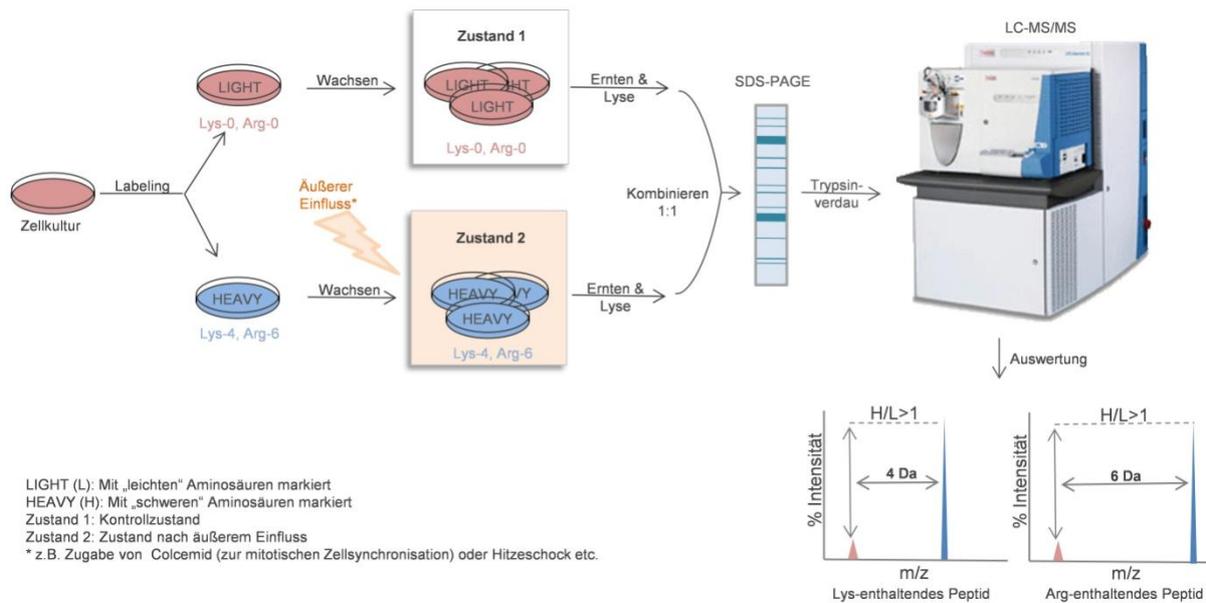


Abb. 14: SILAC-basierter Vergleich von unterschiedlichen proteomischen Zuständen

Die SILAC-Methode wurde mittlerweile auch an Mikroorganismen<sup>[139-140]</sup> und Pflanzen<sup>[141]</sup> durchgeführt. Am Mausmodell wurde außerdem gezeigt, dass es auch möglich ist, einen ganzen Organismus durch entsprechende Isotopen-Diät der quantitativen Proteomanalyse zugänglich zu machen.<sup>[142]</sup>

### 1.6.2 SILAC-Pull-Down

Die Kombination von Isotopen-markierungsabhängiger Massenspektrometrie, wie SILAC und der Pull-Down-Technik, liefert eine wertvolle Methode, um ein weites Spektrum an speziellen Wechselwirkungen zwischen Proteinen bzw. zwischen Peptiden und Proteinen in einem einzigen Experiment zu entdecken. Hierbei spiegeln die Zellextrakte den selben proteomischen Zustand wieder, sind aber unterschiedlich markiert. Bei dem Pull-Down werden zum größten Teil nur die Proteine und Proteinkomplexe aus dem proteomischen Zelllysate extrahiert und massenspektrometrisch analysiert, die an einen der spezifischen Köder binden. Die Zuordnung wird darüber gesteuert, dass jede Köderverbindung mit einem bestimmten markierten Extrakt kombiniert wird. In Abb. 15 dient der Vergleich zwischen einem unmodifizierten und einem phosphorylierten Peptidköder zur Anschauung der SILAC-Pull-Down-Methodik. Das unmodifizierte Köderpeptid wird mit *light*-(L)-Extrakt und das phosphorylierte Köderpeptid mit *heavy*-(H)-Extrakt inkubiert. Die Zuordnung der Signale und somit die Bestimmung über das Intensitätenverhältnis wird, wie zuvor beschrieben, über die Isotopen-Markierung getroffen. Im Beispiel zeigt das Peptid 2 einen deutlich erhöhten H/L-Verhältnis (20), d.h. das korrespondierende Protein 2 ist im direkten Vergleich am phosphorylierten Köderpeptid angereichert, während das dem Peptid 1 zugeordnete Protein 1 mit einem hohen L/H-Wert (10) spezifisch an das unmarkierte Köderprotein bindet. Man könnte der Phosphorylierung funktionell also nicht nur die Rekrutierung von Protein 2 zuordnen, sondern auch die Verdrängung oder das Unterbinden der Affinität von Protein 1 zum Köderpeptid.

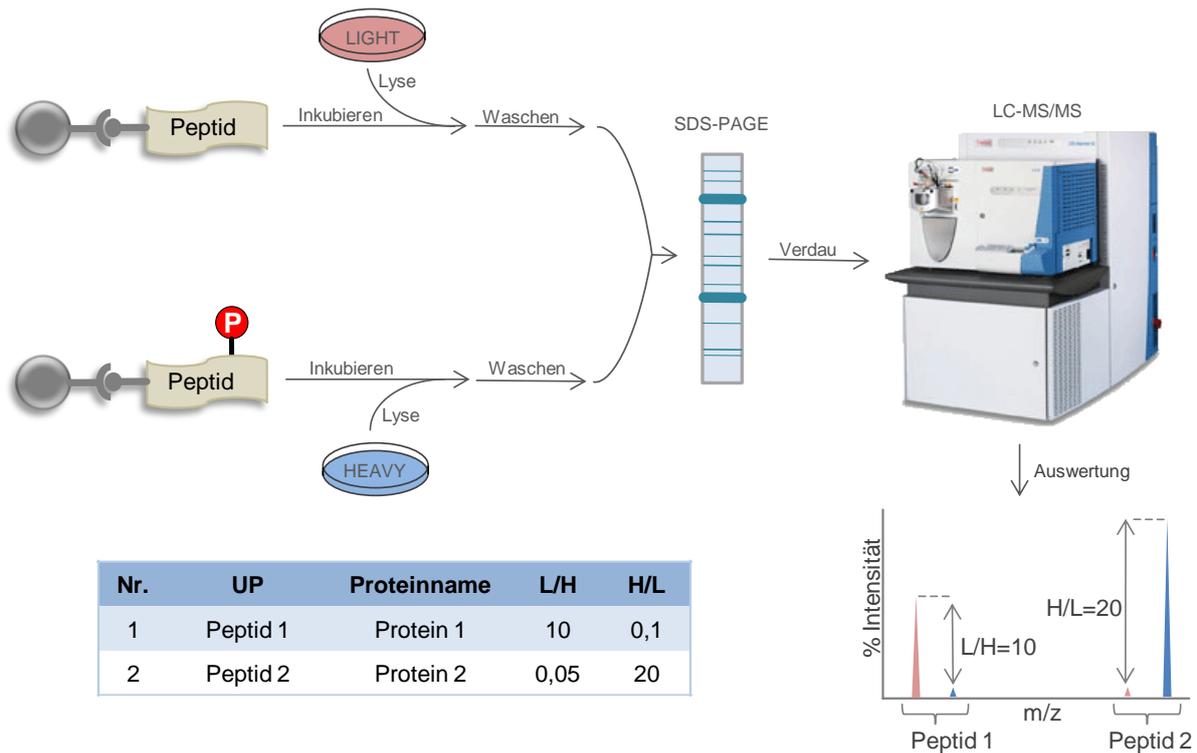


Abb. 15: Beispiel für einen SILAC-basierten Pull-Down

Aus einem einzigen SILAC-Pull-Down kann eine enorme Datenmenge resultieren, d.h. es können z.T. sehr viele Proteine mit besonderen Bindungsaffinitäten gefunden werden. Literaturrecherchen, Analogien der Proteine und bereits aufgeklärte Zusammenhänge zwischen den Proteinen helfen, spezifische Wechselwirkungen und Interaktionen auszumachen. Des Weiteren können die Bindungsaffinitäten durch weitere Detektionsformen (z.B. Western Blotting) verifiziert werden.

## 1.7 Aufgabenstellung

### 1.7.1 Aufgabenstellung: Projekt 1

In dieser Dissertation sollte die Funktion der Phosphorylierung des N-terminalen Tails von Histon H3 und ihr Einfluss bei der Erkennung durch Bindeproteine untersucht werden. Ein besonderer Fokus sollte dabei auf die Phosphorylierung von Serin-10 gelegt werden. Um dieses Ziel zu erreichen, sollten die Techniken der quantitativen Proteomanalyse und die Mittel der chemischen Biologie genutzt werden. Im Detail sollten die folgenden drei Gruppen von Proteinen analysiert werden:

1. Spezifische Bindeproteine, die durch die Phosphorylierung von Serin-10 an Histon H3 rekrutiert werden.
2. Spezifische Bindeproteine des unmodifizierten Histon H3, deren Rekrutierung durch die Phosphorylierung von Serin-10 in Histon H3 unterbunden wird.
3. Protein-Phosphatasen, die die Phosphorylierung von H3pS10 entfernen.

Für die letzte Klasse von Proteinen sollte untersucht werden, inwieweit das nicht hydrolysierbare Analogon von phosphorylierten Serin Phosphonomethylenalanin (Pma) als Bindestelle für Phosphatasen geeignet ist.

### 1.7.2 Aufgabenstellung: Projekt 2

In einem Projekt sollte das *Four-and-a-Half-LIM 3* (FHL3) Protein einer quantitativen Proteomanalyse unterzogen werden, um bisher unbekannte Interaktionspartner dieses Adapterproteins zu identifizieren und dadurch Hinweise auf die multiplen Funktionen des FHL3-Proteins zu bekommen.

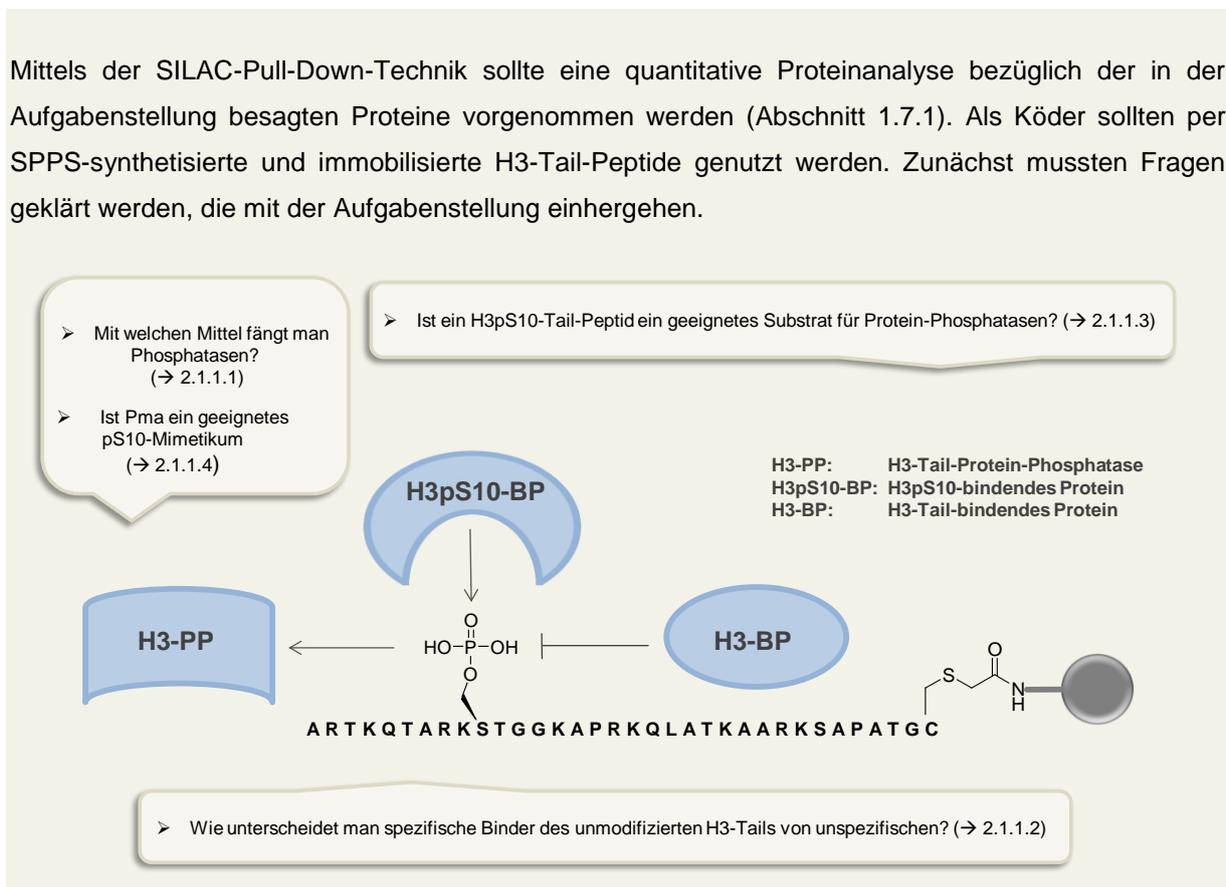


## 2 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

### 2.1 Projekt 1

#### 2.1.1 Strategie (Teil 1):

Mittels der SILAC-Pull-Down-Technik sollte eine quantitative Proteinanalyse bezüglich der in der Aufgabenstellung besagten Proteine vorgenommen werden (Abschnitt 1.7.1). Als Köder sollten per SPPS-synthetisierte und immobilisierte H3-Tail-Peptide genutzt werden. Zunächst mussten Fragen geklärt werden, die mit der Aufgabenstellung einhergehen.



#### 2.1.1.1 Darstellung von Fmoc-L-Phosphonomethylenalanin (Fmoc-L-Pma)

Die Untersuchung von phosphorylierungs-spezifischen Bindern des H3-Tails setzte voraus, dass die eingesetzten Köderpeptide, insbesondere die Phosphorylierungsmodifikation, im Umfang der proteomischen Umgebung stabil bleiben. In Abschnitt 1.3 wurde bereits beschrieben, dass sich die Fähigkeiten von Phosphonaten, wie u.a. von Pma oder Pfa, als Mimetika für Phosphoserin in vielen

verschiedenen Anwendungen bewährt haben. Diese Resultate, in Bezug auf enzymatische Stabilität und Affinität zu entsprechenden Bindeproteinen bzw. Bindedomänen, sollten auch hier ein geeigneter Ausgangspunkt sein und in dem Kontext von H3-Peptiden experimentell überprüft werden. Zusätzlich sollte durch den Einsatz von Pma das Kriterium erfüllt werden, auf Phosphataseinhibitoren zu verzichten und gleichsam die Möglichkeit gegeben sein, H3-Tail-spezifische Phosphatasen und korrespondierende regulatorische Untereinheiten ausfindig zu machen. Letztere Überlegung basiere auf Untersuchungen in denen Phosphonate erfolgreich als Inhibitoren für Serin/Threonin-Phosphatasen<sup>[143]</sup> eingesetzt wurden. Pma ist das Phosphonat-Mimetikum von phosphorylierten Serin und ist in der reinen L-Form kommerziell erhältlich. Auf die Synthese und Analyse des entsprechenden Fmoc-(Fluorenylmethoxycarbonyl)-Bausteins für die SPPS wird im Folgenden eingegangen.

Wie detailliert unter Abschnitt 4.2.5.1 beschrieben, wurde Fluorenylmethoxycarbonyl-L-Phosphonomethylenalanin (3) mit Hilfe eines Standardprotokolls<sup>[144]</sup> durch Reaktion von L-Phosphonomethylenalanin (2) mit N-(9-Fluorenylmethoxycarbonyl)succinimid (1) in einer wässrigen Natriumhydrogencarbonatlösung erfolgreich hergestellt (Abb. 16). Die Produktaufarbeitung erfolgte durch Extraktion mit Ethylacetat.

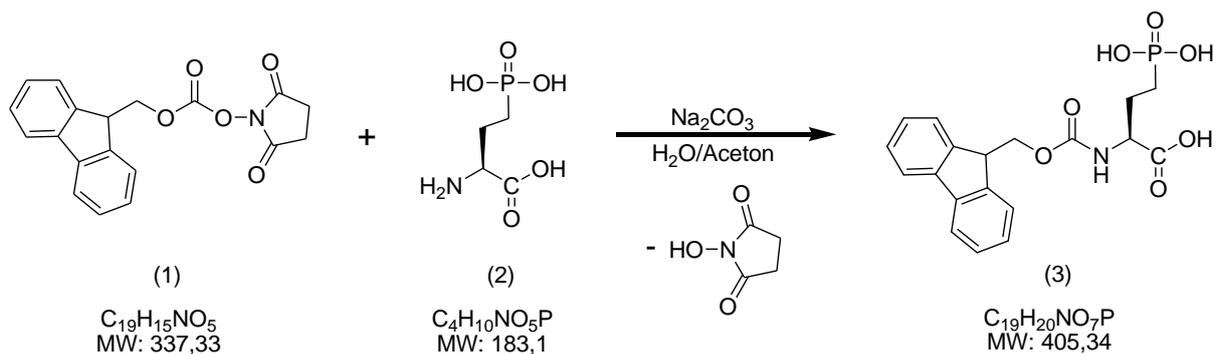


Abb. 16: Reaktionsgleichung zur Synthese von Fmoc-L-Pma

Die HPLC- und ESI-MS-Daten in Abb. 17 belegten den hohen Reinheitsgrad des Produktes (3). Die Signale des Eduktes sind vernachlässigbar klein.

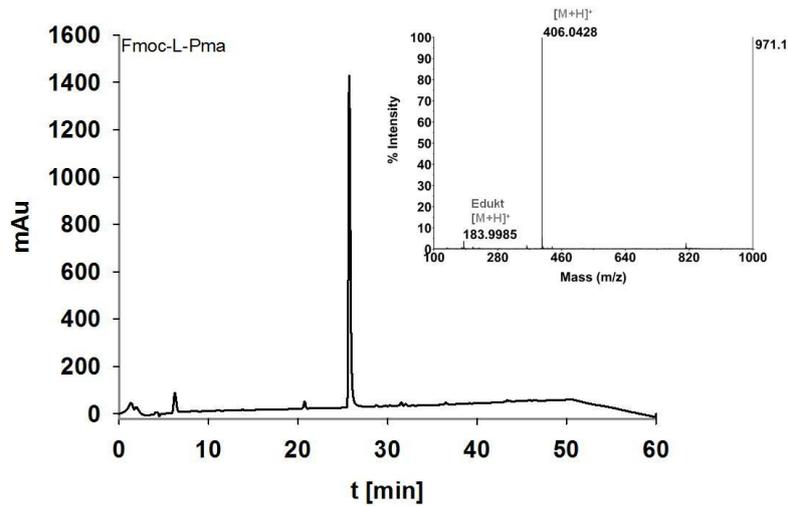


Abb. 17: HPLC-Chromatogramm und ESI-MS-Spektrum von Fmoc-L-Pma

$^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren bestätigten die Identität der Verbindung. Im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum (Abb. 18) konnten alle Kohlenstoff-gebundenen Protonen (1-9) zugeordnet werden. Die  $\text{CH}_2$ -Gruppen der Seitenkette (1 und 2) bei 1,8-2,2 ppm sind deutlich hochfeldverschoben, während die aromatischen Protonen der Fmoc-Gruppe (6-9) charakteristisch mit 7,3-7,9 ppm tieffeldverschoben sind. Die übrigen 4 Protonen (3-5) fallen hier auf ein Signal bei 4,3 ppm zusammen, was zu einem Pseudo-Singulett-Signal führt, hinter dem sich ein Multiplett verbirgt. Die Identität des breiten Signals bei 7 ppm ist unklar, kann aber aufgrund der anderen analytischen Daten als Verunreinigung der NMR-Probe gewertet werden. Das Produkt wurde in einer isolierten Ausbeute von 48% erhalten, was bei der gewählten Ansatzgröße von 220  $\mu\text{mol}$  41 mg entsprach.

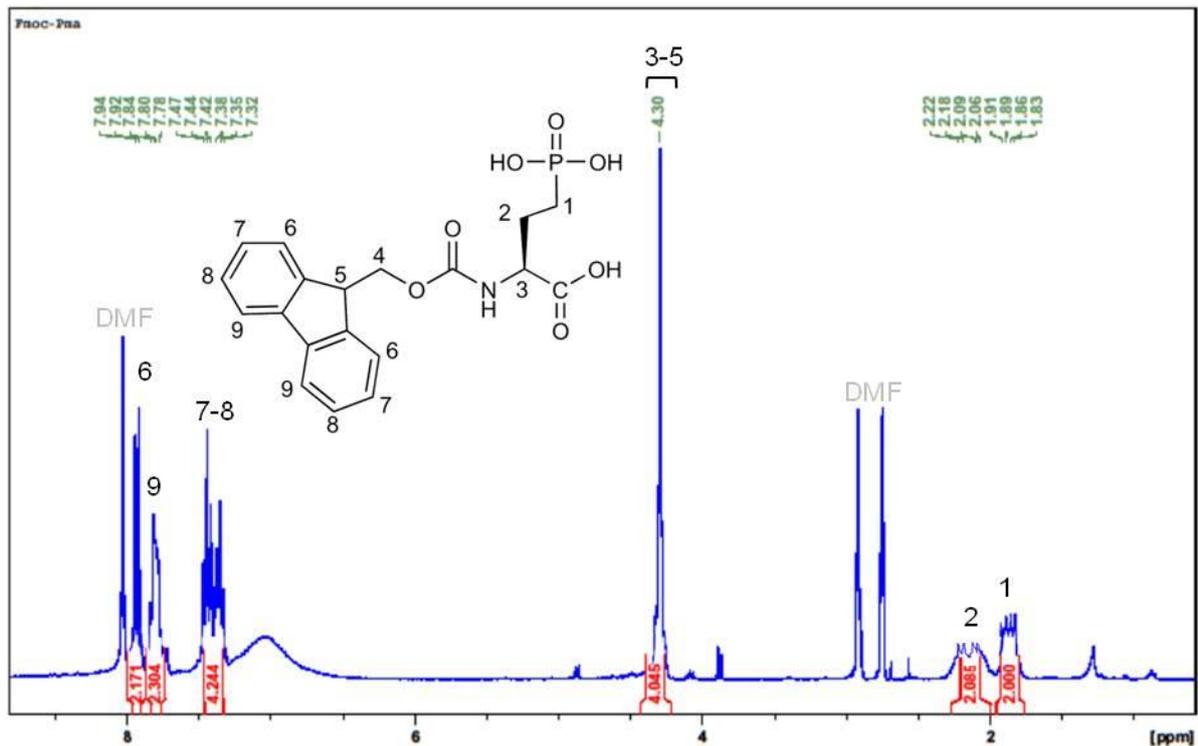


Abb. 18:  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Fmoc-L-Pma

Im  $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum konnten alle C-Atome identifiziert werden. Das  $^{13}\text{C-DEPT}$ -Spektrums nützte dabei im direkten Vergleich um quartäre C-Atome zu erkennen (kein Signal im DEPT-Spektrum) und CH-Gruppen (positives Signal im DEPT-Spektrum) von  $\text{CH}_2$ -Gruppen (negatives Signal im DEPT-Spektrum) zu unterscheiden. Die genaue Zuordnung lässt sich aus Abb. 19 und Abb. 20 entnehmen.

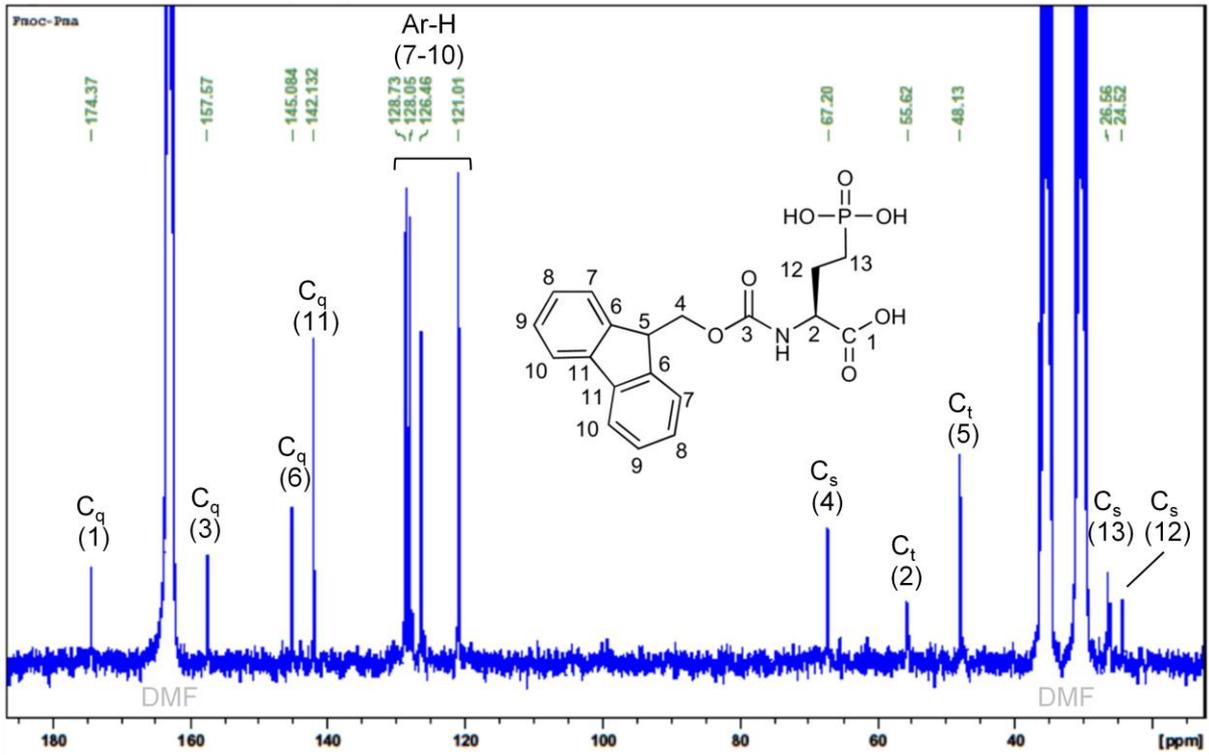


Abb. 19: <sup>13</sup>C-NMR-Spektrum von Fmoc-L-Pma

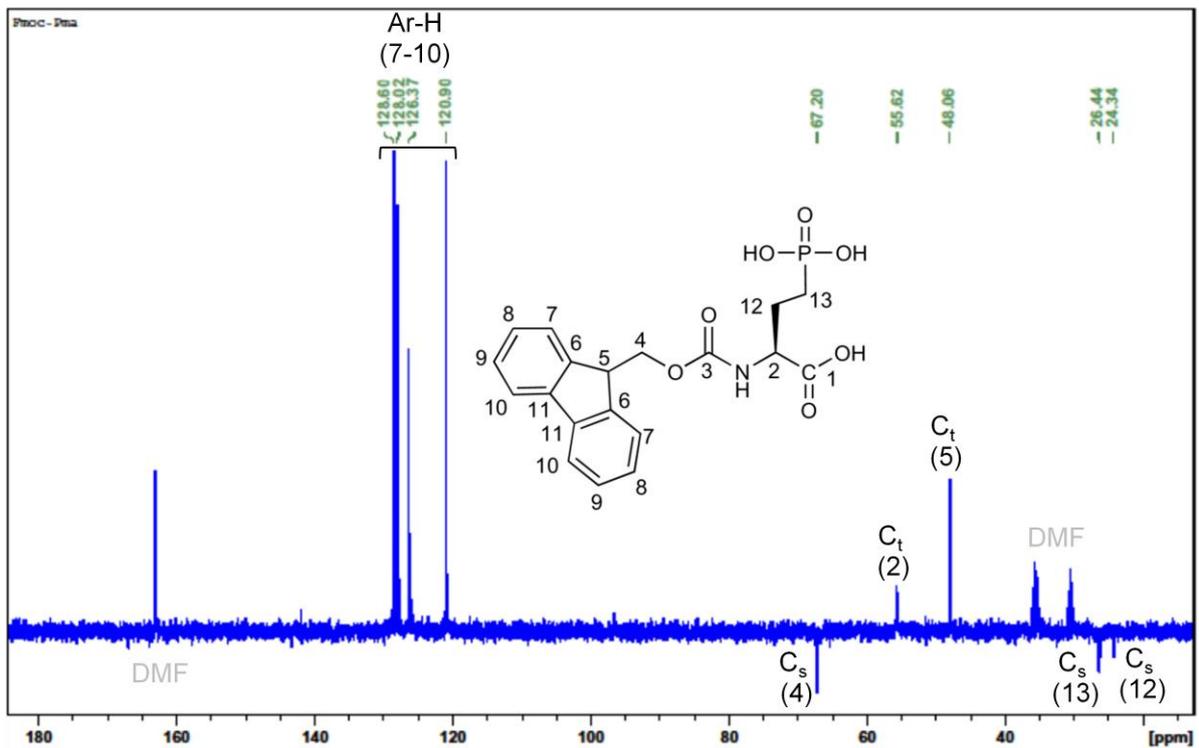


Abb. 20: <sup>13</sup>C-DEPT-NMR-Spektrum von Fmoc-L-Pma

### 2.1.1.2 Design, Synthese und Immobilisierung der H3-Tail-Peptide

Nach der Synthese von Fmoc-L-Pma konnte mit der Synthese der benötigten Peptide begonnen werden. Für den SILAC-Pull-Down sind sowohl ein immobilisierbares H3-Tail-Peptid, dass über Pma an Position 10 verfügt und somit als Köder für pSer-spezifische Bindeproteine und potentiell Phosphatasen dienen könnte, als auch ein unmodifiziertes H3-Tail-Peptid als Kontrolle notwendig. Um spezifische Bindeproteine vom unmodifizierten H3-Tail zu identifizieren, die durch die Phosphorylierung von Serin-10 unterdrückt werden, stellte sich ein weiteres Problem: Durch die stark positive Ladung des H3-Tails könnten viele Proteine unspezifisch gebunden werden. Durch das Einfügen von Pma wird die positive Ladung des H3-Tails partiell neutralisiert und somit wäre es schwierig, zwischen spezifischen und unspezifischen H3-Bindeproteinen zu unterscheiden, die durch die Phosphorylierung von Serin-10 unterdrückt werden. Um dennoch zwischen spezifischen und unspezifischen Bindeproteinen des unmodifizierten H3-Tail zu unterscheiden, sollte ein weiteres Kontroll-Peptid, bestehend aus D-Aminosäuren, eingesetzt werden. Dieses weist dieselbe Peptidsequenz wie ein L-H3-Tail auf und besitzt damit auch eine exakt identische Ladungsverteilung. Lediglich durch den stereochemischen Aufbau unterscheidet es sich vom L-H3-Tail-Peptid und sollte somit nicht von spezifischen H3-Bindern erkannt werden. Des Weiteren wurden H3-Tail-Peptide mit phosphorylierten Serin-10 synthetisiert, um die Wechselwirkung zwischen pS10 und Pma zu vergleichen und die Erkennung von pSer10 durch Phosphatasen zu untersuchen. Abschließend war geplant die Wechselwirkungen von identifizierten Bindeproteinen vom unmodifizierten H3-Tail auf den Einfluss anderer bekannter Phosphorylierungsstellen von Histon H3 zu untersuchen. Eine Liste aller synthetisierten H3-Tail-Peptide befindet sich in Tab. 3.

Bezeichnung	Peptidsequenz
H3tailpS10	A R T K Q T A R K <b>pS</b> T G G K A P R K Q L A T K A A R K S A P A T G K
D-H3tailCys	A R T K Q T A R K S T G G K A P R K Q L A T K A A R K S A P A T G C
H3tailCys	A R T K Q T A R K S T G G K A P R K Q L A T K A A R K S A P A T G C
H3tailPma10Cys	A R T K Q T A R K <b>Pma</b> S T G G K A P R K Q L A T K A A R K S A P A T G C
H3tailpS10Cys	A R T K Q T A R K <b>pS</b> T G G K A P R K Q L A T K A A R K S A P A T G C
H3tailpT3Cys	A R <b>pT</b> K Q T A R K S T G G K A P R K Q L A T K A A R K S A P A T G C
H3tailpT6Cys	A R T K Q <b>pT</b> A R K S T G G K A P R K Q L A T K A A R K S A P A T G C
H3tailpT11Cys	A R T K Q T A R K S <b>pT</b> G G K A P R K Q L A T K A A R K S A P A T G C
H3tailpS28Cys	A R T K Q T A R K S T G G K A P R K Q L A T K A A R K <b>pS</b> A P A T G C

Tab. 3: Übersicht der mittels SPPS-hergestellten H3-Tail-Peptide und Peptidsequenzen<sup>1</sup>

Als wichtiger Bestandteil für den Erfolg der H3-Tail-Peptidsynthese mit Hilfe der Fmoc-Strategie stellte sich der Einbau von Fmoc-Dipeptidbausteine in Form von Pseudoprolinen (4, „ $\psi$ -Me, Mepro“) oder Fmoc-Gly-N- $\alpha$ -(Dmb)Gly-OH (5) heraus (Abb. 21).<sup>[145-147]</sup>

<sup>1</sup> Zur Differenzierung von L- und D-Aminosäuren werden die letzteren hier und im weiteren Verlauf in einem Grauton dargestellt.

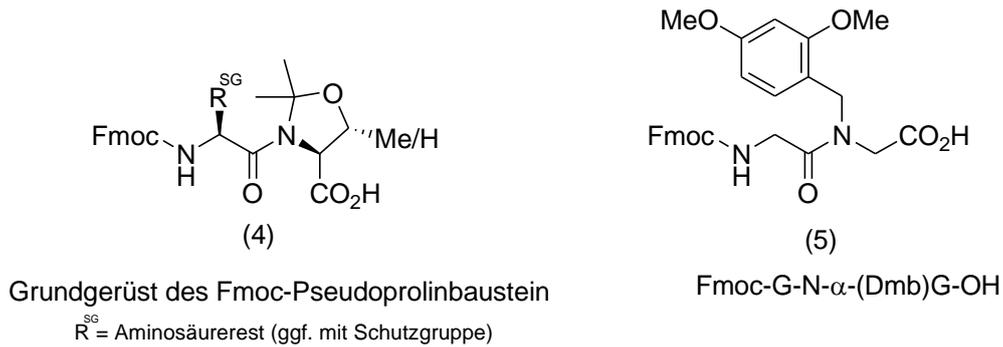


Abb. 21: Fmoc-Pseudoprolin-Grundgerüst (9) und Fmoc-G- N-α-(Dmb)G-OH (10)

Diese wurden an unterschiedlichen Stellen (siehe auch Tab. 18) zur Hemmung von Aggregationen eingebaut, die vormals zur Bildung von Nebenprodukten geführt hatten. Die Unterdrückung sekundärer Strukturen zwischen den wachsenden Peptidsträngen an der Festphase erfolgte durch Störung der linearen Anordnung durch den Einbau eines „Knicks“ (Pseudoprolinbaustein) oder durch sterische Behinderung mittels 2,4-Dimethoxybenzylgruppe am α-Stickstoff des C-terminalen Glycins von Fmoc-G-N-α-(Dmb)G-OH (5). Die Pseudoprolinstrukturen der Fmoc-Dipeptidbausteine resultieren aus einem C-terminalen 2,2-Dimethyl-Oxazolidinring, der unter TFA-Standartabspaltungsbedingungen in ein Threonin bzw. Serin umgewandelt wird (Abb. 22). Der Dipeptid-Einbau beschränkte sich somit auf die X-S/T-Sequenzstellen (X = K, Q oder A) im den H3-Tail-Peptiden.

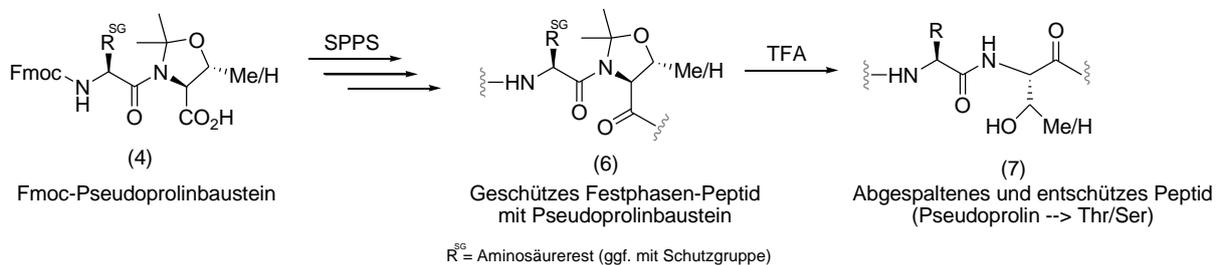


Abb. 22: SPPS-Einbau eines Pseudoprolin-Dipeptidbausteins in ein Peptid

Durch den Einsatz der Dipeptidbausteine konnte eine deutliche Minderung an Nebenprodukten erreicht werden, die bei vorherigen Synthesen ohne diese Bausteine beobachtet wurden.

Die Sequenz des D-H3-Tails wurde aus entsprechenden Fmoc-D-Aminosäuren aufgebaut. Da D-Pseudoprolin nicht kommerziell erhältlich sind, wurde zwecks Aggregationsunterdrückung ein L-Pseudoprolin Fmoc-Ala-Thr(ψMe, Mepro)-OH und ein ähnlich wirkendes N-α-Fmoc-N-α-(2, 4-dimethoxybenzyl)-glycin bei der Synthese verwendet. Die Peptide, die für die Pull-Down-Versuche bestimmt waren, wurden mit einem C-terminalen Cystein hergestellt. Das Cystein konnte später als reaktive Kupplungsgruppe genutzt werden, um eine Immobilisierung an SulfoLink-Agarose zu erreichen. Nach Abspaltung von der Festphase konnten die Rohpeptide insgesamt in guten Ausbeuten (76-99%) erhalten werden (Tab. 4).

Bezeichnung	Kurzbezeichnung	Synthesemaßstab (µM)	Masse (mg)	Menge (µM)	Ausbeute der Rohpeptide (%)
H3tailpS10	-	50	140	39	78
D-H3tailCys	D	25	73	21	83
H3tailCys	H3	25	86	24	99
H3tailPma10Cys	Pma10	25	76	21	85
H3tailpS10Cys	pS10	25	87	24	98
H3tailpT3Cys	pT3	25	88	24	98
H3tailpT6Cys	pT6	25	69	19	76
H3tailpT11Cys	pT11	25	88	24	98
H3tailpS28Cys	pS28	25	79	22	88

Tab. 4: Ausbeute-Übersicht der H3-Tail-Rohpeptide

Die Rohpeptide wurden nach Bedarf portionsweise über semipräparative oder präparative HPLC-Säule gereinigt, wobei eine isolierte Ausbeute zwischen 12-20 mg (13-23%) je nach Peptid erhalten wurde. Die Peptide zeichneten sich, belegt durch analytische HPLC-Chromatogramme und ESI-Massenspektren, durch hohe Reinheiten aus (siehe folgende Abbildungen).

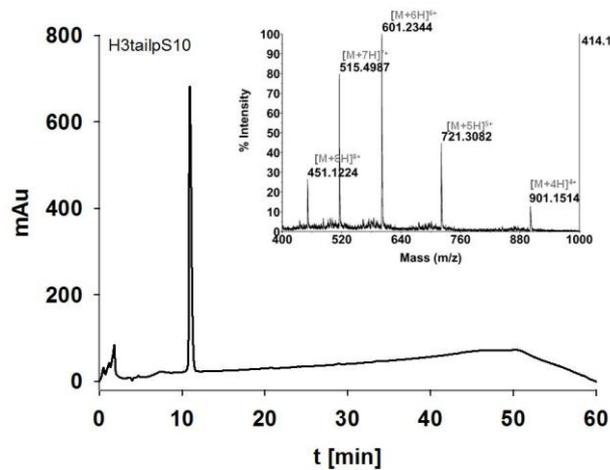


Abb. 23: HPLC-Chromatogramm und ESI-MS-Spektrum von H3tailpS10

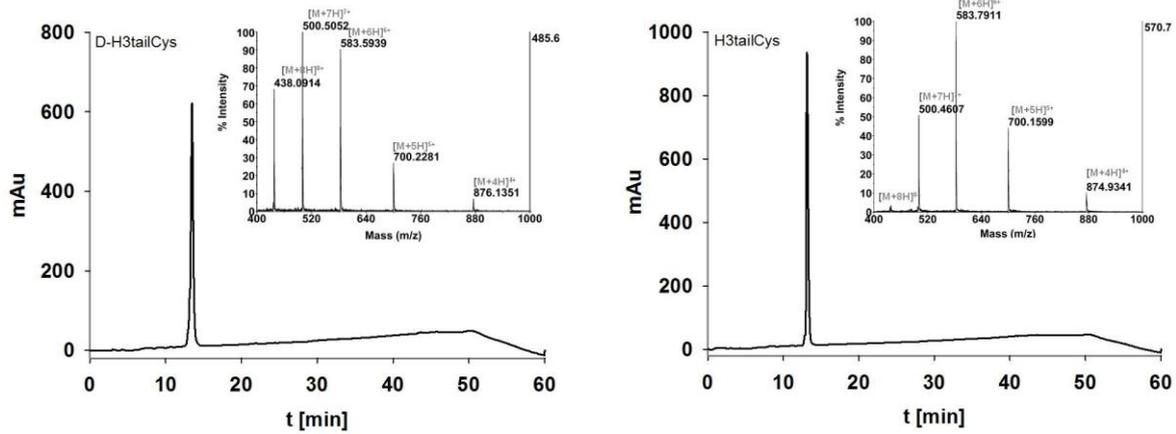


Abb. 24 :: HPLC-Chromatogramm und ESI-MS-Spektrum von D-H3tailCys (l.) und H3tailCys (r.)

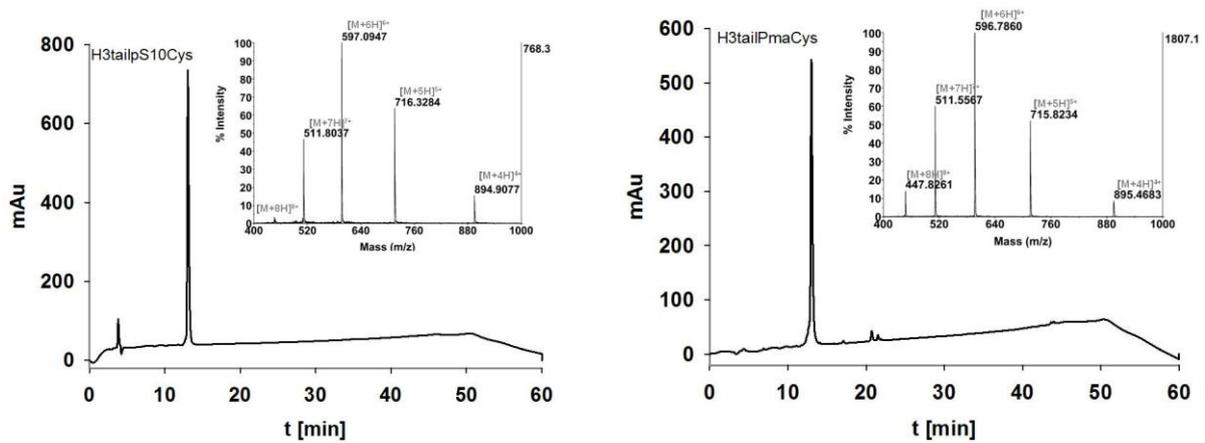


Abb. 25: HPLC-Chromatogramm und ESI-MS-Spektrum von H3tailpS10Cys (l.) und H3tailPmaCys (r.)

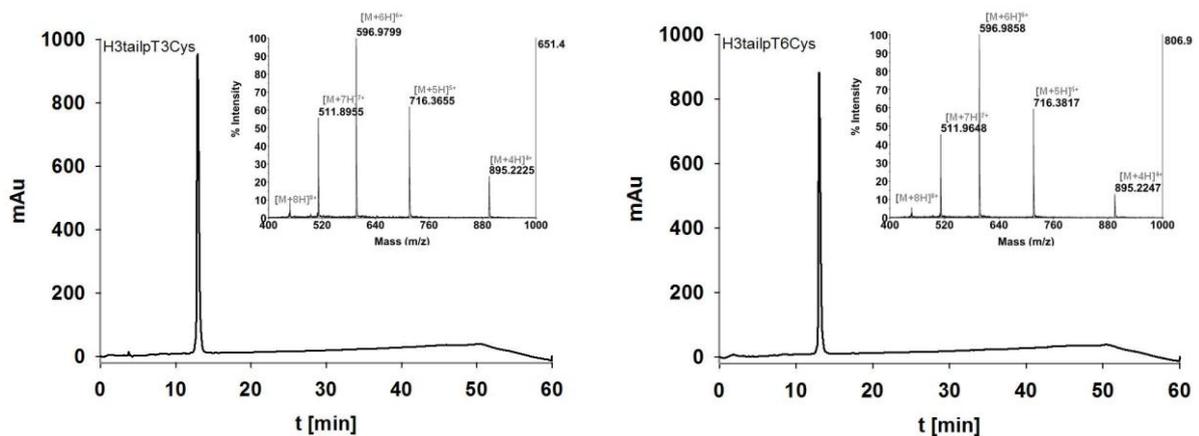


Abb. 26: HPLC-Chromatogramm und ESI-MS-Spektrum von H3tailpT3Cys (l.) und H3tailpT6Cys (r.)

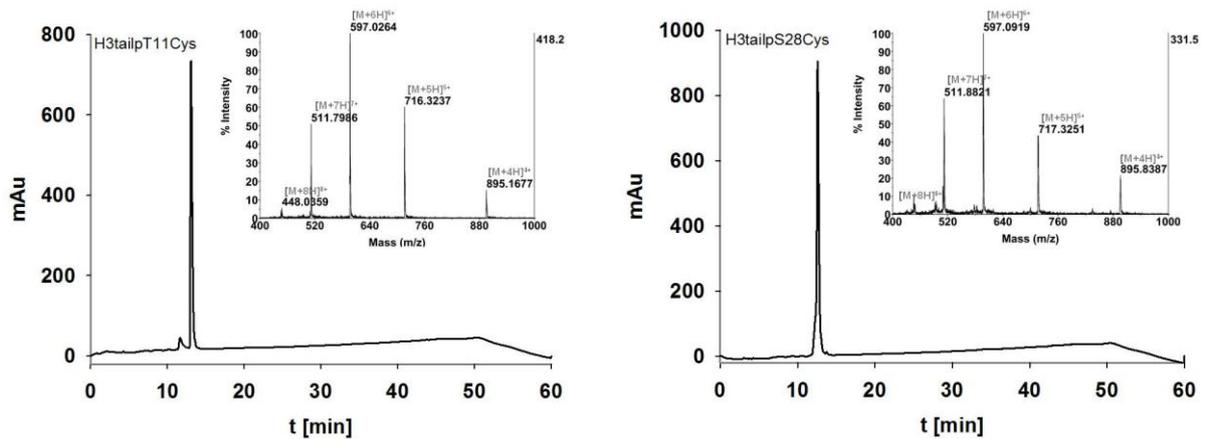


Abb. 27: HPLC-Chromatogramm und ESI-MS-Spektrum von H3tailpT11Cys (l.) und H3tailpS28Cys (r.)

Die Immobilisierung der H3-Tail-Peptide mit C-terminalen Cystein an die Agarosebeads erfolgte über Reaktion mit der Iodacetylgruppe des SulfoLink-Agarosematerials (siehe Abb. 12). Die Bead-Beladung wurde per Aminosäureanalyse von der Firma Genaxxon bestätigt. Die Beladung der Peptide lag zwischen 19-21 nmol/mg trockener Matrix. Zu Analyse dienten D-H3tailCys, H3tailCys, H3tailPmaCys und H3tailpS10Cys - beladene Festphasen. Da aus 80  $\mu$ L 50%iger Matrixsuspension ca. 1 mg getrocknete Probe resultierte, ergab sich für ein 20  $\mu$ L Pull-Down-Aliquot Peptid-beladene Matrixsuspension eine Beladung von ca. 5 nmol.

### 2.1.1.3 Phosphatase-Aktivitätstests

Um herauszufinden, ob ein synthetisch hergestelltes H3pS10-Peptid von 34 Aminosäuren-Länge ein geeignetes Protein-Phosphatase-Substrat darstellt, wurde mittels Klonierungsverfahren PP1 $\alpha$  rekombinant hergestellt (siehe Abschnitt 4.3.6, 4.4.1 und 4.4.2). In Abb. 28 a ist die in *E. coli* exprimierte und anschließend aufgereinigte PP1 $\alpha$ -Bande (38 kDa) im SDS-Gel, angefärbt durch Coomassie, zu sehen. Diese Phosphatase ist eine der Isoformen aus der Phosphatase PP1-Familie (siehe Abschnitt 1.2.3) und somit geeigneter Kandidat, um ein H3pS10-Peptid spezifisch zu binden und zu dephosphorylieren. Nach Aufreinigung der Protein-Phosphatase 1  $\alpha$  wurde die enzymatische Aktivität mittels des pNPP-Assays bestätigt. In diesem Assay wurde die Hydrolyse des Substrats *para*-Nitrophenylphosphat (pNPP, 8) direkt durch die Entstehung von *para*-Nitrophenolat (pNP, 9), spektroskopisch, durch Messung bei 405 nm, verfolgt (Abb. 28 b).

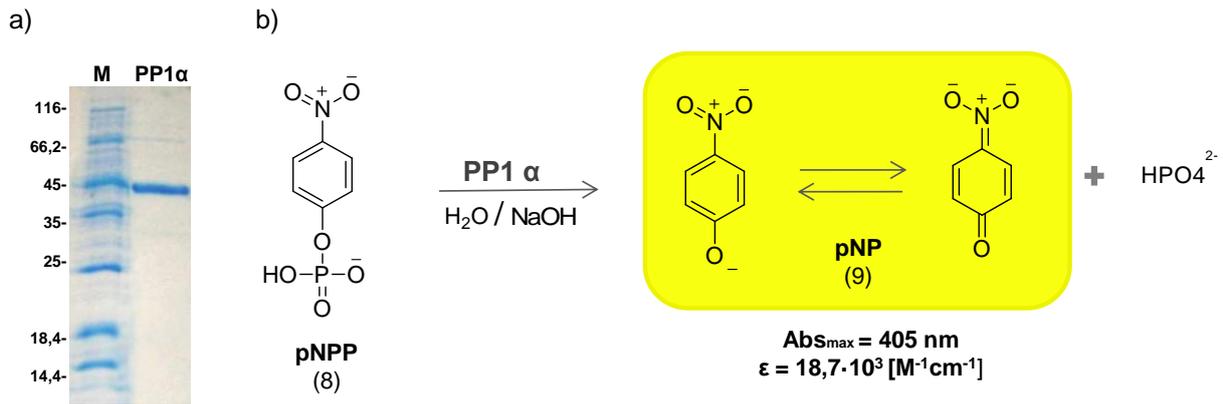


Abb. 28: a) SDS-Gel: rekombinante PP1α b) Reaktionsgleichung des pNPP-Assays mit PP1α

Für die Ermittlung enzymkinetischer Daten wurde die Reaktion wie folgt durchgeführt: Unter dem Einsatz von fünf verschiedenen Substratkonzentrationen zwischen 1-50 mM wurden mittels Absorptionsmessung bei 405 nm die Anfangsgeschwindigkeiten ( $v_0$ ) der Reaktionen bei gleichbleibender Enzymkonzentration ( $[E]_0 = 1,32 \mu\text{M}$ ) bestimmt. Aus der Auftragung der Produktkonzentration (pNP [mM]) gegen die Zeit ergab sich ein linearer Anstieg (Abb. 29) aus dem die  $v_0$ -Werte resultierten (Tabelle in Abb. 30).

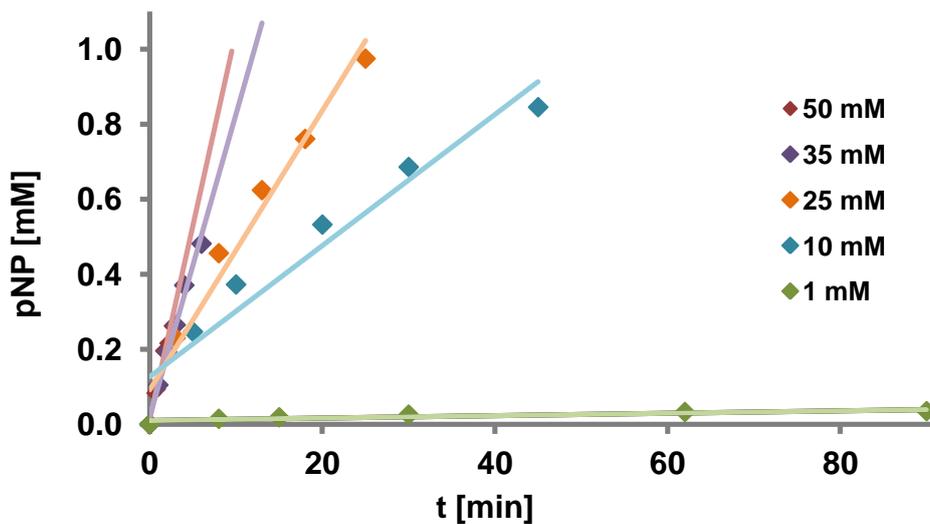


Abb. 29: Anfangsgeschwindigkeitsbestimmung der Dephosphorylierung von pNPP durch PP1α<sup>2</sup>

Aus der Auftragung der Anfangsgeschwindigkeit gegen die Substratkonzentration ergab sich ebenfalls ein linearer Zusammenhang (Abb. 30), so dass  $v_{\text{max}}$  nicht ermittelbar war, aber dafür  $v_{\text{max}}/K_M$  mit  $3,7 \cdot 10^{-5} [\text{s}^{-1}]$  bestimmt werden konnte. Durch  $[E]_0 = 1,32 \mu\text{M}$  ergab sich eine katalytische Effizienz von  $k_{\text{kat}}/K_M = 28 [\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}]$ .<sup>3</sup>

<sup>2</sup> Interpolation von Trendlinien dient lediglich zur Anschauung

<sup>3</sup> berechnet mit  $k_{\text{kat}} = \frac{v_{\text{max}}}{[E]_T}$ , unter Annahme, dass  $K_M \gg [S]$  und somit  $[E]_T \approx [E]_0$  (bei linearem Zusammenhang von  $v$  und  $[S]$ )

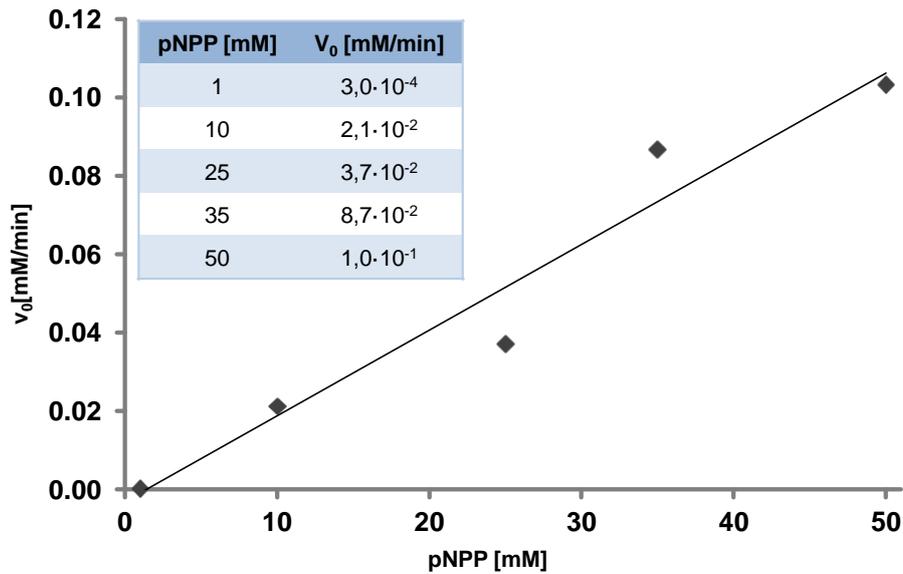


Abb. 30: Auftragung der Anfangsgeschwindigkeiten gegen die Substratkonzentration (pNPP) Die Daten wurden einer linearen Regressionsanalyse mit Sigmaplot unterzogen.

Damit konnte gezeigt werden, dass die rekombinant hergestellte Protein-Phosphatase 1  $\alpha$  in einer aktiven Form vorliegt. Der  $k_{\text{kat}}/K_M$ -Wert für dieses unphysiologische Substrat (pNPP) ist im Vergleich zu natürlichen Enzymsubstraten im Allgemeinen ( $\sim 10^5$ - $10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ )<sup>[4]</sup> den Erwartungen entsprechend deutlich niedriger.

Um die Dephosphorylierungsreaktion eines H3tailpS10-Peptids (Aminosäuren: 1-34) durch PP1 $\alpha$  verfolgen zu können, wurde ein spektrophotometrischer Assay genutzt, mit dem es möglich war, anorganisches Phosphat direkt in der Reaktionslösung quantitativ und begleitend zum Reaktionsverlauf zu bestimmen (EnzChek-Phosphat-Assay, Molecular Probes). Dabei wurde unter simultanen Einsatz des Enzyms Purin-Nukleosid-Phosphorylase (PNP) das Substrat MESG (2-Amino-6-Mercapto-7-Methylurin-Ribose (10)) enzymatisch mit dem entstandenen Phosphat phosphoryliert. Neben Ribose1-Phosphat (11) entsteht dabei auch 2-Amino-6-Mercapto-7-methyl-Purin (12), das mit 360 nm ein Absorptionsmaximum aufweist, welches, verglichen mit der Ausgangsverbindung (10), in den längerwelligen Bereich verschoben ist (Abb. 31).

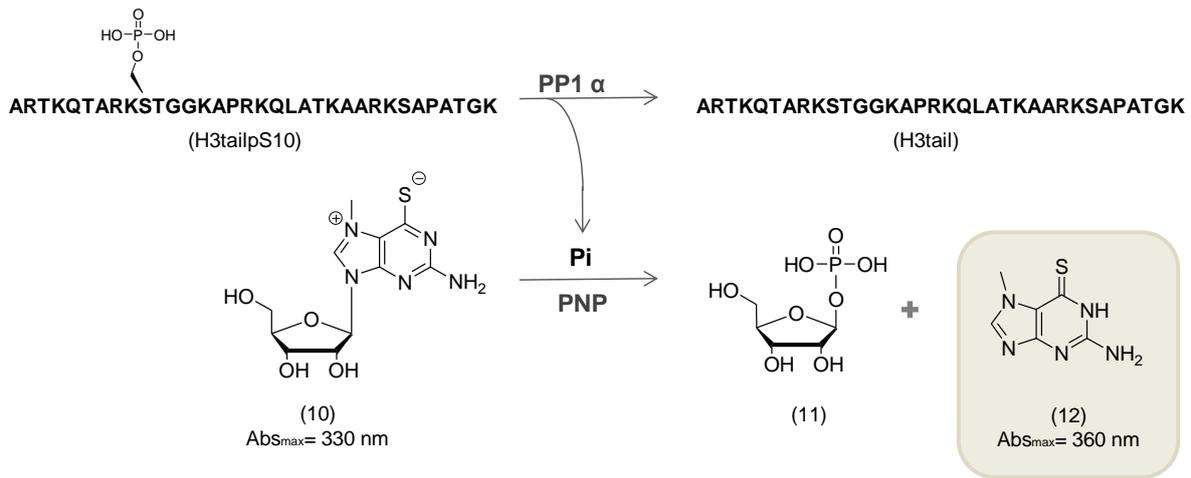


Abb. 31: EnzChek-Phosphatase-Assay gekoppelt mit Dephosphorylierung von H3tailpS10 durch PP1 $\alpha$

Der Bezug zwischen spektrophotometrischer Messung bei 360 nm und Phosphatgehalt konnte durch Anwendung einer Kalibriergeraden hergestellt werden (siehe auch Abb. 79). Der Phosphatgehalt war wiederum direkt proportional zum dephosphorylierten peptidischen Substrat (H3tail) der Phosphatase.

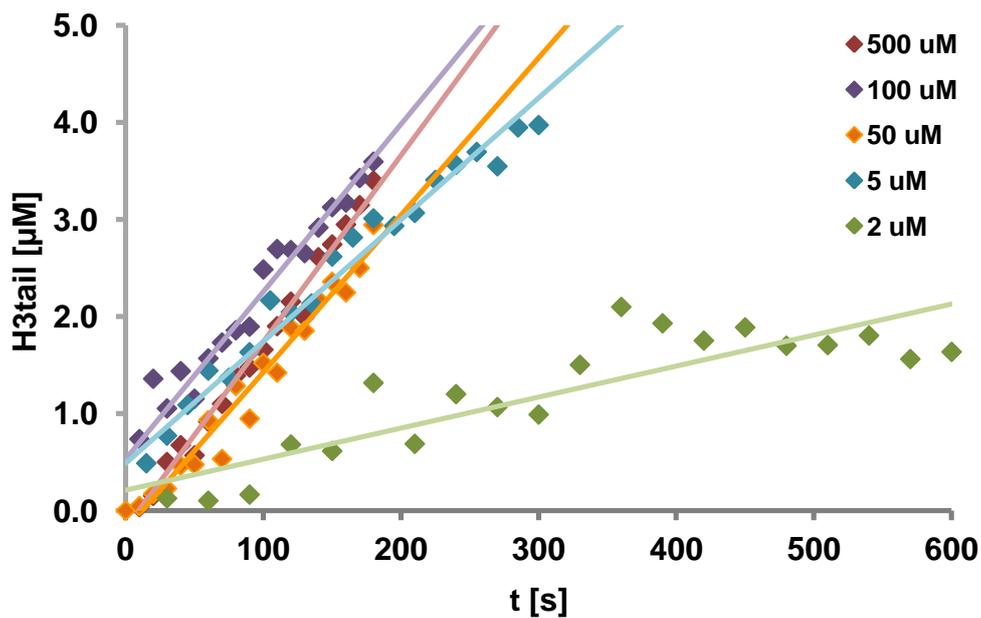


Abb. 32: Anfangsgeschwindigkeitsbestimmung der Dephosphorylierung von H3tailpS10 durch PP1 $\alpha$ <sup>4</sup>

Für die Charakterisierung wurde bei einer konstanten Enzymkonzentration ( $[\text{PP1}\alpha]_0 = 6,6 \cdot 10^{-8} \text{ M}$ ) die H3tailpS10-Konzentration von 2  $\mu\text{M}$  bis 500  $\mu\text{M}$  variiert (siehe Abb. 32). Es wurde sichergestellt, dass die Dephosphorylierung des H3tailpS10-Peptides der geschwindigkeitsbestimmende Schritt des Assays war (siehe auch Abschnitt 4.4.4.1). Aus der Auftragung von Anfangsgeschwindigkeiten gegen die Substratkonzentration resultiert eine rechteckige Hyperbel, die der Grundgleichung der Enzymkinetik (Michaelis-Menten-Gleichung) zugrundegelegt werden konnte (siehe in Abb. 33).

<sup>4</sup> Interpolation von Trendlinien dient lediglich zur Anschauung

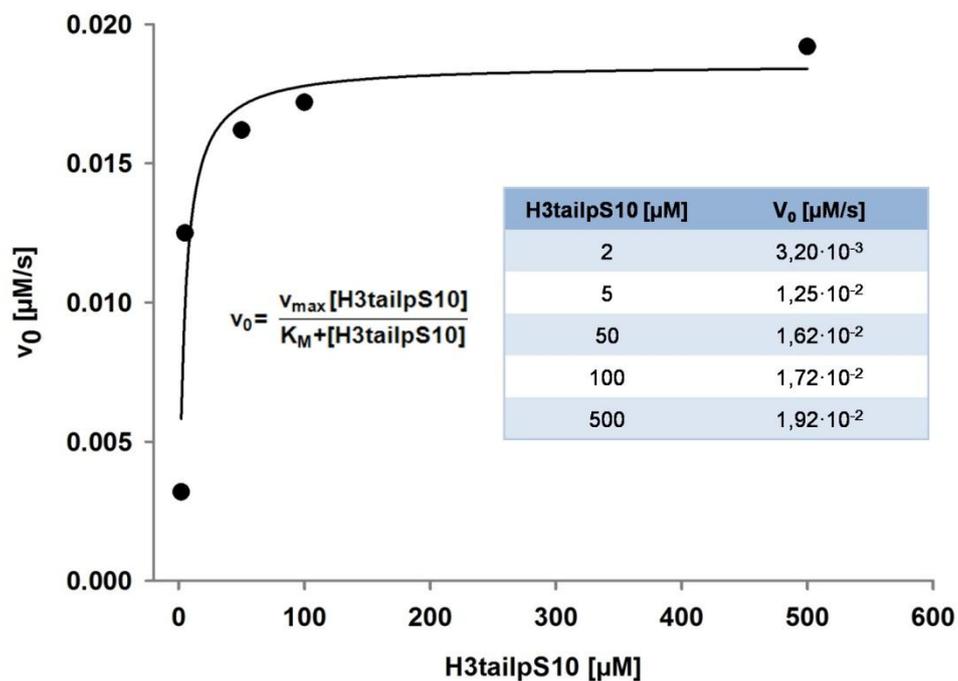


Abb. 33 Auftragung der Anfangsgeschwindigkeiten gegen die Substratkonzentration (H3tailpS10). Die nicht lineare Regressionsanalyse wurde mit Sigmaplot durchgeführt.

Aus der Gleichung konnte der Wert für  $v_{\max}$  mit  $1,9 \cdot 10^{-2}$  ( $\pm 0,002$ ) [ $\mu\text{M/s}$ ] und der Wert für  $K_M$  mit  $4,4$  ( $\pm 1,8$ ) [ $\mu\text{M}$ ] bestimmt werden. Es sei an dieser Stelle darauf hingewiesen, dass bei niedrigen Substratkonzentrationen dieser Phosphatassay an seine Nachweisgrenze stößt. Dies lässt sich an der relativ großen Streuung der Werte der 2  $\mu\text{M}$ -Messung in Abb. 32 ablesen. Durch diese intrinsische Limitierung sollten die bestimmten kinetischen Parameter ( $v_{\max}$  und  $K_M$ ) als eine gute Annäherung an die exakten Werte aufgefasst werden.

Für einen Vergleich zwischen den beiden Dephosphorylierungsreaktionen (Substrat: pNPP vs. H3tailpS10) wurde aus dem  $K_M$  und  $v_{\max}$  unter Zuhilfenahme der Enzymkonzentration ( $[\text{PP1}\alpha]_0 = 6,6 \cdot 10^{-8} \text{ M}$ ) die katalytische Effizienz  $k_{\text{kat}}/K_M$  bestimmt die  $6,5 \cdot 10^4 \text{ [M}^{-1}\text{s}^{-1}]$  beträgt. Diese ist um drei Größenordnungen (das 2300-fache) größer als die für pNPP, was höchstwahrscheinlich die Tatsache widerspiegelt, dass es sich bei dem H3tailpS10-Peptid um ein physiologischeres Substrat als pNPP handelt und es somit als PP1-Substrat geeignet ist.

#### 2.1.1.4 Eignung von Pma als pS10-Mimetikum

Eine beschriebene Proteingruppe die, wie in Abschnitt 1.2.1.2 berichtet, phosphoryliertes Histon H3 bindet, sind die 14-3-3-Proteine.<sup>[43-45]</sup> Bisher haben sich die Isoformen 14-3-3  $\epsilon$  und 14-3-3  $\zeta$  dieser Adapterproteine in Studien als H3pS10-Bindeproteine erwiesen. So wurde beispielsweise für 14-3-3  $\zeta$  von Winter et al.<sup>[45]</sup> für ein H3-Tail(1-20)pS10-Peptid per Fluoreszenzpolarisation (FP) ein Kd-Wert von  $240$  ( $\pm 39$ )  $\mu\text{M}$  gemessen. Somit scheint die 14-3-3  $\zeta$ -Isoform geeignet, um in Pull-Down-Experimenten die Bindungsaffinitäten von H3tailpS10 und die des H3tailPma10 gegenüberzustellen. In

entsprechenden Versuchen zeigte sich, dass das 14-3-3  $\zeta$ -Protein, sowohl als rekombinantes, als auch endogenes Protein (Swiss 3T3-Mäusefibroblasten) gleichermaßen an den H3tailPma-Tail (kurz Pma10) und das natürliche Substrat (H3tailpS10, kurz pS10) bindet. Die Ergebnisse der Pull-Down-Untersuchungen der rekombinanten Form konnten im SDS-Gel per Coomassie-Färbung (Abb. 34a), die der endogenen 14-3-3 $\zeta$ -Varianate mittels Western Blotting (WB) (Abb. 34b), analysiert werden. In beiden Fällen kann man beobachten, dass die Bindungseigenschaften des unphosphorylierten H3-Tail (kurz H3) sichtlich geringer sind (siehe H3-Spur in Abb. 34 a und b).

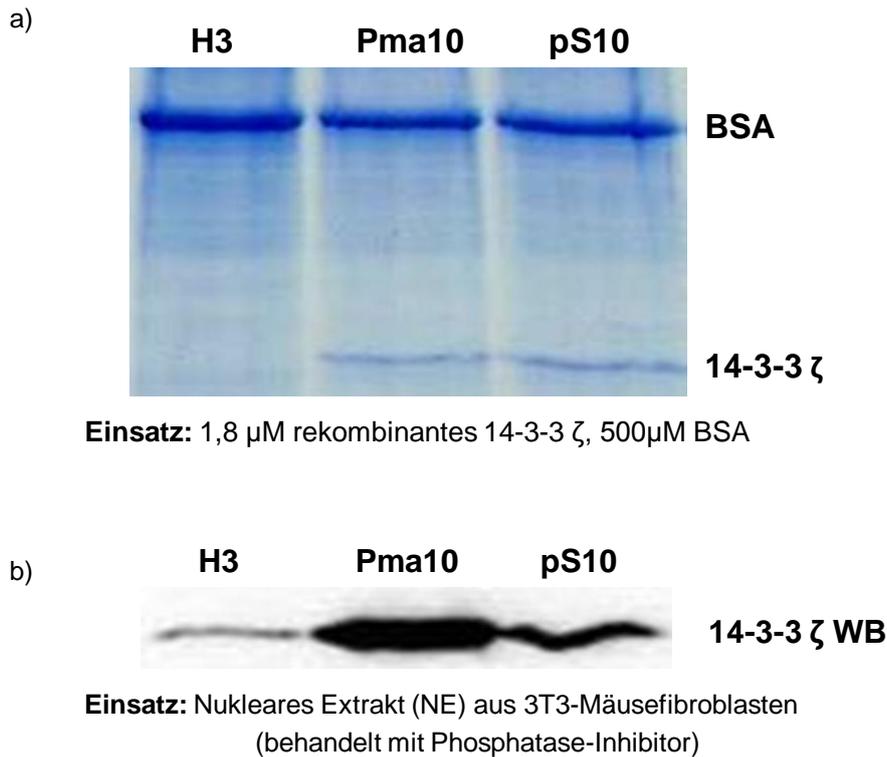


Abb. 34: a) Coomassiegel vom 14-3-3 $\zeta$  (rekombinant)-Pull-Down b) Western Blot des 14-3-3 $\zeta$  (endogen) Pull-Down

Somit zeigte sich deutlich, dass Phosphonomethylenalanin ein hinreichendes Phosphoserin-Mimentikum darstellt.

Ein Versuch, wie der geplante SILAC-Pull-Down, bei denen phosphorylierte Peptidköder mit Zellextrakten inkubiert werden, würde den Einsatz von umfangreichen wirkenden Phosphataseinhibitoren erfordern, wobei die Phosphatasen im Breitband inaktiviert werden würden und somit aus dem Proteinpool der potentiellen spezifischen Binder fallen würden. Die Substitution von Phosphoserin durch Phosphonomethylenalanin umgeht den Einsatz von Phosphataseinhibitoren. Die Phosphonogruppe bleibt, im Vergleich zur Phosphatgruppe in H3tailpS10, auch nach Einwirkung von Phosphatasen erhalten, wie ein Pull-Down mit rekombinanten 14-3-3  $\zeta$  unter Einwirkung von Phosphatase PP1 $\alpha$  deutlich machte (Abb. 35).

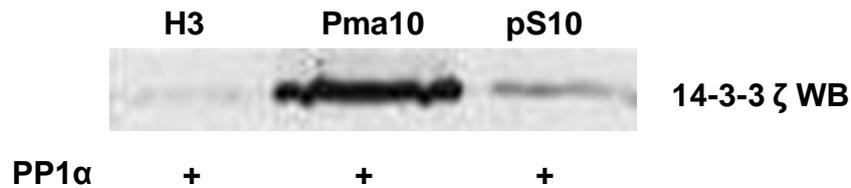


Abb. 35: Western Blot vom 14-3-3 (endogen)-Pull-Down unter Einfluss von PP1α

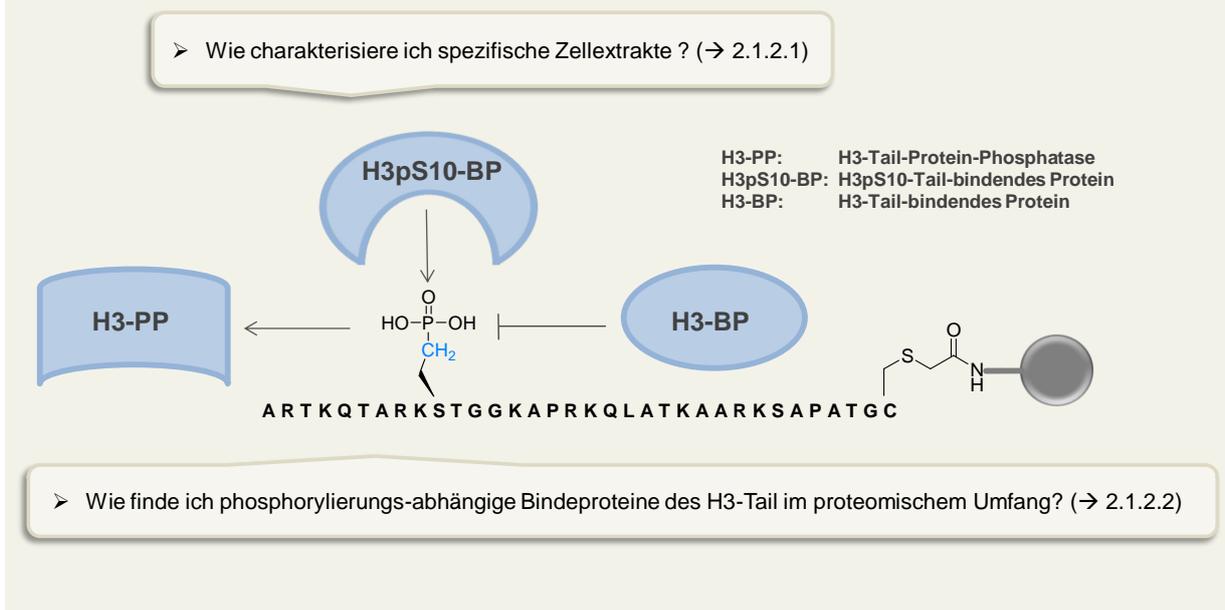
Mit diesen Ergebnissen stellte sich Pma als ein geeignetes Hilfsmittel mit den geforderten Eigenschaften heraus, um die weiteren Untersuchungen durchführen zu können.

Als nächster Schritt wurden PP1α-Pull-Down-Experimente mit den drei H3-Köderpeptiden (H3, Pma10 und pS10) durchgeführt. Dabei sollte getestet werden, ob sich die rekombinante Phosphatase PP1α an das Pma-modifizierte H3-Tail-Peptid im Vergleich zum pSer-modifizierten Peptid anreichern lässt. Durch die Hydrolyseunempfindlichkeit des Pma-Bausteins sollte bei entsprechender Bindungsfähigkeit die Phosphatase nicht vom entsprechenden Substrat (H3tailPma10) diffundieren, während H3tailpS10 durch PP1α unter Phosphatgruppenabspaltung hydrolysiert und somit zum unmodifizierten H3-Tail-Peptid umgewandelt werden würde. Letzteres würde für die Phosphatase kein Substrat mehr darstellen und die Phosphatase würde vom Peptid diffundieren.

Im Coomassiegel der PP1α-Pull-Downs konnte die PP1α-Phosphatase allerdings an keins der Köderpeptide angereichert werden. Banden der entsprechenden Größe (38 kDa) konnten auch im Falle der H3tailPma10-Spur, nicht detektiert werden. Eine Erklärung hierfür könnte in der Auswahl der PP1-Isoform liegen (Abschnitt 1.2.3). Viel eher lässt sich das Ergebnis damit erklären, dass rein katalytische Einheiten von PP1-Phosphatase-Komplexen alleine oftmals nicht die nötige Bindungsaffinität zum den Substraten aufweisen. Diese kann von regulatorischen Untereinheiten erhöht werden. So sind diese, wie im Fall der PP1-Myosin-Phosphatase, dazu fähig die Substrataffinität bis um das ca. zehnfache und die katalytische Aktivität um das ca. 15-fache zu steigern.<sup>[148]</sup> Das dies maßgeblicher Faktor bei den gerade erwähnten Pull-Down-Experimenten der rekombinanten PP1α war, deutet auch die Größenordnung der hier ermittelten katalytische Effizienz der rekombinant hergestellten PP1α an (Abschnitt 2.1.1.1). Mit einem Wert von  $6,5 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  fällt diese im Vergleich zu  $k_{\text{kat}}/K_{\text{M}}$ -Werten von Enzymen im Allgemeinen ( $\sim 10^5 - 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ )<sup>[4]</sup> um den Faktor 1,5 bis 1500 geringer aus. Es ist also nicht auszuschließen, dass sich die endogenen Phosphatase-Komplexe mit bzw. durch ihre regulatorischen Untereinheiten an den Pma-modifizierten H3-Tail-Peptidköder anreichern lassen, da diese die Substrataffinität deutlich steigern könnten.

### 2.1.2 Strategie (Teil 2)

Nach erfolgreicher Inkorporation von Phosphonomethylenalanin (Pma) in einen synthetischen immobilisierten H3-Tail in Form von H3tailPmaCys und der Synthese der unmodifizierten L- bzw. D-H3-Peptidköder sollte überprüft werden, ob Pma im SILAC-Experiment ein hinreichendes pS10-Mimetikum darstellt. Zudem sollte zunächst die Präparation der Zellextrakte, d.h. die Qualität von cytosolischen und nuklearen Extrakt sowie der Markierungsgrad (*Labeling-Effizienz*) der Isotopenmarkierten Extrakte überprüft werden.



#### 2.1.2.1 Charakterisierung nuklearer und cytosolischer Extrakte

Aufgrund der Tatsache, dass die Histone Proteine mit Zellkern-spezifische Aufgaben darstellen, sollte der Fokus beim SILAC-Experiment auf im Kern lokalisierte H3-Tail-Bindeproteine gelegt werden. Um zu gewährleisten, dass cytosolische Proteine durch unspezifische Wechselwirkungen nicht zu einem Sensitivitätsverlust des Experimentes beisteuern könnten wurde auf die Verwendung eines Gesamtzellextraktes verzichtet. Es wurde stattdessen eine Fraktionierung zwischen Cytosol und Zellkern vorgenommen und nur das Zellkernextrakt für die Experimente verwendet. Die Wahl der Zelllinie für die SILAC-Experimente fiel dabei auf 3T3-Mäusefibroblasten, die sich aufgrund leichter Handhabung in der Zellkultivierung, aber vor allem durch die Tatsache auszeichnen, dass sie große Zellkerne aufweisen. Dies stellte sich bei der Herstellung von nuklearen Extrakten als Vorteil heraus. Die Präparation solcher Extrakte folgte einem bewährten Protokoll<sup>[149]</sup>, welches im experimentellen Teil in Abschnitt 4.6.3 beschrieben ist. Die Charakterisierung cytosolischer (S100) sowie nuklearer Extrakte (NE) erfolgte per Visualisierung der chromosomalen DNA mittels Fluoreszenzmessung durch Interkalation von Ethidiumbromid (ETBr) im Agarosegel. Hierbei ist in Abb. 36 deutlich zu erkennen, dass lediglich die Kernextrakte (Spur 3,5 und 7) DNA aufweisen, während die Spuren der Cytosol-Extrakte (2, 4 und 6) größtenteils frei von DNA sind (siehe auch Abschnitt 2.2.1.1 für weitere Extrakt-Charakterisierung).

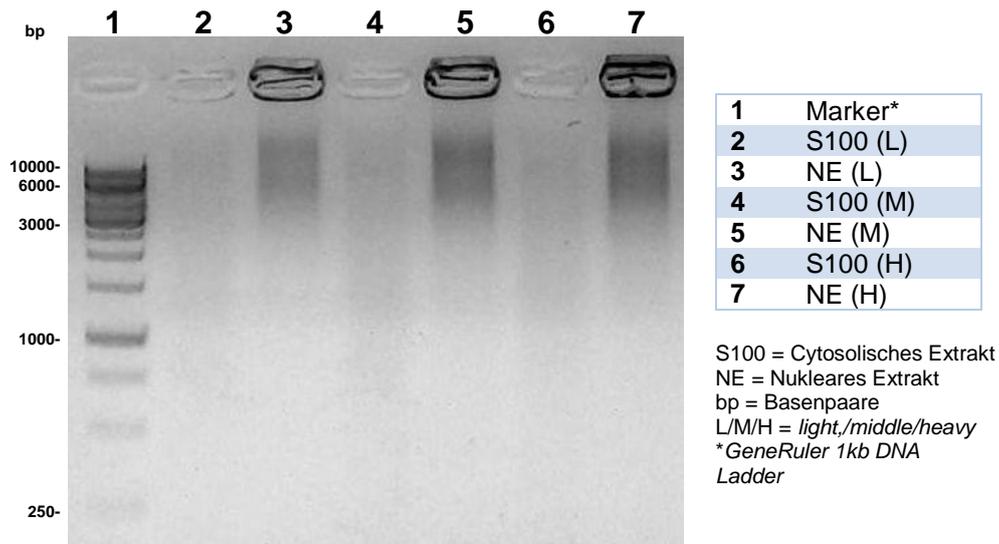
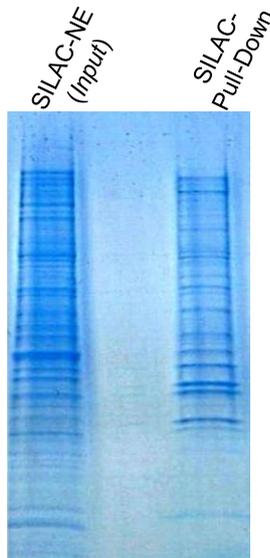


Abb. 36: Ethidiumbromid-1%-Agarosegel unterschiedlich gelabelter 3T3-Zellextrakte

Für die SILAC-Experimente wurden Zellkernextrakte mit Isotopen-markierten Proteinen hergestellt, was durch den Einsatz entsprechender Aminosäuren bei der Zellkultivierung erreicht wurde. Für das mittelschwere Extrakt (*middle*) wurden die markierten Aminosäuren D4-Lysin (Lys-4) und  $^{13}\text{C}_6$ -Arginin (Arg-6) und für das schwere Extrakt (*heavy*) die gelabelten Aminosäuren  $^{13}\text{C}_6$ ,  $^{15}\text{N}_2$ -Lysin (Lys-8) und  $^{13}\text{C}_6$ ,  $^{15}\text{N}_4$ -Arginin (Arg-10) eingesetzt. Die Überprüfung des quantitativen Einbaus der markierten Aminosäuren ins Proteom, erfolgte durch Bestimmung der sogenannten „Labeling-Effizienz“. Diese wurde per nano-LC-ESI-MS/MS-Messung am LTQ Orbitrap LX vorgenommen. Dafür wurden eine repräsentative SDS-Gelbande der Extrakte entsprechend verdaut und für die Messung aufbereitet (Abschnitt 4.2.3.1). Den Gelbanden konnten durchschnittlich über 90 Proteine zugewiesen werden, aus deren Mittelwertverhältnis sich eine *Labeling*-Effizienz von  $\geq 95\%$  fürs mittelschwere (M, *middle*) und schwere (H, *heavy*) Extrakt ergab. Mit 98% Isotopenreinheit, der in der Zellkultur eingesetzten Aminosäuren entsprach das nahezu vollständiger Markierung.

**2.1.2.2 SILAC-Pull-Down mit H3-Tail-Peptiden**

Nach Kontrolle der SILAC-Extrakte und Design, Immobilisierung und Eignung der Peptide, im Sinne der Aufgabenstellung, konnte die proteomische Analyse Serin-10-Phosphorylierungs-abhängiger H3-Tail-Bindeproteine ausgeführt werden. Dafür wurden die Festphase-immobilisierten Peptide: D-H3tailCys, H3tailCys und H3tailPmaCys in einem Triple-SILAC-Pull-Down mit unterschiedlich Isotopen-markierten nuklearen Extrakten inkubiert, wobei die genaue Zuordnung Tab. 5 entnommen werden kann. Die Coomassie-gefärbten SDS-Gel-Proteinbanden in Abb. 37 machen direkt ersichtlich, dass sich die Proteinzusammensetzung der Triple-SILAC-Pull-Down-Probe (rechts) deutlich von der eines exemplarischen Nuklearextraktes (*Input*, links) unterscheidet.



Köderpeptid	Bezeichnung (Nukleares Extrakt)	Aminosäuren
D-H3tailCys (D)	L ( <i>light</i> )	Lys-0, Arg-0
H3tailCys (H3)	M ( <i>middle</i> )	Lys-4 (D4-Lys) Arg-6 ( <sup>13</sup> C6-Arg)
H3tailPmaCys (Pma)	H ( <i>heavy</i> )	Lys-8 ( <sup>13</sup> C6, <sup>15</sup> N2-Lys) Arg-10 ( <sup>13</sup> C6, <sup>15</sup> N4-Arg)

Tab. 5: Übersicht über Peptid/Extrakt-Kombination für Triple-SILAC-Pull-Down

Abb. 37: Coomassiegel von NE (links) und SILAC-Pull-Down (rechts)

Es wurden zwei voneinander unabhängige Versuche (Experiment A und B) mit biologischen Replikaten nuklearer SILAC-Extrakte aus 3T3-Mäusefibroblasten unter identischem Ablauf der Prozedur durchgeführt. Durch ultra-sensitive nano-LC-LTQ Orbitrap Massenspektrometrie konnten in beiden Experimenten eine Vielzahl an Proteinen durch Abgleich mit der IPI *Mouse* Proteindatenbank identifiziert werden. Die massenspektrometrischen Messungen und die Datenbankanalyse wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Dr. E. Krause am FMP Berlin durchgeführt. In Experiment A wurden insgesamt 4106 Peptide gefunden, von denen mindestens eines, meist aber mehrere eindeutig einem bestimmten Protein zugeordnet werden konnten (*unique peptides*, UP). Die Zahl der in Experiment A identifizierten Proteine beläuft sich auf 1063, wobei 98% der in A gefundenen Proteine ebenfalls in Experiment B gefunden worden sind. Experiment B (NE: 6 mg/ml) unterscheidet sich durch den Einsatz von höher konzentrierten Pull-Down-Extrakt von Experiment A (NE: 2 mg/ml). Das erklärt, dass ca. 5-fach mehr eindeutig zuordenbare Peptide (über 21000) gefunden worden sind. Somit wurden auch mit 2527 in B identifizierten Proteinen fast 1500 zusätzliche Proteine gefunden (Abb. 38).

Experiment	Einsatz: [mg/ml]	$\Sigma$ Proteine	$\Sigma$ UP
A	2	1063	4106
B	6	2527	21033

<b>Überlappende Proteine (<math>A \cap B</math>)</b>	1037
<b>Überlappende Proteine (<math>A \cap B</math>), mind. 1x UP&gt;1</b>	980

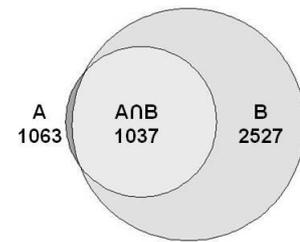


Abb. 38: Übersicht der in Experiment A & B gefundenen Proteine und Peptide (Tabellen und Venn-Diagramm)

Zur weiteren Quantifizierung herangezogen wurden allerdings nur Proteine, die in beiden Experimenten gefunden worden sind und die zusätzlich mindestens in einem von beiden Experimenten mehr als ein UP aufwiesen, was auf 980 Proteine zutraf (Abb. 38, Tabelle unten).

Jedem Protein sind in beiden Experimenten mehrere Verhältnisse (*ratios*), beispielsweise M/L und H/M, aus den MS-Daten der unterschiedlich Isotopen-gelabelten Peptide zugeordnet. Diese *ratios* entsprechen An- bzw. Abreicherungs-faktoren der zugeordneten Proteine aus einem der drei unterschiedlich Isotopen-markierten Extrakte und wurden aus dem Signalintensitätenverhältnis der Peptide ermittelt. Bei mehreren gefundenen Peptiden, die einem bestimmten Protein zugeordnet werden konnten, wurde mit der Proteomik-Software MaxQuant das Proteinverhältnis aus dem Median der Peptidverhältnisse bestimmt.

Die Auftragung der Verhältnisse (M/L und H/M) zur Menge der gezählten Verhältnisse (*ratio counts*) entspricht in allen vier Fällen einem typischen Muster, welches in den Diagrammen in Abb. 39 dargestellt ist. Jeder Punkt entspricht hierbei einem bestimmten Protein. In allen Diagrammen ist eine Datenpunkthäufung mit hoher Streuung unterschiedlicher Verhältnisse im Bereich niedriger *ratio counts* zu erkennen, welche zunehmend mit den *ratio counts* abnimmt. Die Größe der *ratio counts* kann als zusätzliches Maß zur empirischen Verlässlichkeit der Verhältnis-Werte beitragen. So wurden zusätzlich zum oben erwähnten Kriterium nur Proteine mit einem *ratio count* >1 in mindestens einem der beiden Experimente der weiteren Quantifizierung zugänglich gemacht.

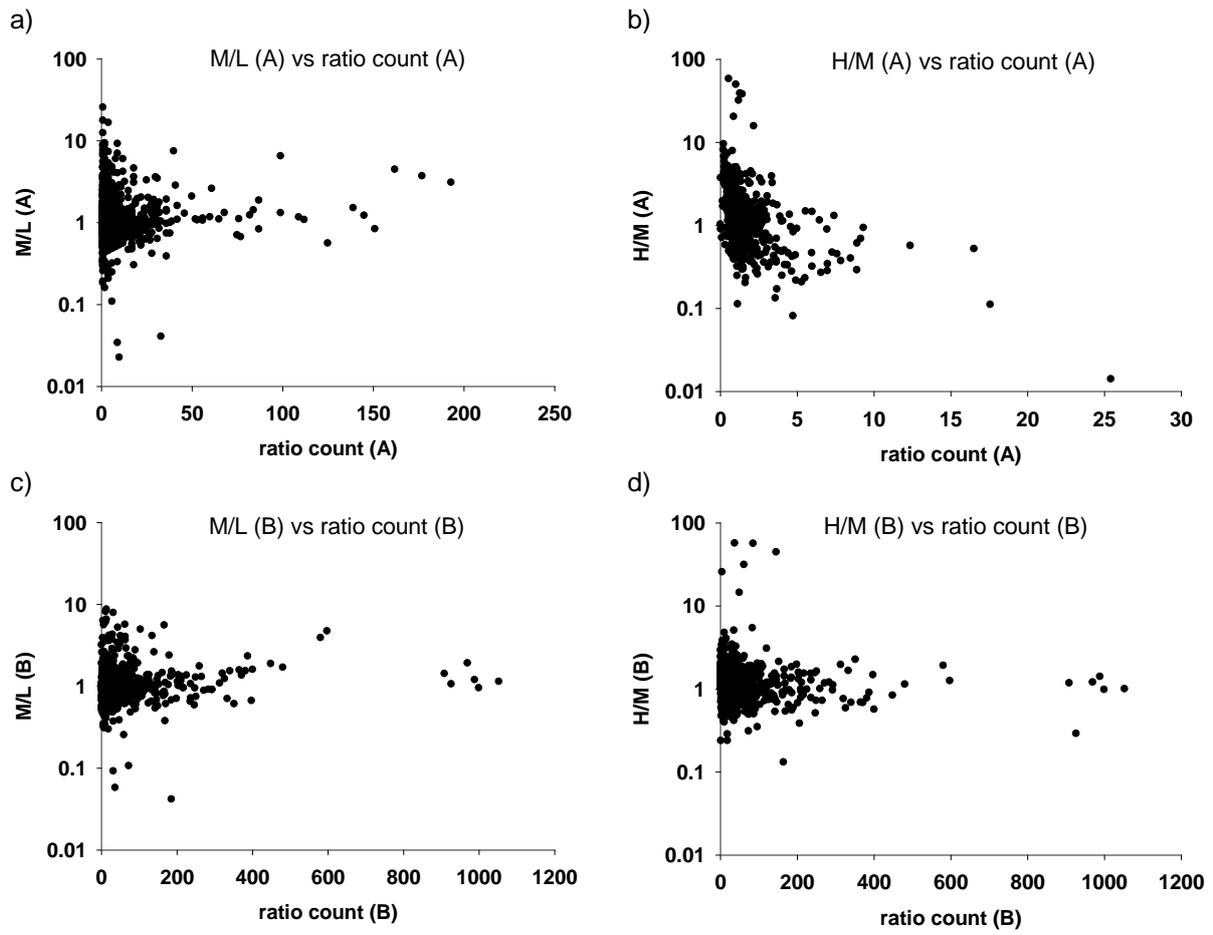


Abb. 39: a) Auftragungen der Verhältnisse gegen *ratio counts* von Experiment A & B, a) M/L(A) vs. *ratio count* (A), b) H/M (A) vs. *ratio count* (A), c) M/L(B) vs. *ratio count* (B), d) H/M(B) vs. *ratio count* (B)

Unter den Verhältnissen stellen nur M/L und H/M (bzw. M/H) eine biologische Relevanz dar, wobei das erstgenannte das Protein-Bindungsverhältnis des L-H3-Tails gegenüber dem D-H3-Tail kennzeichnet und das zweitgenannte das Protein-Bindungsverhältnis des H3Pma-Tail-Peptids gegenüber dem L-H3-Tail. Ein M/L-Wert >1 deutet somit eine Proteinanreicherung an den L-H3-Tail gegenüber dem D-H3-Tail und somit eine potenzielle Bindungsspezifität zu unmodifizierten H3-Tail an. Ein H/M-Wert >1 kennzeichnet mögliche H3pS10-spezifische Binder, während ein entsprechender H/M-Wert <1 auf Serin-10-phosphorylierungs-abhängige Bindungsunterdrückung hindeutet (was im Übrigen einem erhöhtem M/H-Wert entsprechen würde). Wie durch die Auftragung vom M/L-Verhältnis (logarithmische Skala) zum Proteinindex ersichtlich (Abb. 40), zeigen die meisten Proteine mit einem Verhältnis von ungefähr eins keine Anreicherung am L-H3-Tail gegenüber den D-H3-Tail. Diese können somit als unspezifischen Binder eingeordnet werden, die nur aufgrund elektrostatischer Wechselwirkung binden. Wie zu erwarten zeigt nur ein kleiner Anteil deutliche M/L-Verhältnisse > 1 auf. M/L-Werte < 1 (Anreicherung am D-H3-Tail) können aufgrund der fehlenden biologischen Bedeutung als irrelevant kategorisiert werden. Ihr Auftreten kann einerseits durch Kontaminationen während der Probenaufbereitung und andererseits mit minimalen Ungenauigkeiten, welche sich unvermeidbar bei der Extrakt-Präparation unterschiedlich gelabelter Zellextrakte ergeben, erklärt werden.

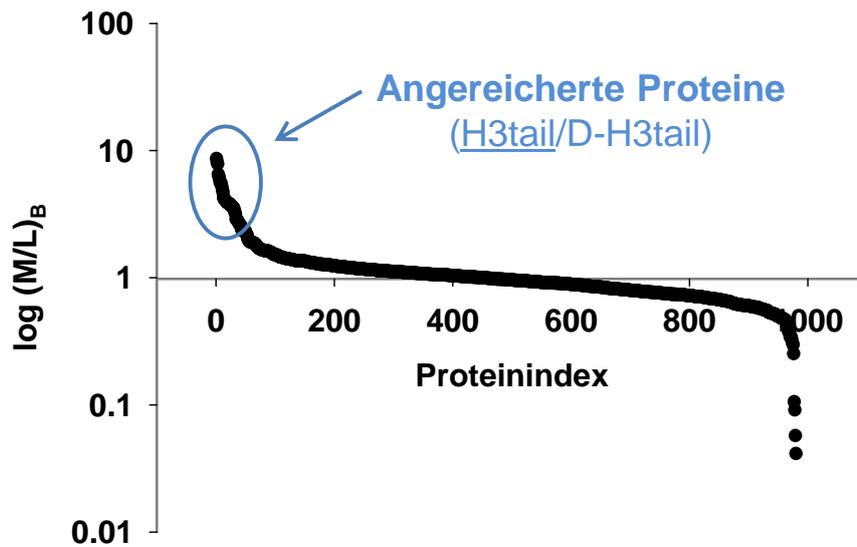


Abb. 40: Diagramm M/L (L-H3tail/D-H3tail) gegen Proteinindex (Experiment B)

Ähnliche Verhältnisse wie in Abb. 40 bestehen für die graphische Auftragung, von der nach Größe geordneten H/M-Werte (logarithmische Skala) über den Proteinindex (Abb. 41). Auch hier zeigt lediglich eine kleine Anzahl von Proteinen eine Anreicherung zu Pma-modifizierten H3-Tail.

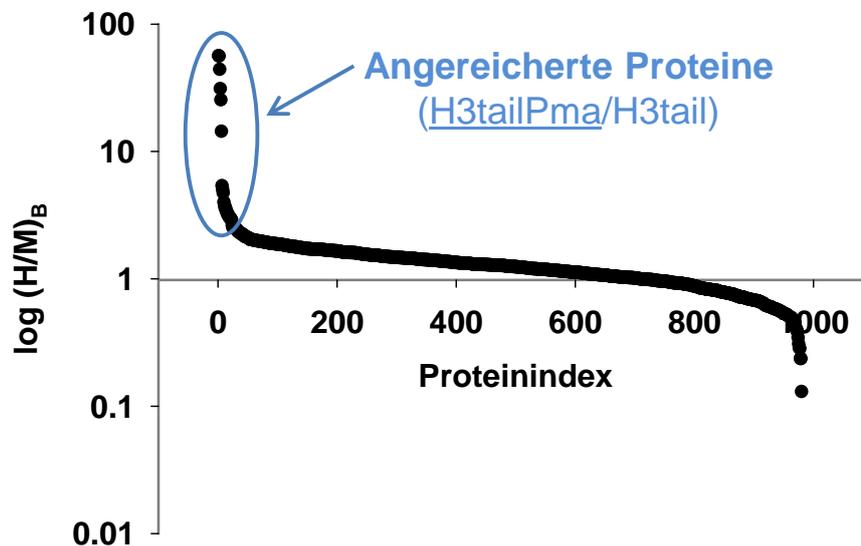


Abb. 41: Diagramm H/L (H3tailPma/L-H3tail) gegen Proteinindex (Experiment B)

Proteine die entweder zusätzlich zu einem deutlich erhöhtem H/M-Verhältnis einen M/L-Wert  $< 1$  aufweisen oder Proteine mit hohem M/L-Wert und vergleichsweise niedrigem H/M-Wert, sind geeignete Kandidaten um Serin-10-Phosphorylierungs-abhängige H3-Tail-Binder zu sein. Im ersten Fall würde es sich um Proteine mit Bindungsaffinität zum Serin-10-phosphoryliertem H3-Tail handeln, im zweiten Fall um Proteine die besondere Affinität zum dephosphorylierten, unmodifizierten H3-Tail

vorweisen. Um dies zu beurteilen, sind in Tab. 6 und Tab. 7 die ersten 40 der quantifizierten 980 Proteine, geordnet nach absteigenden M/L-(Tab. 6) bzw. H/M-Wert (Tab. 7), aufgelistet. Experiment B wurde hierbei zur Orientierung herangezogen, weil es aufgrund der erhöhten UP-Werte gesteigerte empirische Aussagekraft aufweist. Zur besseren Identifikation ist zusätzlich die UniProt-Nummer (*Universal protein Database*-größte bioinformatische Proteindatenbank, [www.uniprot.org](http://www.uniprot.org)) und die Anzahl der *unique peptides* (UP) aufgeführt.

Nr.	Gen-Name	Proteinbeschreibung	UniProt Nr.	UP		M/L		H/M	
				(A)	(B)	(A)	(B)	(A)	(B)
1	WDR5	WD repeat-containing protein 5	P61965	3	9	2.5	8.7	1.6	1.0
2	FHL3	Four and a half LIM domains protein 3	A2A781	2	5	8.9	8.1	0.6	1.4
3	APG2	Heat shock 70 kDa protein 4	Q61316	3	19	16.5	7.9	0.5	1.1
4	HSPA1B	Heat shock 70 kDa protein 1B	P17879	2	5	9.3	6.5	0.9	1.7
5	HAT1	Histone aminotransferase 1	Q8BY71	6	2	9.2	6.3	0.7	0.5
6	RBBP4	Retinoblastoma binding protein 4	A2A875	1	5	2.8	6.0	1.5	0.8
7	RBBP7	Retinoblastoma binding protein 7	Q60973	1	10	2.8	5.7	1.8	0.7
8	MYST2	Histone acetyltransferase MYST2	Q5SVQ0-1	1	5	2.8	5.6	1.3	1.2
9	HSC70	Heat shock cognate 71 kDa protein	P63017	16	27	7.4	5.5	1.3	1.7
10	EHMT2	Histone-lysine N-methyltransferase, H3 lysine-9 specific 3	Q9Z148-1	1	22	2.5	5.2	0.5	0.7
11	HSPA9	Stress-70 protein, mitochondrial	P38647	16	37	3.5	4.9	1.8	1.8
12	HSPA5	78 kDa glucose-regulated protein	P20029	32	55	6.5	4.7	1.1	1.2
13	HSPH1	Heat shock protein 105 kDa	Q61699-1	1	18	12.4	4.3	0.6	1.4
14	MBD2	Methyl-CpG-binding domain protein 2	Q9Z2E1-1	5	9	2.7	4.1	3.3	1.7
15	MTA2	Metastasis-associated protein MTA2	Q9R190	19	24	2.6	4.1	3.7	1.4
16	MORC3	Microrchidia 3	A6H605	4	21	7.0	4.1	0.9	1.2
17	MTA1	Metastasis-associated protein MTA1	Q8K4B0	10	21	3.1	4.0	2.2	1.3
18	QTRTD1	Queuine tRNA-ribosyltransferase subunit	B8ZXI1-1	1	8	2.1	3.9	0.6	0.3
19	USP7	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 7	Q6A4J8-1	6	35	4.1	3.9	1.1	1.0
20	CHD4	Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 4	Q6PDQ2	27	70	3.1	3.9	1.9	1.9
21	CDK2AP1	Cyclin-dependent kinase 2-associated protein 1	O35207	2	1	3.4	3.9	3.2	2.1
22	RPL22	60S ribosomal protein L22	P67984	2	5	3.9	3.8	1.3	0.5
23	ELAC1	Zinc phosphodiesterase ELAC protein 1	Q8VEB6-1	2	6	1.4	3.8	0.8	0.5
24	PACSN2	Protein kinase C and casein kinase substrate in neurons protein 2	Q9WVE8	6	10	3.0	3.8	0.8	0.5

Nr.	Gen-Name	Proteinbeschreibung	UniProt Nr.	UP		M/L		H/M	
				(A)	(B)	(A)	(B)	(A)	(B)
25	CHD3	Chromodomain helicase DNA binding protein 3	B1AR17	3	11	1.9	3.7	3.2	2.0
26	KDM5B	Lysine-specific demethylase 5B	Q80Y84-1	1	10	5.6	3.7	1.5	1.6
27	IPO4	Importin-4	Q8VI75	8	23	6.0	3.6	0.5	0.7
28	HMG20B	SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily E member 1-related	Q9Z104	1	12	3.4	3.6	3.9	2.0
29	MTA3	Metastasis-associated protein MTA3	A4FTZ3	3	9	2.1	3.6	4.1	1.3
30	QTRT1	Queuine tRNA-ribosyltransferase	Q9JMA2	8	6	2.7	3.5	0.4	0.4
31	DPF2	Zinc finger protein ubi-d4	Q3UKV4	1	14	2.7	3.4	1.7	1.7
32	GATAD2A	Transcriptional repressor p66 alpha	Q8CHY6	6	16	2.0	3.3	4.5	1.9
33	HMG20A	High mobility group protein 20A	Q9DC33-1	2	1	1.7	3.2	2.2	2.4
34	GATAD2B	Transcriptional repressor p66-beta	Q8VHR5-1	5	20	1.7	2.9	4.1	1.6
35	TRIM26	Tripartite motif-containing protein 26	B8JJ55	1	13	1.8	2.9	1.1	1.3
36	ADNP	Activity-dependent neuroprotective protein	Q9Z103	5	23	4.5	2.9	1.3	1.1
37	CBX3	Chromobox protein homolog 3	P23198	1	6	3.0	2.8	0.5	0.6
38	HDAC1	Histone deacetylase 1	O09106	4	8	1.9	2.7	3.2	1.4
39	HDAC2	Histone deacetylase 2	P70288	3	7	1.8	2.7	3.4	1.5
40	CBX5	Chromobox protein homolog 5	Q61686	1	4	3.1	2.6	0.5	0.6

Tab. 6: Die vierzig am stärksten angereicherten Proteine am L-H3-Tail (bezogen auf Experiment B)

Nr.	Gen-Name	Proteinbeschreibung	UniProt Nr.	UP		M/L		H/M	
				(A)	(B)	(A)	(B)	(A)	(B)
1	YWHAH	14-3-3 protein eta	P68510	3	15	0.6	0.6	57.9	56.5
2	YWHAG	14-3-3 protein gamma	P61982	3	15	1.0	0.6	49.3	56.0
3	YWHAE	14-3-3 protein epsilon	P62259	13	24	1.3	0.6	38.6	44.1

Nr.	Gen-Name	Proteinbeschreibung	UniProt Nr.	UP		M/L		H/M	
				(A)	(B)	(A)	(B)	(A)	(B)
4	YWHAZ	14-3-3 protein zeta/delta	P63101	3	17	1.4	0.6	37.8	31.2
5	YWHAS	14-3-3 protein sigma	O70456	1	2	1.2	0.7	31.7	25.5
6	YWHAQ	14-3-3 protein theta/tau	P68254	2	18	2.2	0.7	15.6	14.4
7	PUF60	Poly(U)-binding-splicing factor PUF60	Q3UEB3-2	1	24	0.6	0.9	4.4	5.4
8	RBM25	RNA-binding protein 25	B2RY56-1	3	16	1.0	1.1	3.5	5.0
9	FTL	Ferritin light chain 1	P29391	1	3	1.1	1.2	4.7	4.7
10	HP1BP3	Heterochromatin protein 1-binding protein 3	Q3TEA8-1	3	8	0.8	0.8	7.8	4.0
11	RCN3	Reticulocalbin-3	Q8BH97	7	3	2.7	0.5	1.0	3.8
12	SFRS11	Splicing factor, arginine/serine-rich 11 isoform 2	Q3UIX4	1	5	0.4	1.0	2.2	3.6
13	3110043O21RIK	Putative uncharacterized protein	Q3TJP2	3	9	1.0	1.0	2.9	3.6
14	MDC1	Mediator of DNA damage checkpoint 1	Q5PSV9	10	19	1.0	0.5	1.5	3.4
15	AP4	Transcription factor AP4	Q8BWA4	7	3	0.5	0.6	1.9	3.4
16	PRPF40A	Pre-mRNA-processing factor 40 homolog A	Q9R1C7-1	3	17	0.8	1.3	1.7	3.2
17	SMCR8	Smith-Magenis syndrome chromosomal region candidate gene 8 protein homolog	Q3UMB5-1	2	6	1.0	0.9	2.6	3.2
18	PELP1	Proline-, glutamic acid- and leucine-rich protein 1	Q9DBD5	6	15	0.6	1.2	2.6	3.1
19	MDN1	Midasin homolog	A2ANY6	23	42	0.7	1.4	3.1	3.0
20	TEX10	Tex10 protein	Q3URQ0	3	9	0.6	1.1	4.6	3.0
21	WDR18	WD repeat-containing protein 18	Q4VBE8	9	9	0.6	1.4	3.1	3.0
22	CKAP4	Cytoskeleton-associated protein 4	Q8BMK4	1	20	0.8	0.6	2.4	2.9
23	ACTR10	Actin-related protein 10	Q3TT18	3	1	0.5	0.5	1.8	2.9
24	RALY	RNA-binding protein Raly	Q64012-2	4	17	0.5	0.5	7.3	2.6
25	CHTF8	Chromosome transmission fidelity protein 8 homolog	P0C6T0	3	3	1.0	1.1	1.8	2.5
26	HMG5	Nukleosom-bindendes Protein 1	Q9JL35	5	12	1.2	0.7	2.2	2.5
27	SEN3	Sentrin-spezifische Protease 3	Q9EP97	1	3	0.7	1.2	3.4	2.5

Nr.	Gen-Name	Proteinbeschreibung	UniProt Nr.	UP		M/L		H/M	
				(A)	(B)	(A)	(B)	(A)	(B)
28	RBM39	RNA binding motif protein 3	Q8VH51-2	2	7	1.2	0.8	3.9	2.5
29	MRPS21	28S ribosomal protein S21, mitochondrial	P58059	1	2	0.3	1.1	6.7	2.5
30	TP53BP1	Tumor suppressor p53-binding protein 1	P70399-1	1	29	0.3	0.9	3.2	2.5
31	FAM172A	UPF0528 protein FAM172A	Q3TNH5-1	12	14	1.2	0.6	1.1	2.5
32	HMG20A	High mobility group protein 20A	Q9DC33-1	2	1	1.7	3.2	2.2	2.4
33	SQRDL	Quinone oxidoreductase, mitochondrial	Q9R112	1	3	0.6	1.2	1.3	2.4
34	DMAP1	DNA methyltransferase 1-associated protein 1	Q9JI44-1	1	3	0.6	0.8	1.3	2.3
35	CHD1	Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 1	P40201	7	6	0.8	0.6	1.3	2.3
36	SDF4	45 kDa calcium-binding protein	Q61112-1	4	18	5.3	0.3	0.2	2.3
37	ZBTB33	Transcriptional regulator Kaiso	Q8BN78	1	6	0.5	0.9	4.0	2.3
38	ENY2	Enhancer of yellow 2 transcription factor homolog	Q9JIX0	2	6	1.2	1.3	1.0	2.3
39	FN1	Putative uncharacterized protein	B9EHT6	7	65	0.9	0.6	1.1	2.3
40	FAM175A	BRCA1-A complex subunit Abraxas	Q8BPZ8-1	1	10	0.6	1.0	3.6	2.2

Tab. 7: Die vierzig am stärksten angereicherten Proteine am H3Pma-Tail (bezogen auf Experiment B)

Mehr Übersicht über die Verhältnisse bietet außerdem die graphische Auftragung der Verhältniswerte (M/L- bzw. H/M) der Experimente A und B in Abb. 42 und Abb. 44. Hier liegen die Proteine, die in beiden Experimenten jeweils angereichert gefunden worden sind, im ersten Quadranten (jeweils oben rechts). Somit können sie als Kandidaten für spezifische Bindung angesehen werden. Die interessantesten Proteine mit den höchsten Anreicherungsfaktoren wurden hier mit blauen Pfeilen markiert und werden in folgendem diskutiert. In Abb. 42 weisen sie einen durchschnittlichen Anreicherungsfaktor von 6 auf, im Einzelexperiment liegen die M/L-Verhältnisse zwischen 3 und 17. Einige von ihnen wurden zusätzlich zur weiteren Verifizierung herangezogen, was in den Abschnitten 2.1.3 und 2.1.4 thematisiert wird.

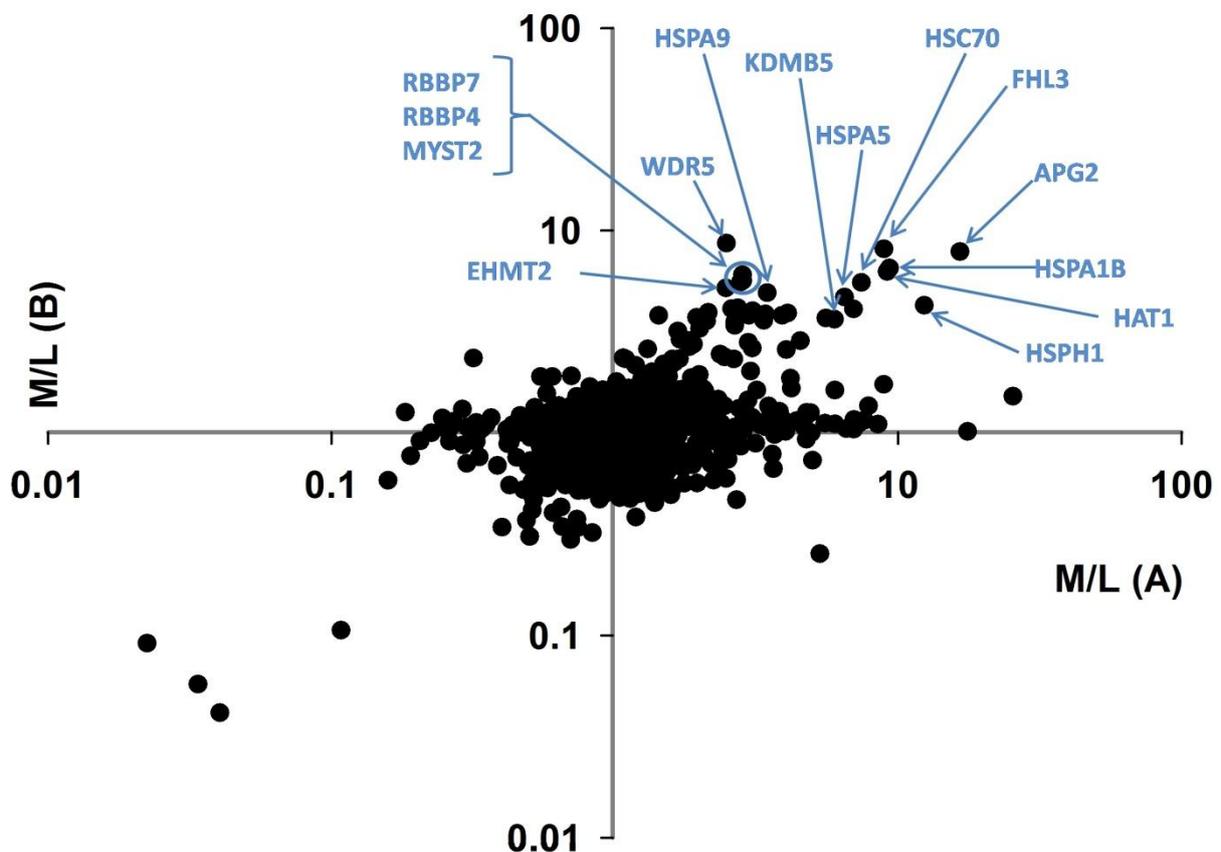


Abb. 42: Diagramm M/L (Experiment A) vs. M/L (Experiment B)

Unter den angereicherten Proteinen mit  $M/L > 1$  (siehe auch Abb. 42) sind bereits bekannte H3-Bindeproteine und Proteinkomplexe zu finden, was den Erfolg der Strategie und der Methode unterstreicht. Unter ihnen befinden sich Proteine, die sowohl bei der transkriptionellen Aktivierung (WDR5, MYST2) sowie bei der Genrepression (EHMT2, KDM5B) involviert sind.

Das an oberster Stelle der Tab. 6 stehende Protein WDR5, ein WD40-repeat Protein, welches als Komponente des Histon-Lysine-N-Methyltransferase-Komplex MLL (*Mixed Lineage Leukemia*) eine Rolle bei der Trimethylierung von K4 in Histone H3 spielt, ist nachgewiesenermaßen ein direkter Binder des N-Terminus des H3-Tail.<sup>[150]</sup> Die WDR5-Struktur wird aus sieben  $\beta$ -Faltblättern, die Propeller-artig angeordnet sind, gebildet. Da Kristallstruktur- und funktionelle Untersuchungen gezeigt

haben, das lediglich der N-Terminus „ART“, bedingt durch Wasserstoffbrücken und van der Waals Kräfte direkt in der Mitte der Propellerstruktur bindet<sup>[151]</sup>, ist eine Änderung der Bindungsaffinität durch Serin-10-Phosphorylierung nicht zu erwarten. Dies ist auch durch die experimentellen Daten in dieser Arbeit belegt worden (Tab. 6). Die Phosphorylierung von Threonin-3 hingegen führt zu Bindungsunterdrückung von WDR5 zum H3-Tail (siehe hierzu auch Abschnitt 2.1.3 und 2.1.4).<sup>[152]</sup> Im welchen Maß die dimethylierten Formen von K4 und R2 die Bindungsspezifität von WDR5 ausmachen könnte ist nicht eindeutig geklärt.<sup>[151, 153-155]</sup> In dieser Arbeit wurden die entsprechenden Methylierung nicht untersucht, aber es konnte gezeigt werden, dass WDR5 am unmodifizierten H3-Tail angereichert ist, während die vorhergesagte Methylierungs-einleitende katalytische MLL-Domäne nicht im SILAC-Datensatz zu finden war.

MYST2 (Nr. 8, Tab. 6) ist die katalytische Hauptkomponente des HBO1 (*Histone acetyltransferase bound to ORC1*)-Komplexes und weist gegenüber Histone H4 intrinsische Acetyltransferaseaktivität auf.<sup>[156-157]</sup> HBO1 wird als einer der Schlüsselregulatoren von DNA-Replikation und Zellvermehrung angenommen, da es den für den Großteil an Acetylierungen an nukleosomalen Histon H4, insbesondere für K5 und K12 und im geringeren Maß auch an Histon H3 und H2A verantwortlich ist.<sup>[158]</sup> In Untersuchungen mit dem Tumorrepressor JADE1, einer HBO1-Untereinheit, wurde gezeigt, dass dessen PHD-Finger-Domänen essentiell für die Interaktion zwischen Chromatin und dem HBO1-Komplex *in vivo* sind. Es wird angenommen, dass dafür die Wechselwirkungen mit dem N-Terminus des H3-Tails ausschlaggebend sind.<sup>[159]</sup> In den hier ermittelten Daten konnte keine vergleichbare HBO1-Untereinheit validiert werden, dennoch konnte für MYST2 interessanterweise eine entsprechende Interaktion mit einem durchschnittlichen Anreicherungsverhältnis von 4,2 (Tab. 6) zum H3-Tail aufgezeigt werden.

Maßgeblich an der transkriptionellen Repression beteiligt ist die *in vitro* H3K9/K27 methylierende aber vor allem speziell *in vivo* H3K9 mono- und dimethylierende Histonmethyltransferase EHMT2 (10, Tab. 6).<sup>[160]</sup> Diese auch unter dem Namen G9a bekannte Methyltransferase erkennt K9 in der Aminosäuresequenz des flankierenden Bereiches des H3-Tail mit einer elektronegativen Bindungstasche.<sup>[161]</sup> Es wurde gezeigt, dass für die Methyltransferaseaktivität von EHMT2 mindestens die Sequenz *N-TARKSTG-C* vorliegen muss und das Serin-10 und Threonin-11-Phosphorylierung die K9-Methylierung deutlich reduziert.<sup>[162]</sup> Dies steht in Einklang mit dem reduzierten H/M-Verhältnis (0,5 bzw. 0,7) zum Pma-modifizierten H3-Tail (Tab. 6). Mit M/L-Anreicherungsfaktoren von 2,5 bis 5,5 wurde EHMT2 sicher am L-H3-Tail als angereichert detektiert (Tab. 6).

Unter den in Tab. 6 aufgeführten 40 am stärksten angereicherten H3-Tail-Bindern befinden sich auch 12 Komponenten des Nukleosom-Remodierungs- und Deacetylierungs-Komplex (NuRD), darunter RBBP4, RBBP7, MTA1-3, GATAD2A, GATAD2B, HDAC1 und HDAC2. Dieser Multi-Protein-Komplexes wird je nachdem, ob durch MBD2 (*Methyl-CpG-binding protein*, Nr. 14, Tab. 6) an methylierte DNA rekrutiert oder zusätzlich mit CHD3 bzw. CHD4 (*Chromodomain-helicase-DNA-binding protein*, Nr. 25 bzw. 20, Tab. 6) assoziiert, auch als MeCP1 bzw. Mi-2/NuRD bezeichnet. Sein Einfluss auf die Transkriptionsregulierung wurde bereits vielfach beschrieben.<sup>[163-168]</sup> In Abb. 43 ist eine STRING-Datenbank-(Version 9.0)-Übersicht der NuRD-Komponenten dargestellt, die auch hier gefunden worden sind. Insgesamt weisen sie im Einzelexperiment L-H3-Tail-Anreicherungsfaktoren von 1,4 bis 6 auf.

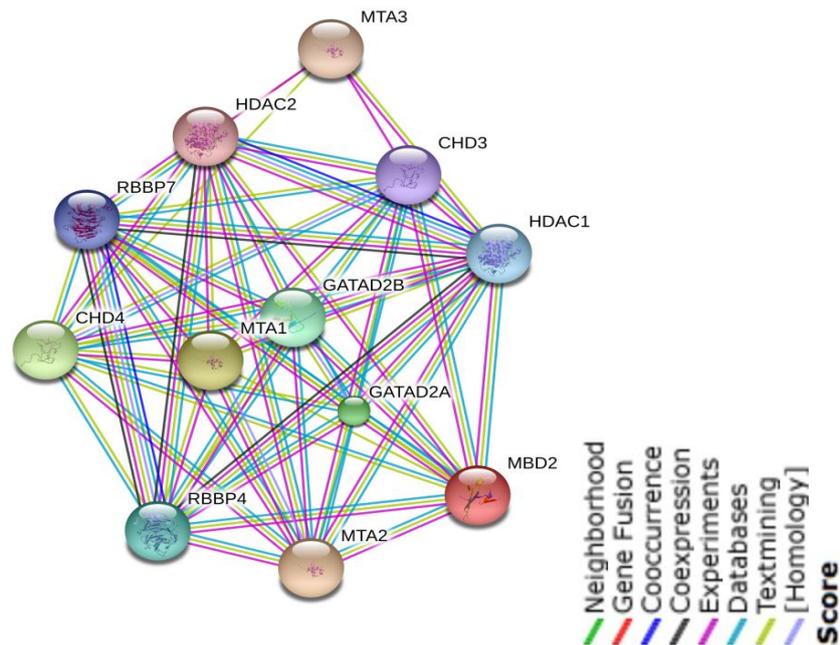


Abb. 43: Übersicht nachgewiesener NuRD-Komponenten (STRING 9.0-Datenbank,)

Die Komponente CHD4 erkennt per PHD2-Finger den N-Terminus von H3 und bindet ihn über Wasserstoffbrückenbindungen und Salzbrücken. Dies trifft laut Musselmann et al. speziell für H3K9Ac (Kd: 0,6  $\mu\text{M}$ ) und H3K9Me3 (Kd: 0,9  $\mu\text{M}$ ), aber auch in etwas reduzierter Form für den unmodifizierten H3-Tail (Kd: 18  $\mu\text{M}$ ), jedoch nicht für H3pS10, zu.<sup>[169]</sup> Die beschriebene Bindungs-diskriminierende Wirkung durch Phosphorylierung an Serin-10 konnte im Falle vom Pma-modifizierten H3-Tail für die NuRD-Komponenten allerdings nicht bestätigt werden (Tab. 6).

Für die hier am L-H3-Tail ebenfalls angereicherte Histondemethylase KDM5B (Nr. 26, Tab. 6) ist bekannt, dass sie spezifisch alle Methylierungsstufen (Mono/Di/Tri) an K4 in Histon H3, demethyliert.<sup>[170-171]</sup> Es wurde gezeigt, dass identisch zum *Drosophila* homolog (LID) die PHD1-Finger Domäne essentiell für die katalytische Aktivität ist und dass diese außerdem eine spezifische Affinität zum unmodifizierten H3-Tail aufweist.<sup>[172-174]</sup> Diese wird auch im SILAC-Datensatz mit den durchschnittlichen M/L-Wert von 4,7 belegt. Ein spezifischer Bindungseinfluss durch die Pma-Gruppe ist in den SILAC-Daten nicht zu erkennen (Tab. 6).

Des Weiteren wurden einige Hitzeschockproteine (HSP, *heat shock proteins*) wie HSPA1B, HSC70, HSPA9 und HSPA5, die der Familie der HSP70-Hitzeschockproteine zugeordnet werden und APG2 und HSPH1, die der Familie der HSP110-Hitzeschockproteine angehören am unmodifizierten L-H3-Tail als angereichert identifiziert. Wie der Name andeutet, werden solche Proteine bei zellulärem Stress (Hitzeschock<sup>[175]</sup>, UV-Strahlung, Hypoxie, Schwermetallexposition usw.) übermäßig exprimiert. Zum einen schützen sie in diesem Fall andere Proteine vor Denaturierung oder fördern die proteasomische Degradation instabiler Proteine.<sup>[176]</sup> Zum anderen agieren sie unter normalen Umständen allgemein als Chaperone, die z.B. neu synthetisierten Proteinen bei der Faltung helfen oder den Vorgang des Membran-durchquerenden Proteintransports unterstützen.<sup>[177-179]</sup> Hitzeschockproteine, wie HSC70, sind subzellulär im Cytosol sowie im Kern lokalisiert, wobei nach Eintreten von Hyperthermie eine Anreicherung im Nukleus zu verzeichnen ist.<sup>[180]</sup> Für das ubiquitäre HSP70-Chaperonsystem ist

bekannt, dass es zur Bindung von unstrukturierten Proteinabschnitten eine C-terminal gelegene Peptidbindedomäne besitzt,<sup>[181]</sup> wobei die Unterstützung des Faltungsvorgangs letztlich der ATP-Hydrolyse unterliegt.<sup>[182-183]</sup> Interaktionen mit Histonen sind nicht umfassend aufgeklärt bzw. beschrieben. Für HSP70 wurde allerdings gezeigt, dass es mit den Histondeacetylasen HDAC1-3 assoziiert ist.<sup>[184]</sup> Die Histontails allerdings werden, trotz ihrer fehlender Struktur, als schlechte Zielsequenzen für das Chaperone angesehen, da sie arm an hydrophoben Aminosäureresten sind<sup>[184]</sup>, die laut Untersuchungen an Peptidbibliotheken bevorzugt gebunden werden.<sup>[185-186]</sup> So könnte eine andere Domäne oder ein Adapterprotein für die hier vorliegende Anreicherung am H3-Tail verantwortlich sein. Einige Hitzeschockproteine sollen auch bei dem Mechanismus, neu synthetisierte Histone in den Nukleus zu transportieren, involviert sein.<sup>[187]</sup> Diese mögliche Interaktionsbeziehung war auch Grundlage, die Hitzeschockproteine HSC70 und APG2 (Nr. 9 und 3, Tab. 6), wie in Abschnitt 2.1.3, 2.1.4 und 2.1.5 beschrieben, weitergehend zu untersuchen.

Die Histonacetyltransferase HAT1 (Nr. 5 in Tab. 6) bildet als katalytische Untereinheit zusammen mit dem Retinoblastoma-bindende Protein 7 (RBBP7) (Nr. 7, Tab. 6) die Typ-B-Histonacetyltransferase. Diese ist für die Acetylierung von neu synthetisierten Histon H4 an Lysin-5 und Lysin-12 und im geringeren Ausmaß für die von Lysin-5 in H2A verantwortlich, wobei alle genannten Lysine in das Erkennungsmotiv GXGKXG eingegliedert sind.<sup>[188-189]</sup> Diese Acetylierungen sind in vielen grundverschiedenen Organismen gefunden worden, aber ihre Funktionen ist noch nicht genau geklärt. Die Assoziierung von HAT1 mit RBBP7 (in Hefe HAT2) erhöht die Affinität zu H4 und führt zur Aktivitätssteigerung des Komplexes. Das RBBP7-Protein (im Übrigen in dieser Arbeit bereits als Komponente des Nukleosom-Remodelierungs- und HDAC-Komplexes NuRD erwähnt) gehört wie WDR5 zur Unterfamilie der *WD-repeat*-Proteine und ist Größtenteils ebenfalls zu einer siebenblättrigen  $\beta$ -Propellerfaltblattstruktur gefaltet. Interessanterweise wird, anders als bei WDR5, dass den H3-Tail über die Mitte der Propellerstruktur bindet, bei RBBP7 das neu synthetisierte H3/H4-Dimer per Helix 1 von H4 (K-31 bis R-40<sup>[189]</sup>) über eine außerhalb der Propellereinheiten liegende Bindungstasche gebunden.<sup>[190]</sup> Über den Ablauf und die Mechanismen des Transports von neu synthetisierte Histonen in den Kern ist allgemein eher wenig bekannt. In neueren Studien wurden z.T. durch biochemische Reinigungsmethoden die einzelnen Histon H3.1-enthaltenen Komplexe aus humanen cytosolischen Fraktionen isoliert und charakterisiert.<sup>[187]</sup> Des Weiteren wurde für HAT1 eine unterstützende Rolle bei dem Transport neu synthetisierter H3/H4-Dimere in den Nukleus postuliert<sup>[191]</sup>, was konform mit der Kolokalisation von HAT1 in Cytosol und Kern ist.<sup>[189, 192]</sup> Studien an Pilzorganismen geben Hinweise darauf, dass der H4-Tail beachtlichen Einfluss auf die Inkorporation des H3/H4-Dimerkomplexes in den Kern hat, während der H3-Tail eine Rolle beim Nukleosomenaufbau spielen soll.<sup>[191]</sup> Dass HAT1 Bindungsaffinität zum H3-Tail aufweist, wie aus beiden Triple-SILAC-Experimenten folgt, ist der Recherche nach nur einmal, in einer ebenfalls proteomischen Untersuchung aufgeführt worden, allerdings ohne weiteren Bezug.<sup>[193]</sup>

Besonders interessant ist der Fakt, dass HAT1 zu erhöhten M/L-Verhältnissen (Experimente A und B) auch H/M-Verhältnisse Werte kleiner als eins aufweist (Tab. 6) und die HAT1-Bindung somit Phosphoserin-10-spezifische Affinitätserniedrigung aufweisen könnte. Grund genug diese potentielle Interaktion von HAT1 und dem H3-Tail intensiveren Untersuchungen und weiterer Validierung zugänglich zu machen (Abschnitt 2.1.3, 2.1.4 und 2.1.5).

Das an Stelle 2 in Tab. 6 stehende FHL3, mit Anreicherungsfaktoren von 8-9, wurde bisher im Zusammenhang zu Histon H3 in dieser Arbeit noch nicht eingehend diskutiert. Das Protein gehört zu den hier aufgefundenen potentiellen H3-Tail-Interaktionspartnern, bei denen bisher keine literaturbezogene Verknüpfung zu Histonen besteht. Das Interaktionen des Adapterproteins FHL3 mit anderen Proteinen außerhalb des Muskelzell-Kontextes nur sehr mäßig erforscht sind, wurde bereits in der Einleitung in Abschnitt 1.4.2 erörtert. Dies zu ändern, war Teilfundament dieser Arbeit; inwiefern durch weitere Validierungen und proteomische Analyse u.a. ein Bezug zu Histonen hergestellt werden konnte wird im Abschnitt 2.2.2 ausführlich dokumentiert und diskutiert.

Im Folgenden werden die Proteine betrachtet, die gekennzeichnet durch H/M-Werte  $> 1$  in beiden Experimenten (A und B), am Pma-modifizierten H3-Tail angereichert gefunden worden sind. Im Diagramm der Abb. 44 sind diese im ersten Quadranten (oben rechts) angesiedelt. Es handelt sich bei diesen wenigen, aber markant hervorstehenden angereicherten Proteinen, um Isoformen der 14-3-3-Proteine (mit blauen Pfeilen markiert) mit Anreicherungsfaktoren im Einzelexperiment zwischen 14 und 58 (Tab. 7).

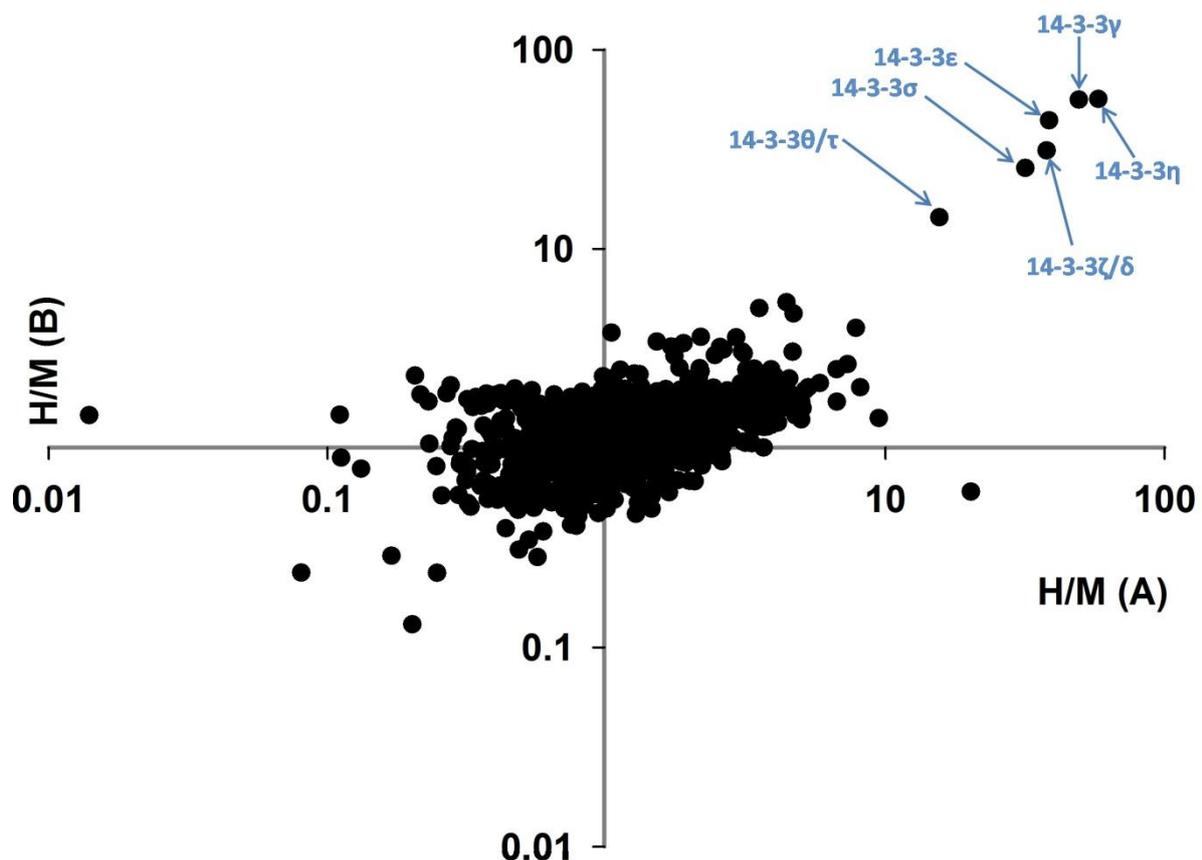


Abb. 44: Diagramm H/M (Experiment A) vs. H/M (Experiment B)

Zu den bereits in der Literatur beschriebenen Isoformen 14-3-3  $\epsilon$  und  $\zeta$  <sup>[43-45]</sup> wurden hier im Triple-SILAC-Experiment alle anderen Isoformen ( $\alpha/\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\eta$ ,  $\sigma$  und  $\theta/\tau$ ) mit Serin-10-phospho-spezifischer Bindungsaffinität zum H3-Tail-Peptid detektiert. Mit Ausnahme von 14-3-3 $\alpha/\beta$ , welches zwar einen

Anreicherungsfaktor von 64,3 aufwies, allerdings nur in Experiment B gefunden worden ist, konnten alle Isoformen eindeutig identifiziert werden. Einige von den 14-3-3-Proteinen wurden zusätzlich zur weiteren Verifizierung herangezogen, insbesondere um den Bindungseinfluss der anderen bekannten Phosphorylierungsstellen am H3-Tail zu untersuchen (Abschnitt 2.1.3 und 2.1.4).

Eines der Projektziele, Phosphatasen und/oder zugehörige regulatorische Untereinheiten durch das Pma-modifizierte H3-Tail-Peptid zu finden, konnten hingegen nicht erreicht werden. Eine mögliche Erklärung wäre, dass die PP1 $\alpha$ -Phosphatase eine stärkere Affinität zum Übergangszustand im Vergleich zum Substrat aufweist, was durchaus für einige Enzyme der Fall ist. Auf dieser Basis dienen beispielsweise Vanadate ( $M_3VO_4$ ) als Verbindungen, die erfolgreich als Phosphataseinhibitor eingesetzt werden.<sup>[194-195]</sup> Das Vanadat-Ion ( $VO_4^{3-}$ ) ist ein Phosphat analogon. Es kann einerseits, isomorph zum Phosphat-Ion ( $PO_4^{3-}$ ), eine tetraedrische Struktur, andererseits aber auch eine trigonale Bipyramide bilden. Letztere entspricht dabei der Struktur des Übergangszustandes der Dephosphorylierungsreaktion. Die Möglichkeit ein solches Übergangsstrukturanalogon in eine peptidische Verbindung einzubringen scheint allerdings kaum realisierbar. Eine andere Erklärung für das Fehlen von Phosphatasen im SILAC-Datensatz könnte aus der Wahl des Mimetikums resultieren. So wirkt sich der Ersatz des Estersauerstoffs (in pS) durch eine Methylengruppe (in Pma) marginal für die Bindungsaffinität der 14-3-3-Proteine aus, scheint aber für die Bindung von Phosphatasen entscheidenden Einfluss zu haben. Ein mutmaßlicher Grund könnte die einhergehende pK<sub>a2</sub>-Erhöhung sein, welche mit dem Einbau der Methylengruppe einhergeht. So liegt dieser bei Pma deutlich höher (7,1) als im natürlichen Phosphatasesubstrat pSer (5,7). Der Einsatz eines pSer-Analogons mit einem physiologischerem pK<sub>a2</sub>-Wert könnte durchaus geeignet sein, um Phosphatase-Komplexe an ein entsprechen modifiziertes H3-Tail-Peptid anzureichern.

### 2.1.3 Validierung Phosphorylierungs-abhängiger H3-Tail-Binder

In Abschnitt 2.1.1.2 wurde bereits angemerkt, dass neben den bisher verwendeten noch weitere H3-Tail-Peptide synthetisiert worden sind. Deren Nutzung in Pull-Downs deckten die Grundlage für vielfältige Untersuchungen aller bekannten Phosphorylierungsstellen am H3-Tail ab (siehe auch Abschnitt 1.2). Die Peptidköder entsprechen durch den Einbau von Phosphoserinen und Phosphothreoninen an definierten Stellen den physiologischen Substraten. Entsprechende Pma-modifizierte Peptide wurden nicht mehr eingesetzt, da der Fokus von hieran nicht mehr auf die Bindung von Phosphatasen gelegt worden ist. Bei der Validierung der H3-Bindeproteine sollte der Bindungseinfluss auf die strukturell natürlichen Phosphorylierungen bezogen werden. Zum Schutz der Phosphorylierungen an den Peptiden wurden die Pull-Down-Zellextrakte mit Phosphatase-Inhibitor behandelt.

In den folgenden Versuchen wurden ausgewählte Proteine aus Tab. 6 und Tab. 7 auf die Phosphorylierung am H3-Tail hin untersucht, was zum einen auf die beiden Serin-Phosphorylierungen an Position 10 und 28, als auch die Threonin-Phosphorylierungen an Position 3, 6 und 11 zutraf (Tab. 8).

Peptid-Bezeichnung	Kurzbezeichnung
D-H3tailCys	D
H3tailCys	H3
H3tailpS10Cys	pS10
H3tailpT3Cys	pT3
H3tailpT6Cys	pT6
H3tailpT11Cys	pT11
H3tailpS28Cys	pS28

Tab. 8: Übersicht der beim Pull-Down verwendeten H3-Tail-Peptide

Um die Reproduzierbarkeit der folgenden Experimente in Form von Immuno-detektierten Pull-Downs gewährleisten zu können, wurde eine homogene Charge nuklearen HeLa-S3-Extrakts<sup>5</sup> verwendet. Die HeLa-S3-Epithelzelllinie hat den Vorteil, dass sie fermentiert werden kann und somit auch größere Mengen an entsprechenden Extrakt in einem Zellernteansatz herzustellen sind. Zusätzlich konnte durch die Wahl eines Immuno-basierten Proteinnachweisverfahrens auf eine Markierung der Extraktproteine durch Isotope verzichtet werden. Des Weiteren konnte durch die Nutzung des HeLa-S3-basierten Extraktes überprüft werden, ob die SILAC-Ergebnisse annähernd allgemeingültige Aussagen für Säugetierzelllinien aufweisen. Da die Nachweisgrenze für die Western Blot-Detektion, im Gegensatz zur LC/MS-Messung der SILAC-Proben aufgrund der Sensitivität niedrigere Ausgangskonzentrationen erforderte, wurde die Einsatzkonzentrationen (*Input*: 300  $\mu$ L 0,1 -1 mg/mL pro Pull Down) entsprechend angepasst.

### 2.1.3.1 H3tailpS10-spezifische Bindeproteine

Zur Verifizierung ausgewählter Proteine mit Phosphorylierungs-spezifischer Affinität zum H3-Tail (Tab. 7, Abb. 44) wurden verschiedene Isoformen der 14-3-3-Proteine, darunter die in der Literatur bereits gut dokumentierte  $\zeta$ -Isoform, per Western Blot nachgewiesen und ihre Affinität zu spezifisch-phosphorylierten H3-Tails dokumentiert. Da es nicht möglich war, die 14-3-3 $\alpha/\beta$ -Isoform zu quantifizieren (siehe letzter Abschnitt), wurde diese Isoform zusätzlich zur bisher ebenfalls relativ unerforschten quantifizierten  $\gamma$ -Isoform, ebenfalls per Immunoblot auf Bindungsspezifität untersucht. Der Abb. 45 kann man entnehmen, dass alle drei Protein-Isoformen nur an den beiden Serin-phosphorylierten H3-Tails angereichert worden sind und dass wie für 14-3-3 $\zeta$  von Winter et al. dokumentiert, in allen Fällen die Bindungsaffinität für H3pS28 größer im Vergleich zu H3pS10 ist (Fluorezenzpolarisation (FP)-ermittelter Kd-Unterschied bei 14-3-3 $\zeta$  um den Faktor 10<sup>[45]</sup>).

<sup>5</sup> Freundlicherweise von Dr. W. Fischle zur Verfügung gestellt.

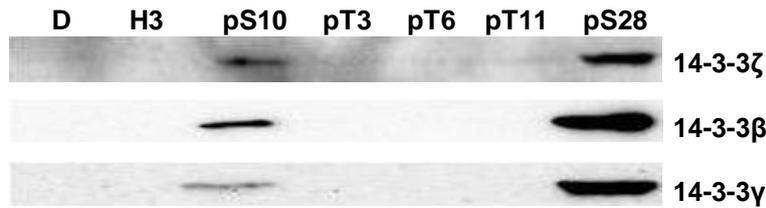


Abb. 45: Western-Blot ausgewählter 14-3-3-Proteine nach Pull-Down mit NE aus HeLa-S3 (*Input*: 1 mg/mL)

### 2.1.3.2 H3tail-spezifische Bindeproteine

Als weitere zu Validierung herangezogenen Proteine dienten WDR5, HAT1, RBBP7, HSC70 und APG2, die mit M/L-Werten >1 (Tab. 6) spezifische Affinität zum unmodifizierten H3-Tail aufwiesen. Sie sind in Abschnitt 2.1.2.2 bereits detailliert vorgestellt worden. Die Bindungseigenschaften vom FHL3-Protein zum H3-Tail sollten ebenfalls per Western Blot untersucht werden. Allerdings musste der Immuno-basierte Nachweis dieses Proteins als nicht realisierbar eingestuft werden. Dies ergab sich aufgrund zu schwacher Detektionseigenschaften des einzigen qualifizierten FHL3-Antikörpers, bezüglich niedrigen Antigenkonzentrationen. Demgegenüber konnten die anderen Proteine auch unter Pull-Down-Bedingungen erfolgreich nachgewiesen werden.

Das Protein WDR5, welches Teil des Histon H3 Lys-4-methylierenden MLL-Komplexes ist, diente als Literaturbekannter H3-Tail-Interaktionspartner als Kontrolle. Die Beobachtung, die für dieses Protein in den folgenden Pull Downs gemacht worden sind, fielen erwartungsgemäß aus. So zeigte sich, dass WDR5 in reduzierter Form an den D-H3-Tail (Abb. 46) bindet. Threonin-3 sitzt im WDR5-Protein in einer Bindungstasche die von den Aminosäureresten Ala47, Ser49, Ala65 und Leu321 flankiert wird.<sup>[151]</sup> Der Western Blot macht deutlich, dass die durch Threonin-3-Phosphorylierung verursachte negative Ladung und/oder der resultierenden sterische Anspruch zu einer deutlichen Reduktion der Bindungsaffinität führt. Die anderen, näher am C-Terminus liegenden Phosphorylierungen üben keinen negativen auf die Bindung von WDR5 zum H3-Tail aus, was impliziert, dass sie in einer Sequenz liegen, die nicht an der Bindungsunterstützung involviert ist.

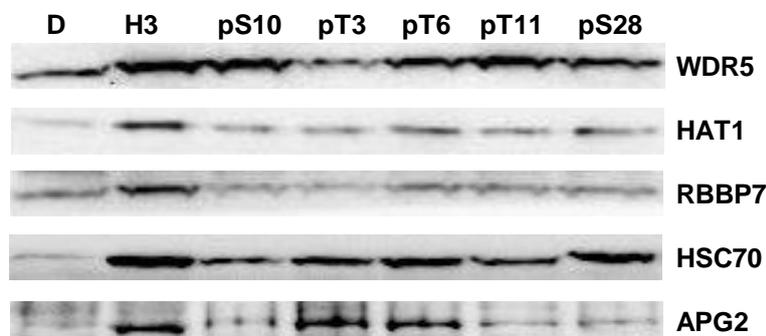


Abb. 46: Western-Blot ausgewählter potentieller H3-Tail-bindenden Proteine (*Input*: 0,1 mg/mL)

Das HAT1-Protein wurde zur weiteren Validierung herangezogen, weil es das einzige darstellte, welches zur deutlichen Anreicherung am unmodifizierten L-H3-Tail eine Bindungsreduktion am Pma-

modifizieren H3-Tail in beiden Experimenten (A und B) aufwies. Diese war in beiden Experimenten durch ein H/M-Verhältniswerte  $< 1$  gekennzeichnet (Tab. 6). Aufgrund der Tatsache, dass RBBP7 einen HAT1-Interaktionspartner darstellt (beiden bilden zusammen den Typ-B-Histonacetyltransferase-Komplex), wurde es ebenfalls untersucht. Beide zeigen im Western Blot eine sehr ähnlichen Beeinflussung betreffend der Bindungsspezifität zu den unterschiedlichen H3-Tail-Peptidködern. Das könnte darauf hindeuten, dass die beiden Proteine auch hier miteinander in Wechselwirkung stehen. Wie im SILAC-Pull-Down (Tab. 6) weisen beide Proteine eine Anreicherung am L-H3-Tail gegenüber dem D-H3-Tail auf. Zusätzlich dazu scheinen die Phosphorylierungen generell an einem Bindungs-unterdrückenden Effekt beteiligt zu sein, wobei dieser für Ser-10 und Thr-3 minimal stärker auszufallen scheint. In dieses Bild passt auch die leichte Reduktion der HAT1-Bindung zum Pma-modifizierten H3-Tail-Peptid im SILAC-Pull-Down. Erstaunlich dabei ist allerdings, dass dieser bindungsunterdrückende Effekt im Western Blot viel eindeutiger ausfällt, als die Werte aus dem SILAC-Experiment ( $H/M = 0,7$  bzw.  $0,5$ ; Tab. 6) es vermuten lassen. Dass die Phosphorylierungsabhängigkeit im Fall von HAT1 und RBBP7 bei der Western Blot-Analyse wesentlich deutlicher zu beobachten ist, lässt sich mit der niedrigeren Pull-Down-Inputkonzentration erklären. Mit  $0,1$  mg/mL (NE-HeLa-S3) wurde diese um den Faktor 20 bzw. 60 niedriger als in den beiden SILAC-Versuchen eingesetzt (Experiment A:  $2$  mg/mL bzw. Experiment B:  $6$  mg/mL). Bei zehnfacher Erhöhung der im Pull-Down eingesetzten HeLa-S3-Extraktkonzentration ( $= 1$  mg/mL) zeigte sich, dass die Bande zum pSer-modifizierten H3-Tail gleichstarke Intensität wie zum unmodifizierten L-H3-Tail-Köders aufwies. Der Unterschied der Bandenintensität vom D-H3-Tail zum L-H3-Tail fiel hingegen auch bei erhöhter Inputkonzentration prägnant differenzierbar aus. Dies deutet darauf hin, dass die Bindungsdiskriminierung durch die Serin-10-Phosphorylierung einen weniger starken Einfluss auf HAT1-Bindung hat, als die durch D-Aminosäuren verursachte (siehe Abb. 80 im Anhang). Zusätzlich wurde gezeigt, dass durch eine Steigerung der Waschschrte die Bindungsunterschiede deutlicher kontrastiert werden können. Eine doppelte Menge Salz im Waschpuffer hingegen führte zu allgemeiner Bindungsunterdrückung. Ähnliches wurde für RBBP7 dokumentiert (siehe hierzu Abb. 80 und Abb. 81 im Anhang).

Zusätzlich zu den vorangehenden validierten Proteinen wurden die Hitzeschockproteine HSC70 und APG2 aufgrund ihrer hohen H3-Tail-Anreicherungsfaktoren ausgesucht, um per Western Blot-Analyse überprüft zu werden. Beide wiesen übereinstimmend zu den SILAC-Pull-Down-Ergebnissen eine ebenso deutlichere Affinität zum unmodifizierten L-H3-Tail auf. Der Einfluss von Phosphorylierungen an unterschiedlichen Positionen des H3-Tails deutet auf eine leicht schwächere Wechselwirkung von HSC70 mit den Serin-10 und Threonin-11 phosphorylierten Peptiden hin. Einen prägnanten Bindungsverlust zum H3-Tail unterlag hingegen APG2 durch die Serin-10- und Serin-28-Phosphorylierung sowie Threonin-11-Phosphorylierung. Unbeeinflusst zeigte APG2 sich stattdessen gegenüber den anderen zwei N-terminaleren Phosphorylierungen an Threonin-3 und -6.

#### **2.1.4 Validierung potentieller H3-Tail-Direktbinder**

Im den letzten beiden Abschnitt konnte anhand von Immuno-basierten Nachweisverfahren gezeigt werden, dass alle dort untersuchten Proteine phosphorylierungs-spezifische Bindung zum H3-Tail aufweisen. Allerdings war eine Differenzierung zwischen direkter und indirekter H3-Tail-Bindung mit

dieser Methode nicht möglich. Das resultiert daraus, dass die Proteine nicht isoliert, sondern in einer komplexen Zellextraktmischung vorlagen und somit für jedes Protein die Möglichkeit bestand, im Komplex über ein anderes H3-Direktbindeprotein an die H3-Tail-Peptidköder zu binden. Um zu überprüfen, bei welchen der ausgewählten Proteine es sich um einen H3-Direktbinder handelt wurden diese rekombinant in *E. coli* hergestellt. Damit sollten sie einzeln auf direkte Wechselwirkungen mit dem H3-Tail und Phosphorylierungs-abhängige Bindung geprüft werden.

#### 2.1.4.1 Klonierung und Expression von WDR5, HAT1, RBBP7, FHL3, HSC70 und APG2

Für die Herstellung der rekombinanten Proteine HAT1, RBBP7 und FHL3 wurde die jeweils verifizierte cDNA von Imagenes aus der Spezies Maus bezogen und mittels der üblichen Klonierungstechniken wie Polymerase-Kettenreaktion (PCR-*Polymerase Chain Reaction*), Restriktionsverdau und Ligation, in *E. coli*-Expressionsplasmide kloniert (für Einzelheiten siehe Abschnitt 4.3.6). In Abb. 47 sind jeweils zwei der PCR-Ansätze von RBBP7, HAT1 und FHL3 im UV-Licht visualisierten Ethidiumbromid-Agarosegel zu sehen, wobei jeweils mit Restriktionsschnittstellen-amplifizierte DNA-Banden der zu erwarteten Größe detektiert werden konnten. Weitere Verwendung für den Versuchsverlauf fand jeweils PCR-Ansatz 1.

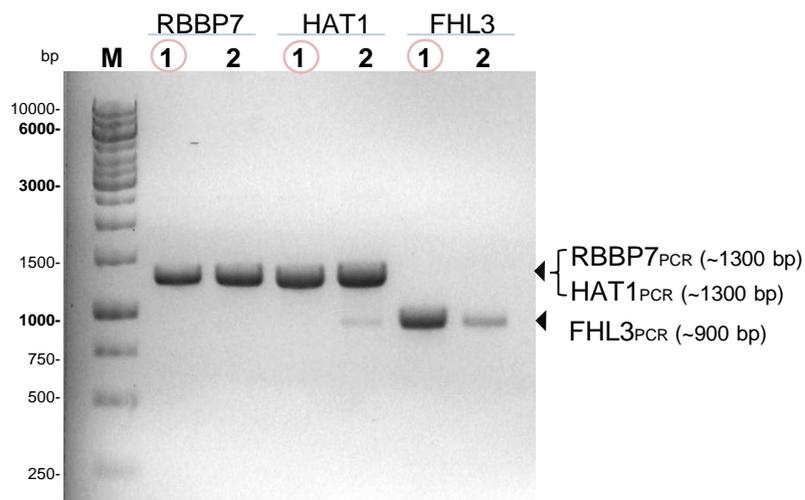


Abb. 47: ETBr-1%-Agarosegel der PCR-Ansätze von RBBP7, HAT1 und FHL3

Die Gene von HAT1, RBBP7 und FHL3 wurden durch eine *SacII*-Schnittstelle der MCS (*Multiple Cloning Site*) und eine davon außerhalb liegende Restriktionsschnittstelle (*AvrII*) in den pET42b(+)-Vektor kloniert, welcher ein Glutathion-S-Transferase-(GST)-Genfusionsystem beinhaltet. GST (26 kDa) ist ein beliebter Proteintag bei der Festphasenimmobilisierungs-basierten Reinigung von Proteinen und hat den Vorteil, dass er allgemein gut in *E. coli* exprimiert wird. Wird GST durch Klonierung N-terminal an das eigentliche Protein durch Konstruktion eines Fusionsproteins angefügt, wie im Fall von HAT1, RBBP7 und FHL3, resultiert daraus oft eine verbesserte Löslichkeit des gesamten Fusionsproteins. Die Abb. 48 skizziert zur Übersicht die Klonierung und Expression von Fusionsproteinen, wobei angedeutet ist, dass einige gängige Plasmide bereits Schnittstellen für Proteasen enthalten können, um den Affinitätstag anschließend abspalten zu können.

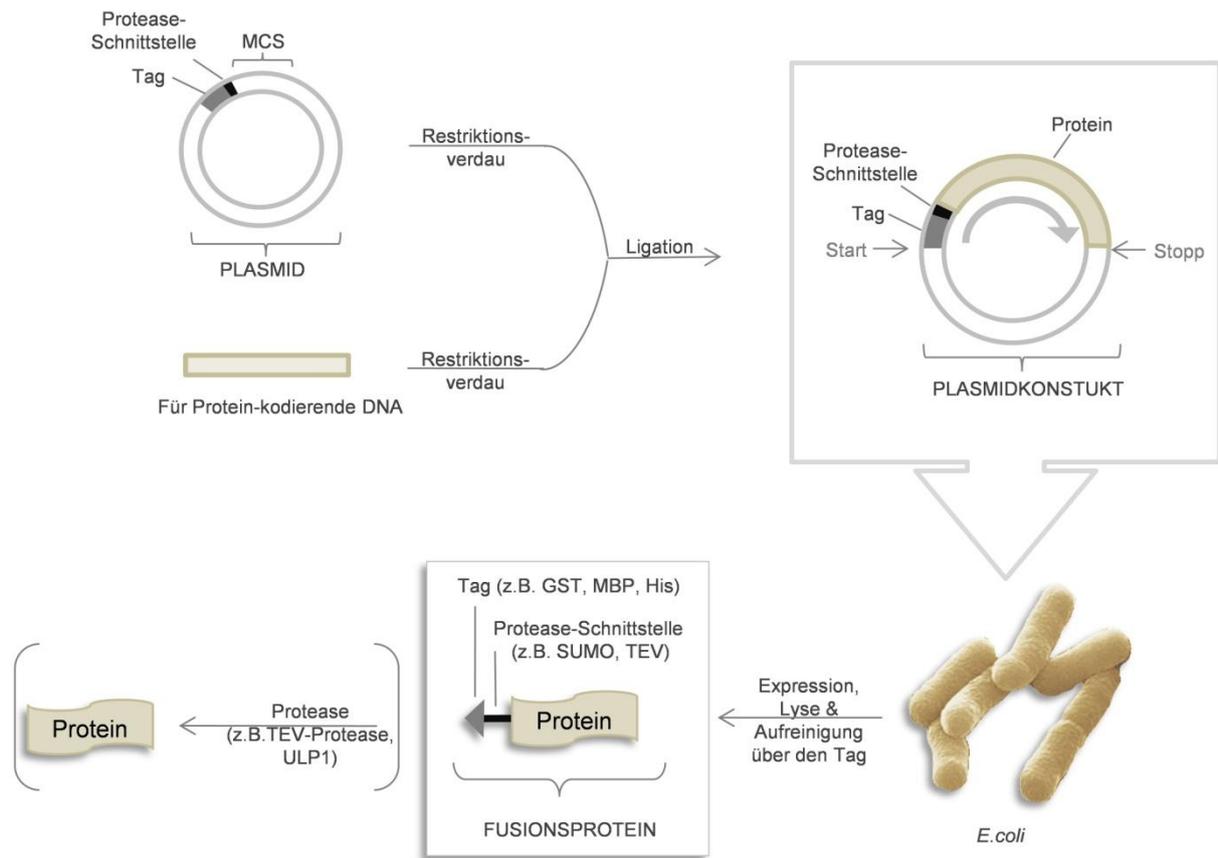


Abb. 48: Schema zur Klonierung und Expression von Fusionsproteinen

Generell erfolgte die Isopropyl- $\beta$ -D-Thiogalactopyranosid-(IPTG)-induzierte Proteinexpression nach Transformation (siehe Abschnitt 4.3.7) der *E. coli*-Stämmen BL21(DE3)pLysS oder BL21(DE3)Rosetta mit den entsprechenden Plasmidkonstrukten (Abschnitt 4.4.1). Das WDR5-Plasmid (Stamm-Vektor: PMCGS7) war ein Geschenk von Prof. Dr. M. S. Cosgrove und enthielt ein His-WDR5-Genkonstrukt. Der His-Tag besteht in der Regel lediglich aus fünf bis sechs Histidinresten, die dem Protein N- oder C-terminal angefügt werden. Dieser hat somit minimalen Einfluss auf das Protein, aber erzielt standardmäßig bei der Proteinaufreinigung durch Festphasen-basierte Affinitätschromatografie gute Erfolge. Poly-His-getaggte Proteine wie His-WDR5 (37 kDa) wurden allgemein nach Zellaufschluss per Ni-NTA-(Nitrilotriessigsäure)-Agarose, GST-getaggte Proteine wie GST-HAT1 (75 kDa), GST-RBBP7 (74 kDa) und GST-FHL3 (58 kDa) über Glutathion-Sepharose 4B affinitätschromatographisch im Batch-Verfahren aufgereinigt (Abschnitt 4.4.2). Zur Elution von der Festphase wurde im ersten Fall Imidazol (250 mM), im zweiten Fall reduziertes Glutathion (10mM) im entsprechenden Puffer verwendet. His-WDR5 und GST-FHL3 wurden mit 10 bzw. 4 mg (pro 1,4 L Expressionsansatz) in guter Ausbeute erhalten (Abb. 49 a und d), während GST-RBBP7 von beiden *E. coli*-Stämmen vergleichsweise schlecht produziert wurde und nur 0,4 mg Protein (pro 1,4 L Expressionsansatz) lieferte (Abb. 49 c). Dem zugrundeliegend wurden nachfolgende Expressionsansätze mengenmäßig vergrößert (bis zu 2,8 L). GST-HAT1 (Abb. 49 b) konnte nicht frei von zwei Abbruchfragmenten (55 kDa und 26 kDa-Bande-vermutlich GST) in *E. coli* exprimiert werden.

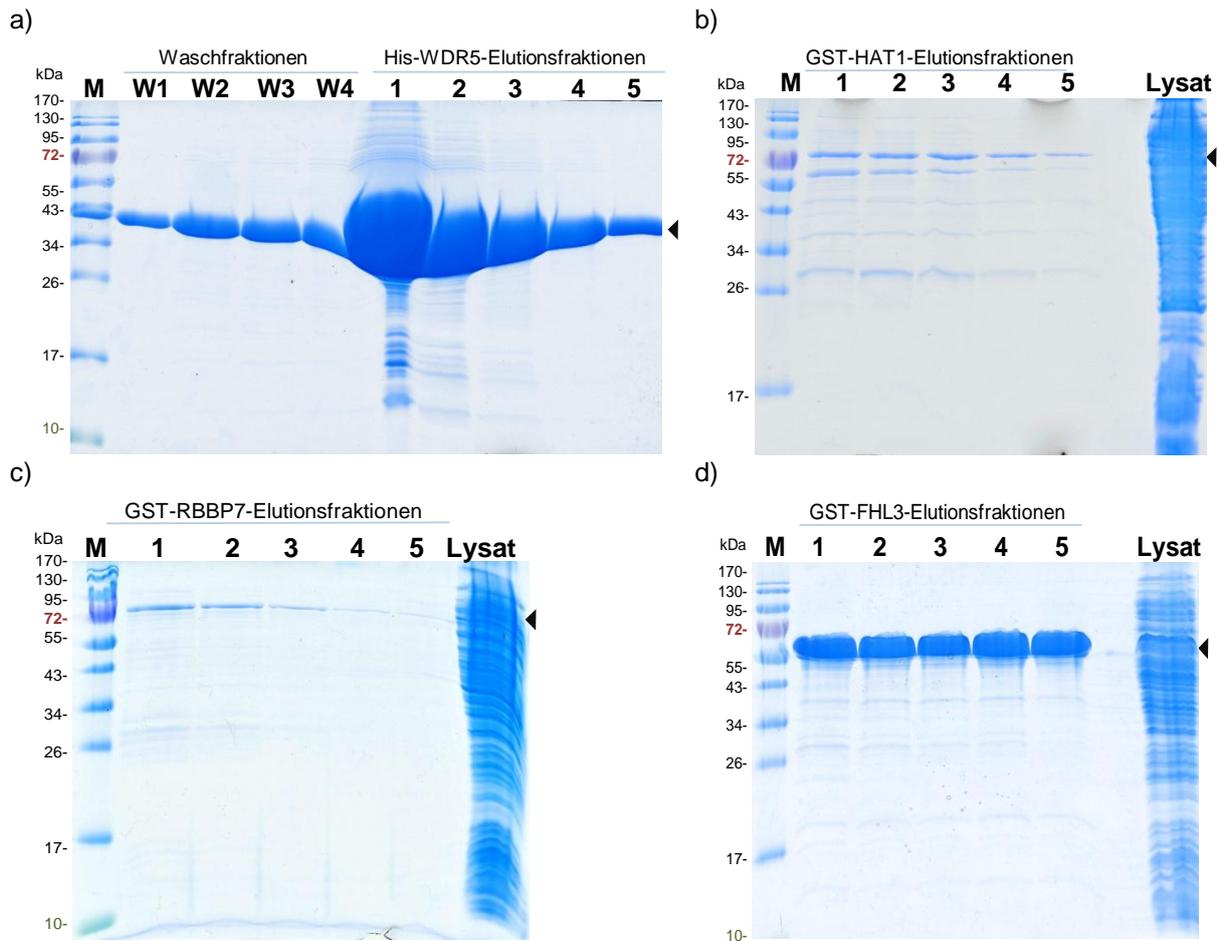


Abb. 49: Coomassiegel von Proteinaufreinigungen a) His-WDR5 b) GST-HAT1 c) GST-RBBP7 d) GST-FHL3

Eine zwischen den Genabschnitten liegende TEV-Protease-Schnittstelle in den GST-Konstrukten von HAT1, RBBP7 und FHL3 sollte zur anschließenden Abtrennung von GST von den Zielproteinen genutzt werden. Diese wurde bereits auf DNA-Ebene beim Design der PCR-Vorwärts-Oligonukleotidprimer berücksichtigt und die resultierende Fusionsprotein-interne Aminosäuresequenz ENLYFQS wurde von der eingesetzten Cysteinprotease TEV (*Tobacco etch virus*) erkannt und führte mit der Spaltung zwischen Q und S zur Abtrennung von GST (Abb. 50 a). Nach der TEV-Proteolyse konnten GST und die eingesetzten katalytischen Mengen Poly-His-getaggtter TEV-Protease durch Inkubation mit Glutathion-Sepharose und Ni-NTA aus der Proteinlösung entfernt und im Falle von RBBP7 (48 kDa) und FHL3 (32 kDa) reine Proteinfractionen erhalten werden (siehe Abb. 51). Ferner wurde festgestellt, dass GST-HAT1 betreffend durch TEV-Proteaseverdau zwar eine neue Bande entstand, deren Molekulargewicht (~60 kDa) aber keineswegs dem von HAT1 (49 kDa) entsprach (Abb. 50 a, roter Pfeil). Man vergleiche demgegenüber in Abb. 50 a die erfolgreichen GST-Abspaltungen der Fusionsproteine GST-FHL3 und GST-RBBP7 in den beiden Gelspuren jeweils links und rechts daneben. Diese Beobachtung deutete darauf hin, dass die Struktur von HAT1 durch die N-terminale GST-Fusion gestört wurde. Aufgrund dieser Tatsache wurde entschieden, HAT1 als Fusionsprotein mit einem His6-Tag herzustellen. Dafür wurde das HAT1-Gen mittels PCR mit NdeI/XhoI-Schnittstellen amplifiziert und anschließend in den pET23b(+)-Vektor kloniert, so dass ein C-terminal His-getaggttes HAT1-Protein erzeugt werden konnte. Die kombinierten HAT1-

Elutionsfraktionen der Festphasen-basierten Aufreinigung über eine Ni-NTA-Matrix wurden, aufgrund der nicht vollständigen Abtrennung des Proteinhintergrundes (Abb. 50 b) nach Dialyse, nochmals mittels Ni-NTA aufgereinigt.

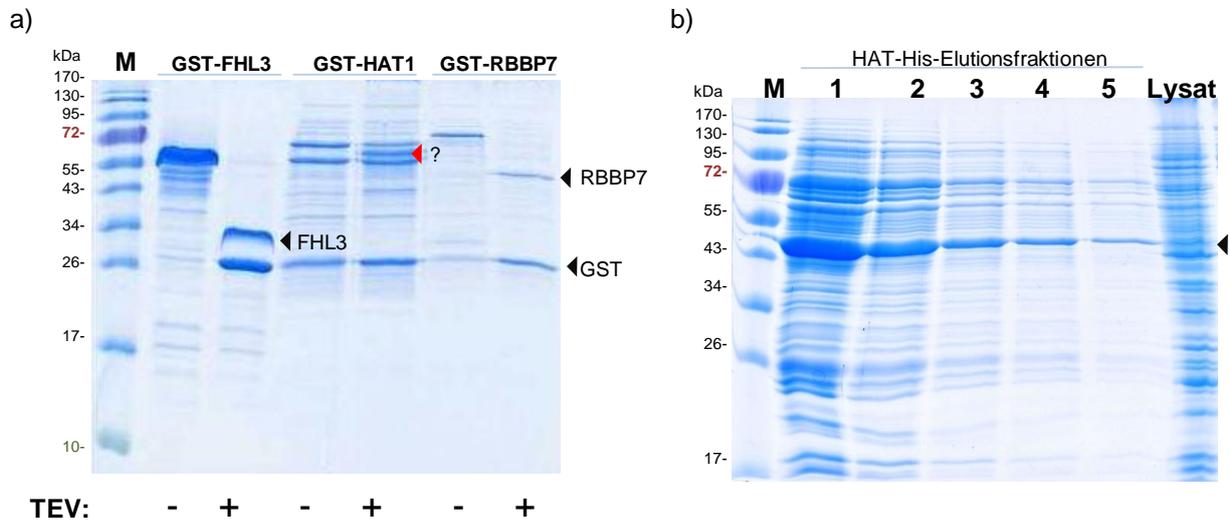


Abb. 50: Coomassiegel a) TEV-Verdau von GST-TEV-Proteinen b) HAT1-His-Proteinaufreinigung

Diesmal sorgten geringe Mengen Imidazol (12,5 mM) in der Inkubationslösung zur Unterdrückung unspezifischer Wechselwirkungen dafür, dass auch HAT1 nahezu sauber erhalten wurde. Das Coomassie-SDS-Gel in Abb. 51 zeigt eine Übersicht der gereinigten Proteine His-WDR5, HAT1-His, GST-RBBP7, RBBP7, GST-FHL3 und FHL3.

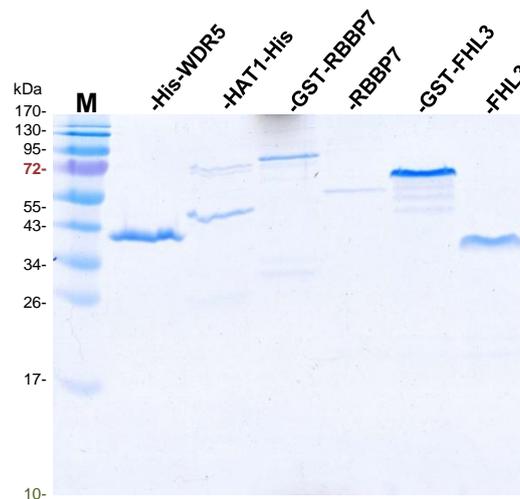


Abb. 51: Coomassiegel der sauberen rekombinanten Proteine

Für die Proteinsynthese von APG2 und HSC70 wurden freundlicherweise Plasmidkonstrukte, die humane DNA-Sequenzen für die Hitzeschockproteine im T7-Promotor-basierten Wirtsvektor pCA528 enthalten, von Prof. Dr. B. Bukau zu Verfügung gestellt. Humanes APG2 ist zu 90% identisch mit dem

Protein aus der Maus und der Unterschied bei HSC70 liegt nur bei einer einzigen Aminosäure. Die BL21(DE3)Rosetta-*E. coli*-Stämme wurden mit den Plasmiden transformiert und anschließend durch IPTG-Induktion der Proteinsynthese in Form von His-SUMO-Fusionsproteinen zugänglich gemacht (Abschnitt 4.4.1). Das SUMO-(*small ubiquitin-related modifier*) oder auch Smt3-Protein ist ein 11 kDa großes Protein, welches in Allgemeinen als posttranslationale Modifikation durch den Vorgang der SUMOylierung Proteine markieren kann und infolgedessen in vielfältige zelluläre Prozesse involviert ist. In Fusionsprotein-Expressionssystemen wird es ähnlich wie GST zur Löslichkeitsunterstützung und Stabilisierung von in *E. coli* rekombinant hergestellten Proteinen genutzt. Zusätzlich enthält es die Erkennungsstelle für die aus Hefe stammende SUMO-Cystein-Protease ULP1 (Ubiquitin-like-specific protease 1) in Form der C-terminalen Reste GGATY. Dies macht eine nachträgliche SUMO-Abtrennung unter hydrolytischer Bindungsspaltung zwischen G und A möglich. Im His-SUMO-APG2-Genkonstrukt wurden zusätzliche Nukleotide eingefügt, welche zwischen SUMO und APG2 für zwei Glycine kodierten, um die ULP1-gesteuerte Proteolyse dieses Fusionsproteins zu erleichtern. Aus Abb. 52 a und b ist ersichtlich, dass His-SUMO-HSC70 (~82 kDa) und His-SUMO-APG2 (~105 kDa) erfolgreich mittels Affinitätschromatographie per Ni-NTA-Material aus der *E. coli*-Proteinmischungen isoliert werden konnten. Zusätzliche Proteinbanden im unteren Massenbereich (~ 20 kDa) in beiden Gelen resultieren lediglich durch His-SUMO-Fragmente aus unvollständiger Expression. His-SUMO-APG2 läuft in SDS-Gel nicht seiner Masse entsprechend, sondern höher (ca. bei 120 kDa), was vermutlich der Existenz mehrheitlich saurer Aminosäuren in der Proteinsequenz geschuldet ist und nicht mit einer größeren Molekularmasse korreliert.

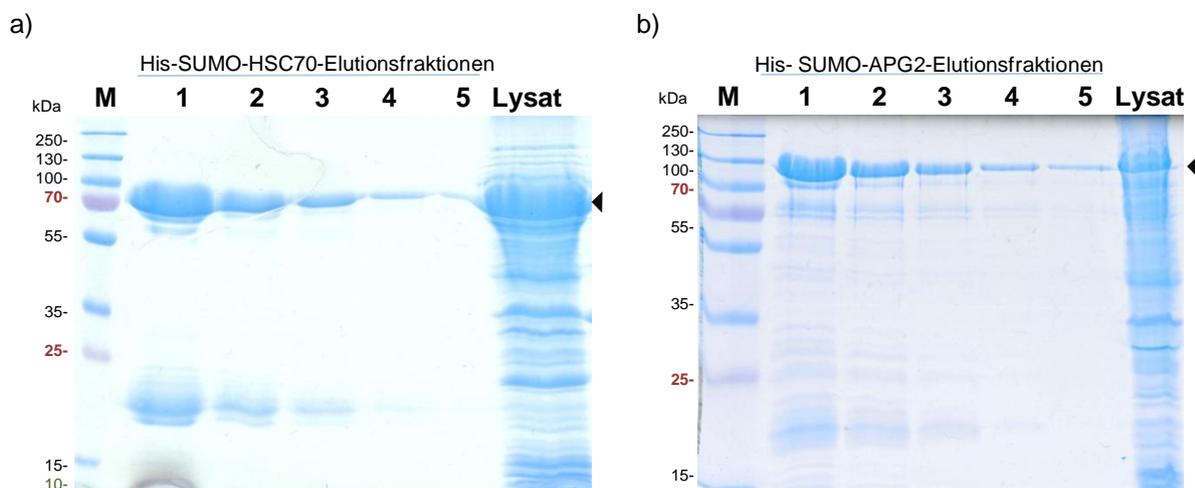


Abb. 52 : Coomassiegele von Proteinaufreinigungen a) His-SUMO-HSC70 b) His-SUMO-APG2

Die anschließende His-SUMO-Abspaltung erfolgte in beiden Fällen erfolgreich, wie in Abb. 53 a am Beispiel an His-SUMO-APG2 gezeigt. Für die Abtrennung der His-SUMO-Bestandteile wurde eigens ein C-terminal His-getaggtetes Kernfragment der ULP1 (27 kDa)<sup>6</sup> genutzt, welches auf Basis des pT7-Wirtsvektors pCA535 in *E. coli* exprimiert worden war (Abb. 53 b, rechts). Nach Abtrennung des His-

<sup>6</sup> ULP1-His-Plamid wurde ebenfalls von Prof. Dr. B. Bukau zur Verfügung gestellt

SUMO-Fragments und der ULP1-His-Protease per Ni-NTA-Agarose konnten HSC70 (71 kDa) und APG2 (94 kDa) in reinen Fraktionen erhalten werden (Abb. 53 b).

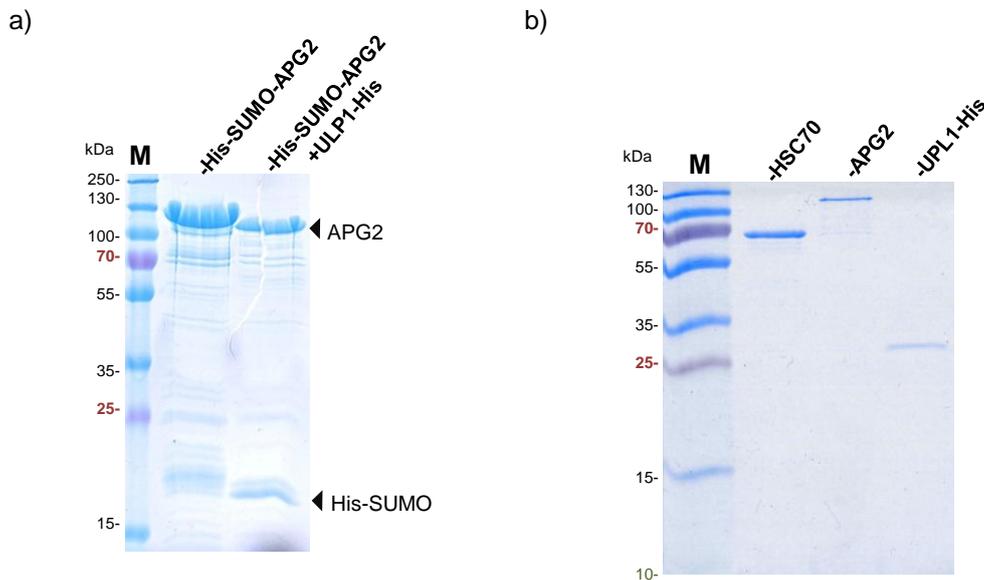


Abb. 53: Coomassiegele von a) His-SUMO-APG2 (-/+ UPL1) b) HSC70, APG und ULP1-His (aufgereinigt)

#### 2.1.4.2 Pull-Downs mit rekombinanten Proteinen

Im Folgenden kamen neben den oben beschriebenen rekombinanten Proteinen auch rekombinantes kommerziell erhältliches 14-3-3 $\gamma$  (Sigma-Aldrich) zum Einsatz. Es wurden alle verfügbaren Peptidköder, also unmodifizierter D- und L-H3-Tail sowie die Phosphoserin-(pS10 und pS28) und Phosphothreonin-modifizierten H3-Tail-Peptide (pT3, pT6 und pT11) eingesetzt. Die immobilisierten Peptide wurden jeweils mit 5  $\mu$ M Proteinlösung inkubiert. Zur Erhöhung der spezifischen Bindungsaffinität wurde der Inkubationslösung als unspezifischer Binder 500  $\mu$ M BSA oder Myoglobin zugefügt (siehe Abschnitt 4.5.3). In Abb. 54 sind die Pull-Down-Ergebnisse als Ausschnitte aus dem jeweiligen Pull-Down-Coomassie-SDS-Gel in der Übersicht dokumentiert. Für die 14-3-3  $\gamma$ -Isoform, welche an oberster Stelle aufgeführt ist, ergibt sich ein erwartetes klares Bild mit Bindung zu den beiden Phosphoserin-modifizierten H3-Tail-Peptiden. Analog zur endogenen Form (Abschnitt 2.1.3) bindet diese ebenfalls etwas stärker an das Phosphoserin-28-modifizierte H3-Tail-Peptid. Rekombinantes WDR5 zeigt im Vergleich zur endogenen WDR5-Variante (Abb. 46) eine noch eindeutigeren Affinität zum unmodifizierten L-H3-Tail gegenüber dem D-H3-Tail, als auch einen eindeutigeren Bindungs-unterdrückenden Einfluss durch Threonin-3-Phosphorylierung. Für die rekombinanten Versionen von HAT1, RBBP7, FHL3 und APG2 zeigt sich allgemein für jeden Peptidköder eine gewisse, aber dennoch unspezifische Affinität. Interessanterweise bindet auch rekombinantes HSC70 relativ gleich stark an alle H3-Tail-Peptide mit einer eindeutigen Ausnahme. Die Affinität zum D-H3-Tail ist wie bereits beim natürlichen HSC70 (Tab. 6, Abb. 46) drastisch reduziert.

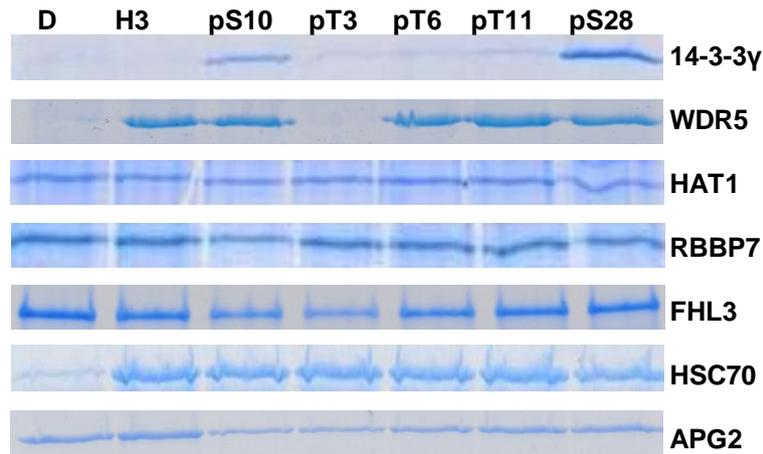


Abb. 54: Coomassie-Ausschnitte von Pull-Downs mit verschiedenen rekombinanten Proteinen

### 2.1.5 Validierung der Interaktion zwischen HAT1 und dem H3-Tail

Resultierend aus den SILAC-Pull-Down-Ergebnissen für die Histonacetyltransferase 1 und die Bestätigung derer durch Western-Blot-Analyse (Abschnitt 2.1.3.2), wurde das Interesse dahingehend gelenkt, die phosphorylierungs-abhängige Affinität von HAT1 zum H3-Tail weiterhin zu untersuchen. Wie im letzten Abschnitt an Pull Downs mit rekombinanten HAT1-Protein gezeigt, scheint es sich bei HAT1 allerdings nicht um einen direkten Interaktionspartner vom H3-Tail zu handeln (siehe Abb. 54). Nach diesem Ergebnis stellte sich die Frage, ob sich das Serin-10-Phosphorylierungs-beeinflusste Bindungsverhalten des endogenen murinen HAT1-Proteines zum H3-Tail ebenso signifikant im Western Blot dokumentieren lässt, wie für die humane Form aus HeLa-S3-Zellen (Abb. 46). Vergleiche der HAT1-Pull Downs der endogenen Proteine aus nuklearen Extrakten (Swiss 3T3-Fibroblasten bzw. HeLa-S3) bestätigten ein analoges Serin-10-phosphorylierungs-abhängiges Bindungsverhalten von der murinen und humanen HAT1-Variante zum H3-Tail (Abb. 55).

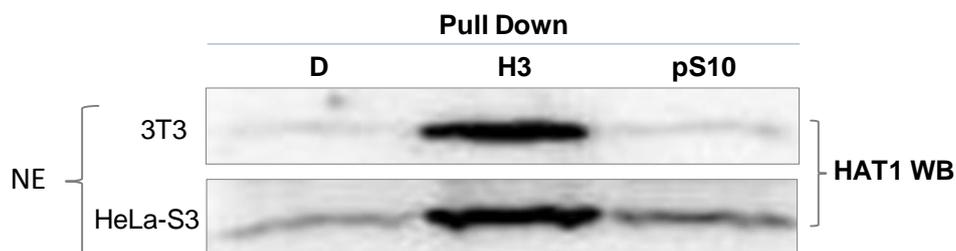


Abb. 55: HAT1-Western Blots für Pull Downs aus NE aus 3T3 (oben) oder HeLa-S3 (unten)

Aus diesem Grund sollte das Ergebnis, welches aus den Pull-Downs mit rekombinanten HAT1-Protein hervorging und das offenbarte, dass HAT1 keinen direkten H3-Binder darstellt (Abschnitt 2.1.4.2), manifestiert werden. Um diese Annahme zu bestätigen, sollte nachgewiesen werden, dass das in *E.coli* rekombinant hergestellte Protein auch tatsächlich im korrekten Faltungszustand vorliegt. Wäre dies der Fall, müsste es Acetylierungsaktivität am Zielprotein Histon H4 zeigen. Für den Nachweis wurde das K5- und K12-acetylierende Enzym, unter Zugabe von Acetyl-CoA, mit einem aus

Kälberthymus isolierten Histon-Gemisch für 2 Stunden umgesetzt. Als Aktivitätsnachweis sollte die Acetylierung von K12 in Histon H4 dienen. Der Western Blot in Abb. 56 zeigt, dass die K12-Acetylierung von Histon H4 durch rekombinantes HAT1 erfolgreich war (Bande 1). Zum Vergleich fand unter Acetyl-CoA-Entzug keine K12-Acetylierung statt (Bande 2). Folglich konnte davon ausgegangen werden, dass das rekombinante HAT1 richtig gefaltet vorlag. Somit wurde die Vermutung gefestigt, dass es sich bei HAT1 um keinen direkten, sondern um einen indirekten H3-Tail-Interaktionspartner handelt. Zur Kontrolle der Versuchsbedingungen wurde des Weiteren eine aktive HAT1-Variante aus Hefe (yHAT) eingesetzt, deren Aktivität durch Experimente auf Grundlage anderweitiger Forschungsziele bestätigt worden war (vergleiche Bande 3 und 4).

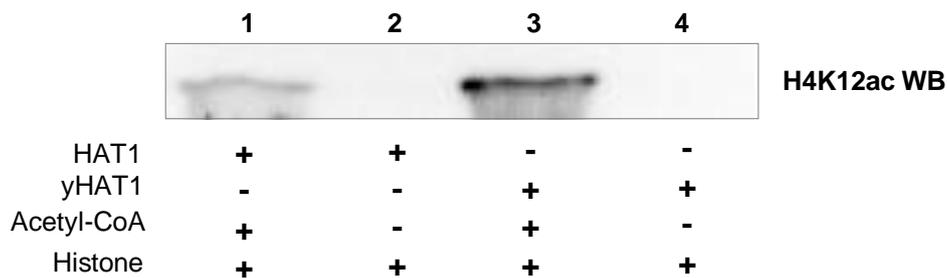


Abb. 56: Western Blot vom rekombinanten HAT1-Aktivitätstest (Histone H4-K12-Acetylierung)

Anlässlich dieses Resultats lag die Suche von möglichen HAT1-Interaktionspartnern, die direkte H3-Tail-Bindung aufweisen und über die HAT1 indirekt an den H3-Tail binden könnte, nahe. Dokumentiert wurden eine solche H3-Tail-Direktbindung durch Pull-Down-Experimente für die Proteine WDR5 und HSC70. Diese beiden wiesen auch in ihrer rekombinanten Form deutliche direkte und spezifische Wechselwirkung zum L-H3-Tail auf (siehe Abb. 54). Damit zeichneten sie sich als geeignete potentielle Interaktionspartner aus, über die HAT1 an den H3-Tail Serin-10-Phosphorylierungs-abhängig binden könnte. Da die beiden rekombinanten Proteine (WDR5 und HSC70) selbst keine Serin-10-Phosphorylierungs-abhängige H3-Tail-Affinität aufweisen, konnte angenommen werden, dass sie diese Position nicht als Interaktionsquelle blockieren. Beide oben erwähnten Möglichkeiten der Proteininteraktion wurden im gemeinsamen Pull-Down-Versuch mit HAT1 überprüft. Den gleichstarken HAT1-Banden im Coomassiegel (Abb. 57 a und Abb. 57 b) kann man allerdings entnehmen, dass die unspezifische H3-Tail-Bindung von HAT1 zum den eingesetzten H3-Tail-Köderpeptiden nicht durch eines der beiden Proteine beeinflusst wird. Damit konnte keinerlei Wechselwirkung zwischen HAT1 und WDR5 oder HAT1 und HSC70 in den Pull-Down-Versuchen mit dem rekombinanten Proteinen festgestellt werden.

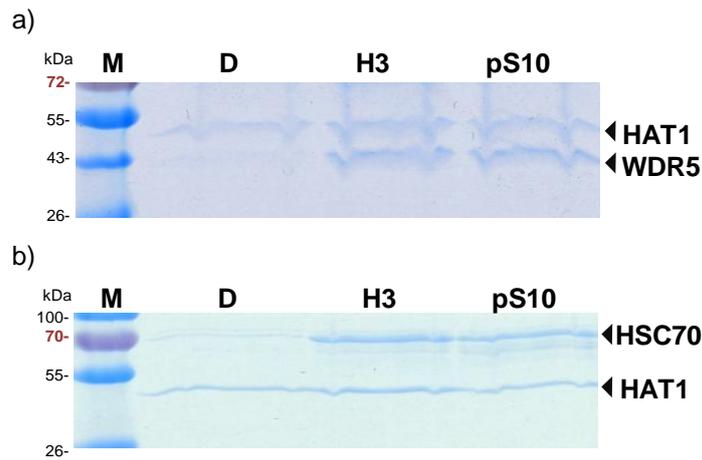


Abb. 57: Coomassiegele von Pull-Downs a) HAT1+WDR5 b) HAT1+HSC70

WDR5 und HSC70 stellten, aufgrund ihres hier experimentell bestimmten direkten Bindungsverhaltens zum H3-Tail die einzigen Proteine aus Tab. 6 dar, die für eine HAT1-Interaktion prädestiniert gewesen wären.

Um festzustellen, ob sich die H3-Tail-Bindungsspezifität von rekombinanten HAT1 wohlmöglich durch Komponenten des nuklearen Extrakts beeinflussen lässt, wurde beides zusammen inkubiert. Dabei betraf das eingesetzte Verhältnis von HAT1-His-Menge zur Gesamtproteinkonzentration des nuklearen Extraktes 1:100 (10 µg HAT-His pro 1 mg/mL 3T3-NE). Bei der Immuno-Blot-Detektion des Pull-Downs wurde ein Antikörper verwendet, der spezifisch Poly-His-getaggte Proteine erkennt. In Abb. 58 sieht man, dass das rekombinante His-getaggte HAT1, wie bisher, keine Änderung der Bindungsaffinität bezüglich der einzelnen Peptidköder aufzeigt, wie es bei der endogenen Variante der Fall ist.

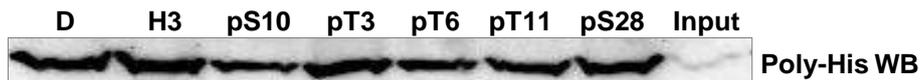


Abb. 58: Western Blot vom Pull-Down mit rekombinanten HAT1 + NE (3T3)

Dieses Ergebnis könnte darauf hinweisen, dass eine Modifikation in der Proteinsequenz von HAT1 verantwortlich für die phosphorylierungs-abhängige Bindung zum H3-Tail ist. Diese kann durch das Fehlen von Cofaktoren im nuklearen Extrakt nicht nachträglich erfolgen, da das Zelllysate dialysiert wurde.

Bisher ist, außer einer Acetylierung des Alanin-2<sup>[196]</sup>, nur eine weitere Modifikation in HAT1 bekannt. Dabei handelt es sich um die Phosphorylierung von Serin-361 in humanen HAT1, welche im C-terminalen Bereich in dem Sequenzabschnitt -LISPYK- gefunden wurde (Abb. 82 im Anhang).<sup>[197-198]</sup> Der C-Terminus ist unter den verschiedenen Organismen im Gegensatz zur katalytischen Domäne in seiner Sequenz eher inhomogen<sup>[199]</sup>, allerdings lässt sich auch in der murinen HAT1-Variante eine solche Sequenz finden, in der Serin in Position 358 liegt.

In einem Phosphorylierungsassay sollte die pS358-Modifikation in rekombinantes HAT1 eingeführt werden und im Anschluss der Einfluss der phosphorylierten Variante bezüglich des H3-Tails getestet werden. Als Proteinkinase wurde CDK1-cyclin B unter Anwesenheit von ATP eingesetzt, welches Substrate mit der Konsensussequenz **S/T-P-X-R/K** phosphoryliert. Die HAT1-Sequenz weist 19 Serine und 28 Threonine auf, wovon nur Serin-358 in der richtigen Sequenz positioniert ist. Durch MALDI-MS-Messung der umgesetzten Probe konnte HAT1 mit einer Sequenzabdeckung 86% erfolgreich identifiziert (Abb. 83 a im Anhang) und die Phosphorylierung in der Probe pHAT (= HAT1pS358) im Vergleich zur unphosphorylierten Probe HAT1 nachgewiesen werden (Abb. 83 b im Anhang). Für die Pull-Down-Versuche wurde HAT1 zunächst für 2 Std. bei 30°C mit der Kinase umgesetzt. Dies resultierte in keiner signifikanten Änderung des Bindungsverhaltens von pHAT1 zu den unterschiedlichen H3-Tail-Peptidködern (Abb. 84 im Anhang). Der Phosphorylierungsgrad nach 2 Stunden Umsatz wurde per MS-Messung lediglich mit 10% ermittelt. Die Umsetzung von HAT1 mit CDK1-cyclin B über einen längeren Zeitraum führte allerdings zur Zersetzung des Proteins. Somit war es unter den Umständen der Proteindegradierung nicht möglich HAT1 *in vitro* spezifisch und quantitativ an S358 zu phosphorylieren. Eine weitere Forschungsinvestition in diese Richtung wurde nicht unternommen. Dies begründete sich durch die Tatsache, dass diese Phosphorylierungsstelle innerhalb des murinen HAT1-Protein-Kontextes nicht in der Literatur validiert vorliegt. Des Weiteren könnte statt einer Modifikation im HAT1-Protein auch eine bisher völlig unbekannte Verbindung mit HAT1 in Wechselwirkung stehen und diese an der H3-Tail-Bindung beteiligt sein. So werden, wie bereits erwähnt (Abschnitt 1.6.1), gänzlich unbekannte Proteine nicht im SILAC-Datensatz aufgeführt, weil generell nur ein Proteinabgleich mit einer Datenbank erfolgt. Zusätzlich dazu besteht die Möglichkeit, dass dieses unentdeckte Protein in völlig unbekannter Konzentration zu der hier eingesetzten HAT1-His-Menge (Experiment von Abb. 58) ihren Einfluss ausübt.

Die Ergebnisse dieses Projektes führten durch Anwendung quantitativer Triple-SILAC-Pull-Down-Technik zum einem proteomanalytisch Spektrum an H3-Tail-spezifischen Interaktionspartnern aus 3T3-Kernextrakten. Es ist gelungen nahezu 1000 Proteine eindeutig zu identifizieren. Aus diesen konnten spezifische Binder des unmodifizierten H3-Tails durch den Proteinanreicherungsabgleich zwischen einem L-H3-Tail-Peptidköder und D-H3-Tail-Peptidköder als solche identifiziert werden. Unter den jeweils an L-H3-Tail angereicherten Proteinen befanden sich bereits bekannte H3-Bindeproteine die z.T. Proteinkomplexen zugeordnet werden konnten (NuRD-Komplex) und Proteine, die sowohl bei der transkriptionellen Aktivierung (WDR5, MYST2), als auch bei der Genrepression (EHMT2, KDM5B) involviert sind. Es war möglich Serin-10-spezifische H3-Bindeproteine durch Einsatz des Pma-modifizierten H3-Tail-Peptids zu entdecken. Dies traf auf alle 14-3-3-Isoformen, darunter auch die bisher nicht genau beschriebenen  $\alpha/\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\eta$ ,  $\sigma$ ,  $\theta/\tau$ -Isoformen, zu. Das anteilige Ziel neue Phosphatasen und ihre regulatorischen Untereinheiten an den Pma-modifizierten H3-Tail anzureichern und zu identifizieren konnte nicht erreicht werden.

Ferner gelang es erstmals die Histonacetyltransferase 1 als spezifisches H3-Tail-Bindeprotein zu identifizieren. Mittels WB-Analyse war es möglich zu bestätigen, dass Serin-10-Phosphorylierung die Bindung von HAT1 und RBBP7 zum H3-Tail blockiert, was bis jetzt noch nicht dokumentiert worden ist. Zusätzlich wurden unterschiedliche Einflüsse aller bekannten Phosphorylierungsstellen am H3-Tail

(pS10, pS28, pT3, pT6 und pT11) in Bezug auf die Bindung der gerade erwähnten Proteine und zudem für die Hitzeschockproteine HSC70 und APG2 aufgedeckt. Dabei stellte sich heraus, dass die H3-Tail-Bindung von HAT1 und RBBP7 allgemein durch Phosphorylierung unterdrückt wird, während die Bindung von HSC70 zum H3-Tail lediglich durch S10- und T11-Phosphorylierung leicht geschwächt, die Bindung von APG2 signifikant durch S10-, T11- und S28-Phosphorylierung negativ beeinflusst wird.

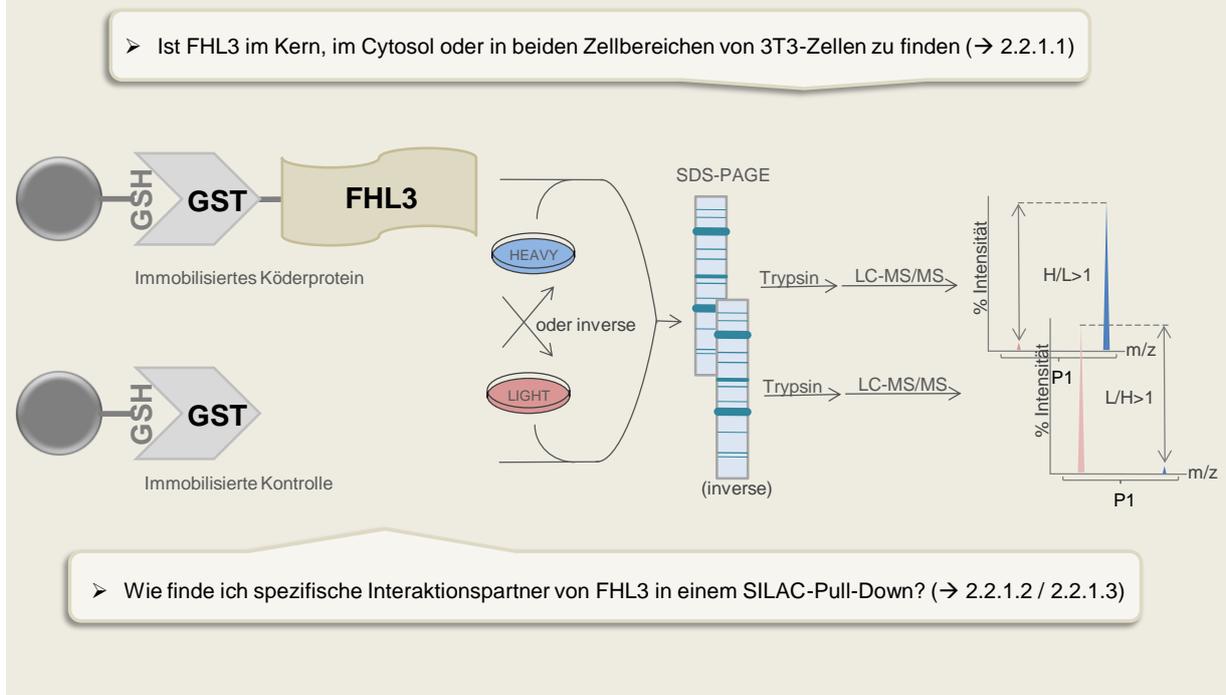
Des Weiteren konnten die Proteine WDR5, HAT1, RBBP7, HSC70 und APG2 durch Herstellung ihrer rekombinanten Homologe aus ihrem Proteinextrakt-Kontext isoliert hergestellt werden und somit genauer auf ihre phosphorylierungs-abhängigen Bindungseigenschaften zum H3-Tail untersucht werden. Dabei konnten folgende Proteine (HAT1, RBBP7 und APG2) als indirekte H3-Tail-Binder ausgemacht werden, während für das Hitzeschockprotein HSC70 erstmals eine direkte spezifische Bindung zum unmodifizierten H3-Tail aufgedeckt werden konnte. Die genaue Eigenschaft und Funktion der HAT1-H3-Tail-Interaktionen konnte nicht aufgeklärt werden, ohne weiteren intensiven Forschungsaufwand leisten zu müssen. Allerdings, sind die in dieser Arbeit für das HAT1-Protein herausgestellten Ergebnisse durchaus konform mit den allgemeinen aktuelleren literaturbeschriebenen Beobachtungen. So stellt sich die Histonacetyltransferase 1, anders als bisher angenommen, eher als ein Kernprotein dar<sup>[189, 191-192]</sup>, welches scheinbar in die DNA-Reparatur involviert ist.<sup>[200-201]</sup>



## 2.2 Projekt 2

### 2.2.1 Strategie

Ziel war es, durch eine proteomische Analyse mittels SILAC-Pull-Down-Strategie, spezifische Binder von *Four-and-a-Half-LIM domain protein 3* (FHL3) zu entdecken. Vorab musste eine Methode gefunden werden, um das FHL3-Protein und eine entsprechende Kontrollverbindung herzustellen, unter der Bedingung, diese an eine Festphase zu koppeln. Zu Beginn der Arbeit sollte überprüft werden, ob FHL3 bevorzugt im Nukleus oder in Cytosol lokalisiert ist. Daher wurde in einem vorgeschalteten Experiment die Lokalisation des Proteins analysiert. 3T3-Mäusefibroblasten boten sich dabei als Modellsystem an, da FHL3 als H3-Tail-spezifischer Binder in dieser Zelllinie bereits identifiziert worden war (siehe Projekt 1).



#### 2.2.1.1 Lokalisation von FHL3 in 3T3-Mäusefibroblasten

Es wurde bereits in Abschnitt 2.1.2.1 die Charakterisierung cytosolischer und nuklearer Extrakte, dokumentiert, die sich auf die Strategie beschränkte chromosomale DNA im Kernextrakt nachzuweisen und im Cytosolextrakt auszuschließen. Eine signifikantere Methode sollte die Qualität der Zellfraktionen, in Hinblick auf die FHL3-Lokalisationsuntersuchungen, zusätzlich gewährleisten. Die Qualitätsüberprüfung der Extraktpräparation sollte per Western Blot-Analyse mit spezifischen Markerproteinen vorgenommen werden, welche entweder nur im Cytosol oder im Zellkern vorkommen. Als Proteine, die die gewünschten Bedingungen erfüllen, wurden  $\beta$ -Tubulin als Cytosol-Markerprotein und WDR5 als Kern-Markerprotein gewählt. Zur Detektion wurden Antikörper genutzt, deren Antigene spezifisch als Zellkompartimentmarker dienen. Wie in Abb. 59 a gezeigt, detektierte der  $\beta$ -Tubulin-spezifische Antikörper das Cytosol-Markerprotein lediglich im Cytosol, während der WDR5-spezifische

Antikörper das Zellkern-Markerprotein WDR5 nur im Nukleus nachwies. Im Vergleich dazu konnte das FHL3-Protein durch den FHL3-spezifischen Antikörper im nuklearen und cytosolische Extrakt gefunden werden, wobei die S100-Bande etwas schwächer war (Abb. 59 b). Damit konnte nachgewiesen werden, dass FHL3 im Kernextrakt (NE), als auch im Cytosolextrakt (S100) der 3T3-Fibroblasten zu finden ist. Daher wurden im Folgendem SILAC-Experimente mit beiden Fraktionen getrennt voneinander durchgeführt.

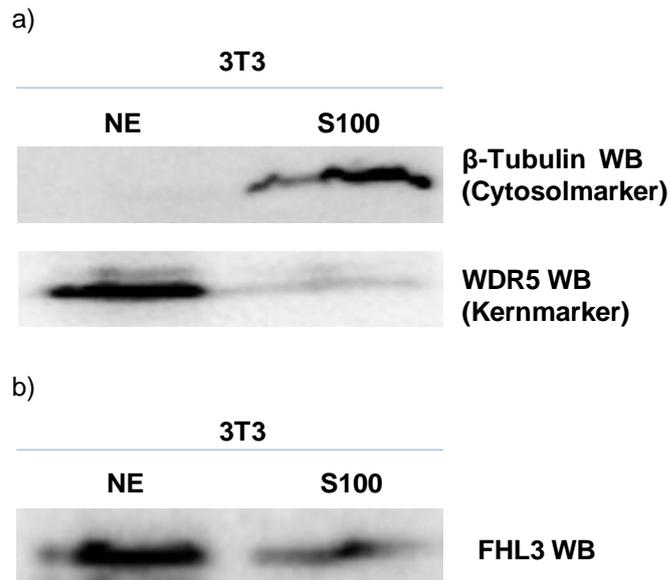


Abb. 59: Western Blot a) Kontrolle mit Cytosol- und Kernmarker b) Lokalisation von FHL3 in NE und S100-Fraktion

### 2.2.1.2 Klonierung und Immobilisierung von GST-FHL3 und GST

Zur gezielten Immobilisierung wurde ein GST-Fusionsprotein von FHL3 (GST-FHL3) hergestellt und die Glutathion-S-Transferase (GST) alleine diente als Kontrollverbindung. Das GST-Kontrollprotein war nötig um sicherzustellen, dass die Extraktproteine über den FHL3-Anteil und nicht über den GST-Fusionsanteil in GST-FHL3 binden. Für die Klonierung wurde die cDNA von FHL3 aus der Maus per Polymerase-Kettenreaktion mit entsprechenden Primern (siehe Abschnitt 4.3.6) amplifiziert und schließlich über die Schnittstellen SacII und AvrII in den pET42b(+)-Vektor eingefügt, welcher einen internen N-terminalen GST-Tag beinhaltet. Somit wurde ein Plasmidkonstrukt erzeugt, dass die Expression eines rekombinanten Fusionsproteins in Form von GST-FHL3 möglich machte. Als PCR-Templat für die Amplifikation des GST-Genes diente der pET42b(+)-Vektor selbst. Der Rückwärtsprimer wurde dafür so konstruiert, dass ein Stopcodon das Ende des GST-Proteins bei der Translation signalisiert. Über die Restriktionsschnittstellen NdeI und AvrII erfolgte die Klonierung des GST-Genes zurück in einen pET42b(+)-Vektor, wobei das interne GST aus dem Plasmid eliminiert wurde. In Abb. 60 sieht man die ETBr-1%-Agarosegele von jeweils zwei der PCR-Ansätze von FHL3 und GST, in denen die DNA-Fragmente der richtigen Größe visualisiert werden konnten. Es wurde jeweils PCR-Ansatz 1 zu weiteren Klonierung genutzt.

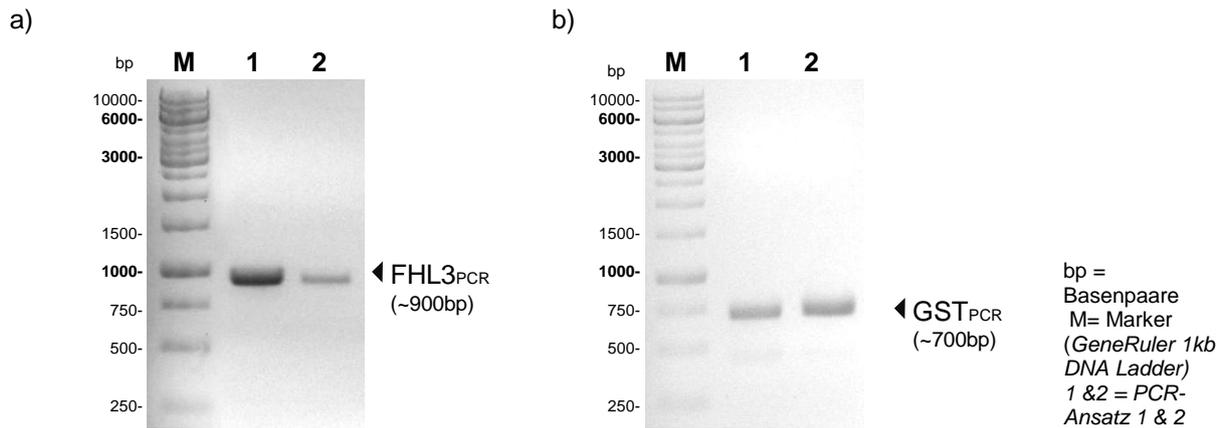


Abb. 60 : ETBr-1%-Agarosegel der PCR-Ansätze 1 & 2 von a) FHL3 und b) GST

Die Expression beider Konstrukte erfolgte jeweils im BL21(DE3)pLysS-Stamm von *E. coli* nach Induktion mit 1 mM IPTG bei 20°C für 19-21 Stunden. Nach Zellaufschluss konnten die Proteine per Glutathion-Sepharose 4B aufgereinigt und mit 10 mM Glutathion von der Festphase fraktionsweise eluiert werden. Saubere Fraktionen wurden vereint (Abb. 61 a und b). Nach Dialyse wurden reine Proteine mit erwarteten Molekulargewicht von 60 kDa für GST-FHL3 und 26 kDa für GST (Abb. 61 c) erhalten (siehe auch Abschnitt 4.3.6, 4.4.1 und 4.4.2 im Methodenteil).

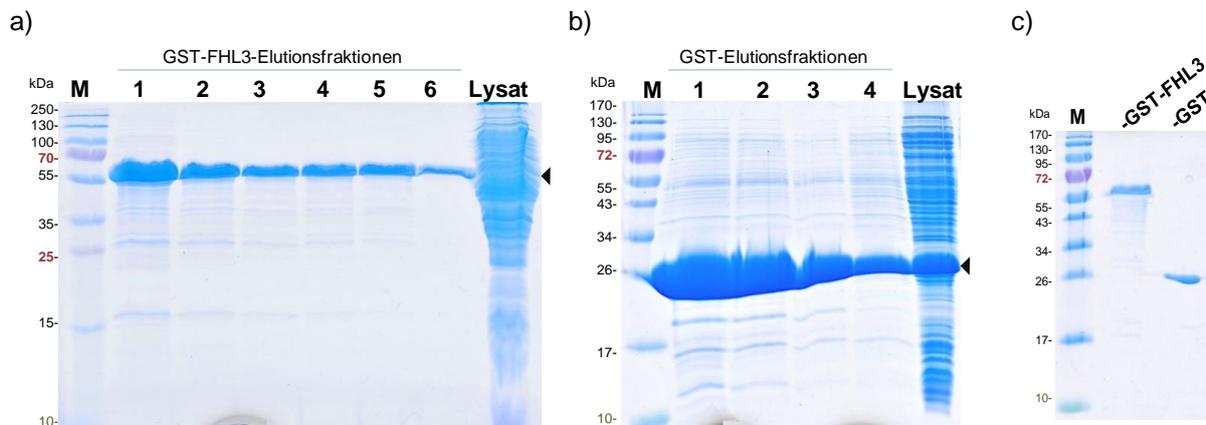


Abb. 61: Coomassiegele a) GST-FHL-Aufreinigung b) GST-Aufreinigung c) GST-FHL3 und GST, kombinierte Fraktionen nach Dialyse

Die Immobilisierung der reinen Proteine für die Pull-Downs erfolgte in beiden Fällen durch spezifische Protein/Substrat-Affinität zum Festphasen-gekoppelten Affinitätstag Glutathion (GSH) in Form von Glutathion-Sepharose 4B. Dies erfolgte in Fall von GST über die Glutathion-S-Transferase selbst oder GST-FHL3 betreffend nur über die GST-Domäne. Durch Inkubation von je 2 nmol Protein mit 10 µL Matrix wurden Mengen eingesetzt, die der Maximalbeladung des Festphasenmaterials entsprechen (Abschnitt 4.5.2).

### 2.2.1.3 SILAC-Pull-Down mit FHL3

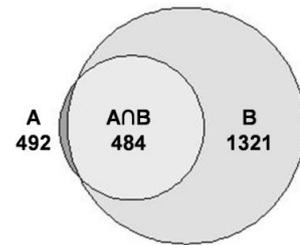
Die Protein-Pull-Downs erfolgten jeweils (für cytosolischen und nukleares Extrakt) als unabhängige Duplikate unter inverser Markierungsstrategie mit leichtem (L, *light*) und schwerem (H, *heavy*) Extrakt. Für jeden einzelnen Pull-Down-Versuch wurde ein 300 µL Aliquot der selben Charge cytosolischen bzw. nuklearen 3T3-Extrakts mit 4 mg/ml Totalproteinkonzentration verwendet. In das Proteom der schweren Extrakte waren per SILAC-Zellkultur die markierten Aminosäuren D4-L-Lys (Lys-4) und <sup>13</sup>C6-L-Arg (Arg-6) eingebaut, während die L-Extrakte lediglich aus leichten Aminosäuren bestanden (vergleiche Tab. 9). Die Präparation der Cytosol und Kernextrakte sowie die Isotopenmarkierung erfolgte wie bereits beschrieben (siehe Abschnitt 2.1.2.1). Die Experimente A und B kennzeichnen die Versuche mit Kernextrakt (NE), die mit C und D gekennzeichneten Experimente die Versuche mit Cytosolextrakt (S100).

Experiment mit NE	Protein	Extrakt (NE)	Aminosäuren
A (Vorwärts)	GST	L ( <i>light</i> )	Lys-0, Arg-0
	GST-FHL3	H ( <i>heavy</i> )	Lys-4, Arg-6
B (Rückwärts)	GST	H ( <i>heavy</i> )	Lys-4, Arg-6
	GST-FHL3	L ( <i>light</i> )	Lys-0, Arg-0
Experiment mit S100	Protein	Extrakt (S100)	Aminosäuren
C (Vorwärts)	GST	L ( <i>light</i> )	Lys-0, Arg-0
	GST-FHL3	H ( <i>heavy</i> )	Lys-4, Arg-6
D (Rückwärts)	GST	H ( <i>heavy</i> )	Lys-4, Arg-6
	GST-FHL3	L ( <i>light</i> )	Lys-0, Arg-0

Tab. 9: Übersicht über die Versuchszusammenstellung des FHL3-SILAC-Pull-Downs mit NE und S100

Die massenspektrometrischen Messungen und die Datenbankanalyse wurden erneut in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Dr. E. Krause am FMP Berlin durchgeführt. Durch Abgleich der MS-Daten gegen die IPI *Mouse* Proteindatenbank konnten in allen Experimenten eine ganze Reihe von Proteinen zugeordnet werden. Nach Quantifizierung unter den Kriterien, dass Proteine mindestens zwei UP und mindestens zwei *ratio counts* (UP,  $rc \geq 2$ ) aufweisen sollten, wurden in A 492 Proteine und in B 1321 Proteine gefunden. Zusammen ergaben sich in Experiment A 4455 identifizierte UP und in B 1214 UP. 484 Proteine und damit 98% der in A gefunden Proteine wurden auch in B entdeckt und galten damit als eindeutig identifiziert (Abb. 62). Die übrigen in B gefundenen Proteine wurden aufgrund ihres nicht reproduzierbaren Auftretens bei der Quantifizierung nicht berücksichtigt.

Experiment (NE)	$\Sigma$ Proteine (UP, $rc \geq 2$ )	$\Sigma$ UP (UP, $rc \geq 2$ )
A (Vorwärts)	492	4455
B (Rückwärts)	1321	12147

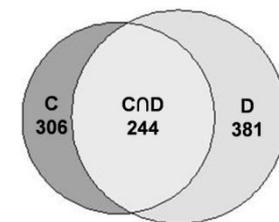


<b>Überlappende Proteine (A ∩ B); UP, <math>rc \geq 2</math></b>	484
--	-----

Abb. 62: Tabellarisierte Ergebnisse des Vorwärts- und Rückwärts-SILAC-Pull-Downs (A&B) mit FHL3 und nuklearen Extrakt (links), zugehöriges Venn-Diagramm (rechts)

In den SILAC-Pull-Down-Versuchen mit cytosolischem Extrakt (S100) wurden in C 306 und in D 381 Proteine gefunden, die den oben angegebenen Auswahlkriterien unterlagen. In C wurden insgesamt 2757 und in D insgesamt 3843 UP detektiert. Die Summe von 244 Proteinen, welche in beiden Experimenten identifiziert worden sind, entspricht jeweils dem Großteil der gefundenen Proteine in den Einzelerperimenten C und D (Abb. 63).

Experiment (S100)	$\Sigma$ Proteine (UP, $rc \geq 2$ )	$\Sigma$ UP (UP, $rc \geq 2$ )
C (Vorwärts)	306	2757
D (Rückwärts)	381	3843



<b>Überlappende Proteine (C ∩ D); UP, <math>rc \geq 2</math></b>	244
--	-----

Abb. 63: Tabellarisierte Ergebnisse des Vorwärts- und Rückwärts-SILAC-Pull-Downs (C&D) mit FHL3 und cytosolischem Extrakt (links), zugehöriges Venn-Diagramm (rechts)

Die eindeutig identifizierten Proteine aus dem nuklearen Extrakt (484) und die aus dem cytosolischen Extrakt (244) wurden zusätzlich untereinander abgeglichen. Dabei zeigte sich, dass 135 der sicher identifizierten Proteine aus allen Experimenten (A-D) überlappend im Kern- und Cytosolfraktion (Abb. 64) zu finden sind. Dieser Umstand kann zum einen mit der natürlichen Kolo-kalisation mancher Proteine in Kern und Cytosol begründet werden und ist zum anderen durch die Präparationstechnikbedingte Limitierung der Fraktionstrennung erklärbar.

Überlappende Proteine	$\Sigma$ Proteine (UP, $rc \geq 2$ )
NE ( $A \cap B$ )	484
S100 ( $C \cap D$ )	244

Überlappende Proteine ( $NE \cap S100$ ); UP, $rc \geq 2$	135
--	-----

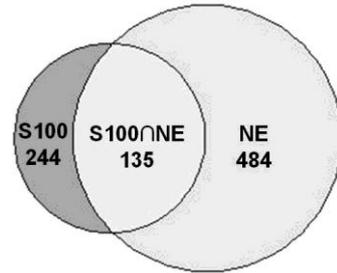


Abb. 64: Überlappungen von Proteinen in Kern- und Cytosolfraction (links), zugehöriges Venn-Diagramm (rechts)

In der grafischen Darstellung der H/L- bzw. L/H-Verhältnisse zum jeweiligen *ratio count* ist eine charakteristische Anhäufung der Datenpunkte (also Proteine) im Bereich niedriger *ratio counts* zu erkennen (Abb. 65). Besonders auffällig ist hier allerdings, dass im Vergleich zum SILAC-Pull-Down-Experiment mit H3-Tail-Peptiden (siehe Abb. 39 a-d) der Verhältnisdurchschnitt in allen Fällen deutlich über eins liegt. Somit ist der Hauptteil aller identifizierten Proteine, cytosolischen sowie nuklearen Ursprungs deutlich am FHL3-Protein angereichert. Dies ist generell nicht erstaunlich, denn ein rekombinanter Proteinköder erfüllt gegenüber einem Peptid auch viel eher den Anspruch eine direkte Kopie des nativen Analogons zu sein.

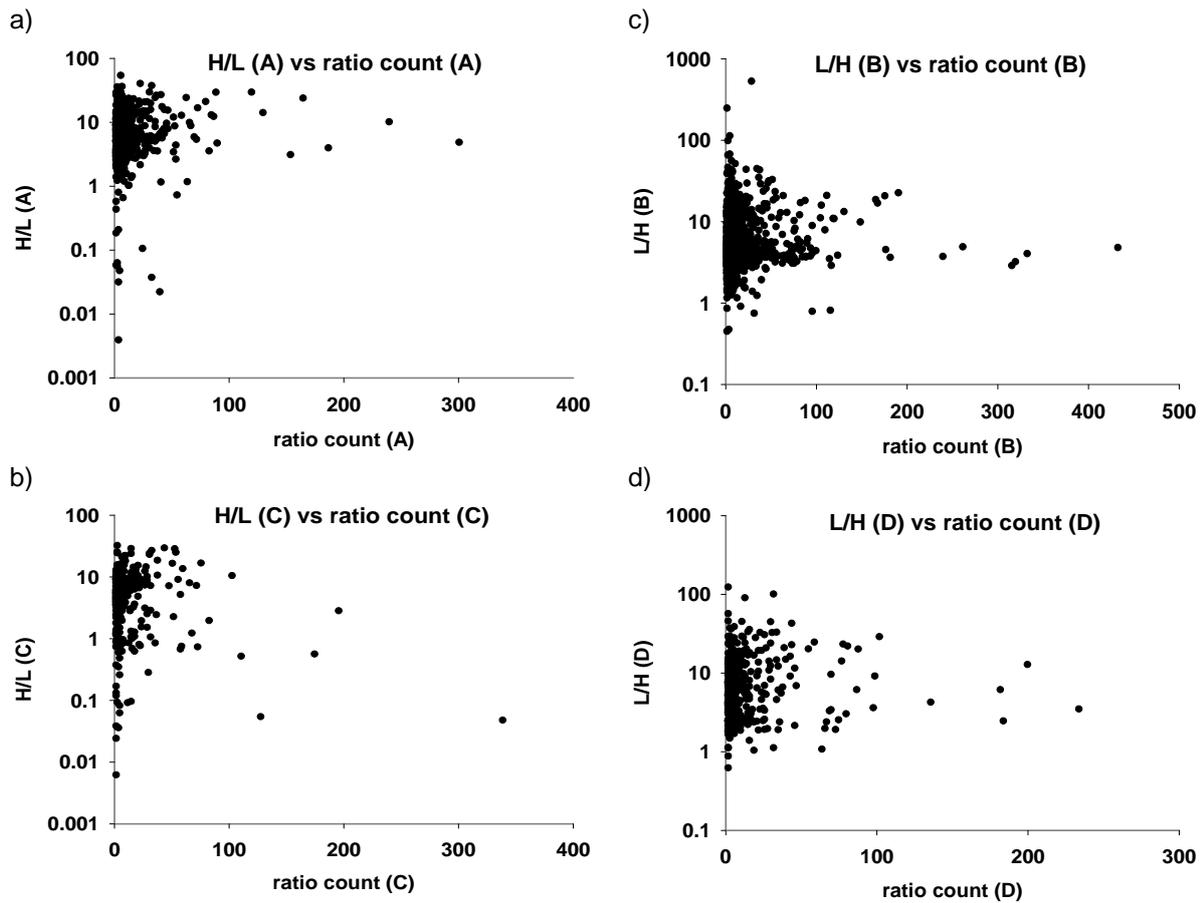


Abb. 65: a) Auftragungen der Verhältnisse gegen *ratio counts* von Experiment A -D, a) H/L(A) vs. *ratio count* (A), b) L/H (B) vs. *ratio count* (B), c) H/L(C) vs. *ratio count* (C), d) L/H(C) vs. *ratio count* (C)

In Abb. 66 und Abb. 67 wird die Konsistenz der Experimente und die allgemein erhöhten Anreicherungs-faktoren anschaulich dargestellt. In den Diagrammen wurden die H/L-Verhältnisse des Vorwärts- und die L/H-Verhältnisse des Rückwärtsexperimentes der SILAC-Pull-Downs jeweils mit nuklearen und cytosolischen Extrakt gegenübergestellt. In den Auftragungen liegt die Majorität an Proteinen im ersten Quadranten, also in dem Bereich, in dem die Proteine in beiden Experimenten (A&B bzw. C&D) am FHL3 angereichert sind. Die Anreicherungsverhältnisse sind z.T. sehr hoch und erreichen Maximalwerte um die 100. Lediglich die Proteine im ersten Quadranten sind für die weitere Erfassung interessant. Sie zeigen Proteine die in beiden Experimenten (A und B bzw. C und D) an FHL3 angereichert sind und konnten als spezifische direkte oder indirekte FHL3-Interaktionspartner eingeordnet werden. Auf die markierten Proteine in Abb. 66 und Abb. 67 wird in Abschnitt 2.2.2 näher eingegangen.

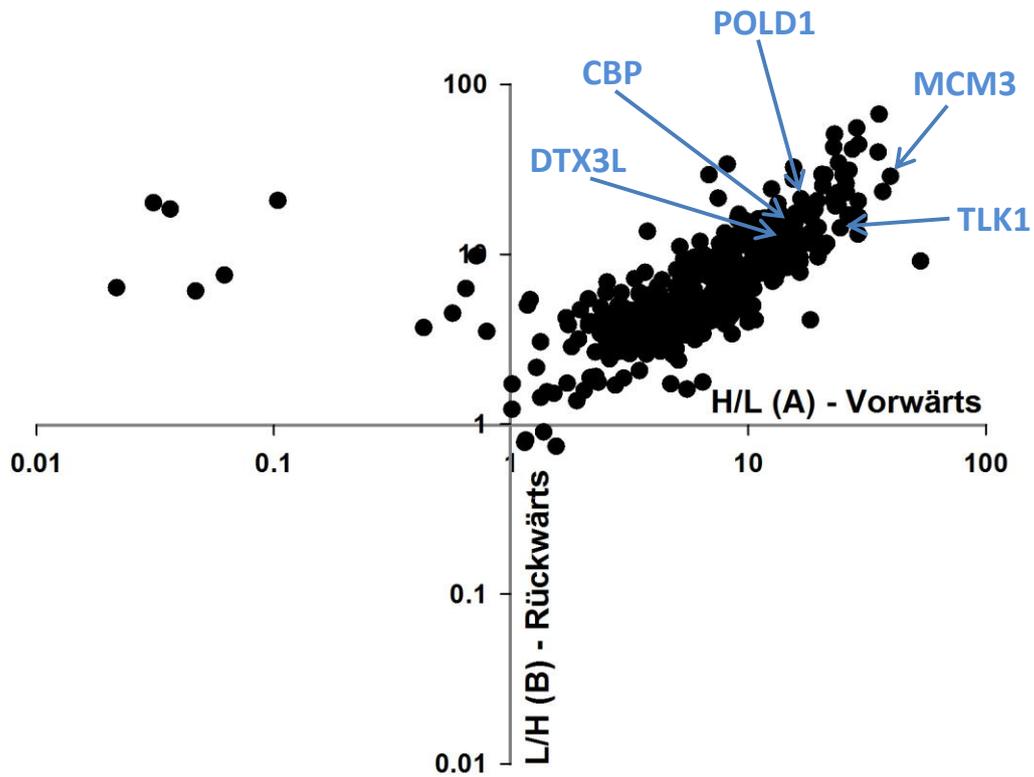


Abb. 66: Diagramm H/L (Experiment A) vs. L/H (Experiment B) - NE

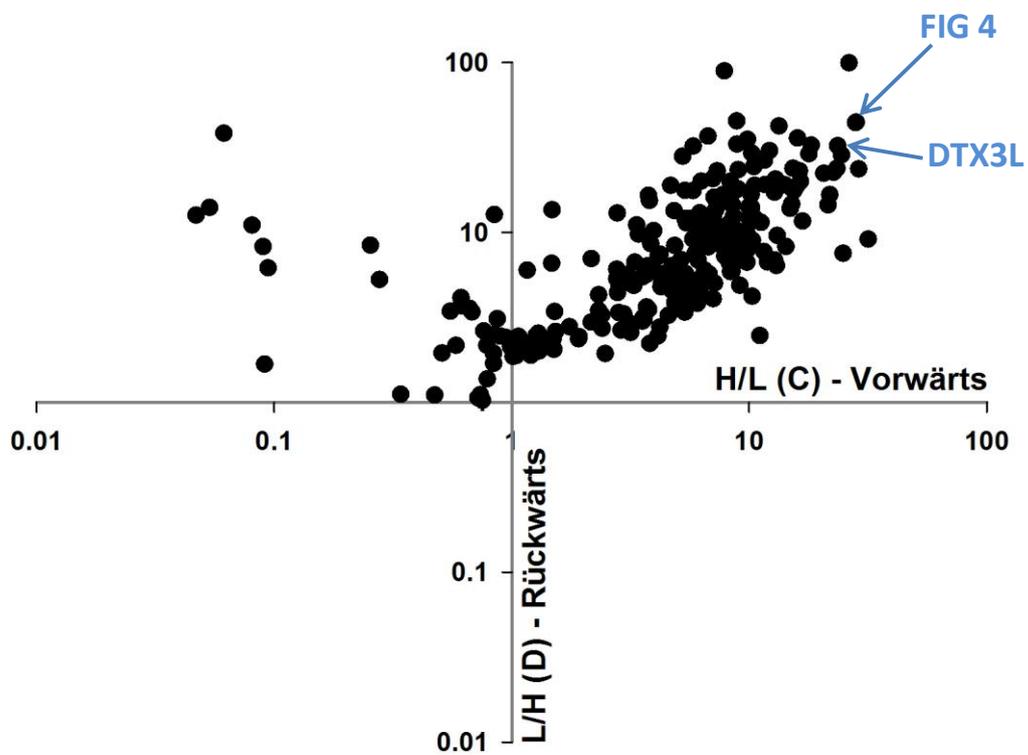


Abb. 67: Diagramm H/L (Experiment C) vs. L/H (Experiment D) - S100

Aus minimalen Ungenauigkeiten, die sich unweigerlich bei der unabhängigen Präparation unterschiedlicher Isotopen-markierter Extrakte ergeben, resultiert, dass einige wenige Proteine sich in Bereichen der anderen Quadranten befinden. Sie sind also jeweils nur in einem der beiden Experimente entsprechend angereichert und fallen somit aus dem Pool der zur weiteren Quantifizierung gewählten Kandidaten. Generell sprechen die gesamten Ergebnisse vornehmlich für die Zuverlässigkeit der einzelnen Experimente.

Im weiteren Verlauf wurden zusätzliche Anforderungen an die Prägnanz der H/L- bzw. L/H Verhältniswerte der angereicherten Proteine gestellt. So werden in den Tabellen Tab. 10 und Tab. 11 nur die Proteine mit mindestens vier UP und vier *ratio counts* aufgelistet. In Tab. 10 sind 75 der am stärksten angereicherten Proteine aus dem nuklearen Extrakt, in Tab. 11 die ersten 75 der am stärksten angereicherten Proteine aus dem Cytosolextrakt aufgeführt. Die Anordnung geht jeweils aus dem Vorwärtsexperiment hervor und führt dazu, dass die Proteine im Durchschnitt einen Anreicherungsfaktor von 16, mindestens aber einen Anreicherungsfaktor von 4 im Einzelexperiment aufweisen.

Nr.	Gen-Name	Proteinbeschreibung	UniProt Nr.	UP		H/L	L/H
				(A)	(B)	(Vorwärts) (A)	(Rückwärts) (B)
1	MCM3	DNA replication licensing factor MCM3	P25206	22	25	39.7	28.7
2	KHDRBS1	KH domain-containing	Q60749	11	9	36.8	23.3
3	DNAJB11	DnaJ homolog subfamily B member 11	Q99KV1	4	7	29.2	16.5
4	MCM5	Minichromosome maintenance deficient 5	P49718	21	20	29.2	44.1
5	FAD49	SH3 and PX domain-containing protein 2B	A2AAAY5	38	37	29.1	20.4
6	MAP4	Microtubule-associated protein 4	P27546-1	39	40	29.0	13.1
7	A2LP	Ataxin-2-like protein	Q7TQH0-2	17	20	26.5	31.1
8	ATX2	Ataxin 2	O70305-1	14	19	25.9	23.0
9	CRP1	Cysteine and glycine-rich protein 1	P97315	6	5	25.8	26.0
10	TLK1	Serine/threonine-protein kinase tousled-like 1	Q8C0V0	5	9	24.4	14.3
11	DNAJC10	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C	A2ASA2	22	23	24.0	34.4
12	DDX1	ATP-dependent RNA helicase DDX1	Q91VR5	30	25	23.9	19.3
13	CGGBP1	CGG triplet repeat-binding protein 1	Q8BHG9	4	7	23.8	22.9
14	JRAB	MICAL-like 2	Q3TN34	43	44	23.4	22.3
15	PDLIM2	PDZ and LIM domain protein 2	Q8R1G6	5	7	23.3	19.1
16	HARP	HepA-related protein	Q8BJL0-1	10	18	23.1	20.1
17	VMAC	Vimentin-type intermediate filament-associated coiled-coil protein	Q8BP01	4	7	23.1	50.8
18	PRR8	Isoform 1 of RNA-binding protein 33	Q9C XK9-1	11	15	22.9	42.6
19	PXDN	Peroxidasin homolog	Q3UQ28	17	24	21.0	29.3
20	IFI204	Interferon-activable protein 204	P15092-1	20	18	20.7	11.0
21	PALLD	Palladin	Q9ET54-6	21	23	20.6	25.2
22	GCP2	Gamma-tubulin complex component 2	Q921G8	19	30	20.5	29.4
23	BAT2	Large proline-rich protein BAT2	Q7TSC1	9	20	19.7	10.6

Nr.	Gen-Name	Proteinbeschreibung	UniProt Nr.	UP		H/L	L/H
				(A)	(B)	(Vorwärts) (A)	(Rückwärts) (B)
24	TNS1	Tensin 1	Q3U0Q9	7	18	19.7	14.3
25	PARP12	Poly [ADP-ribose] polymerase 12	Q8BZ20	11	17	19.6	9.6
26	DCAMKL1	Serine/threonine-protein kinase DCLK1	Q9JLM8-1	4	4	19.5	20.6
27	PHLDA3	Pleckstrin homology-like domain family A member 3	Q9WV95	4	4	19.1	18.3
28	ELAVL1	ELAV-like protein 1	Q3TT05	7	12	18.9	13.0
29	TLK2	Serine/threonine-protein kinase tousled-like 2	B1ASU9	9	11	18.6	13.0
30	SMURF2	E3 ubiquitin-protein ligase SMURF2	A2A5Z6-1	4	9	18.4	16.3
31	ERP44	Endoplasmic reticulum resident protein ERp44	Q9D1Q6	6	5	18.3	13.3
32	PLK	Serine/threonine-protein kinase PLK1	Q07832	4	7	17.7	11.6
33	NF1	Neurofibromin	Q04690-1	28	36	17.2	17.9
34	POLD1	DNA polymerase delta catalytic subunit	P52431	8	15	16.7	21.2
35	SMCHD1	Structural maintenance of chromosomes flexible hinge domain-containing protein 1	Q6P5D8	68	77	16.5	7.8
36	HNRNPA3	Isoform 1 of Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3	Q8BG05-1	5	7	16.5	9.5
37	ENH	Isoform 1 of PDZ and LIM domain protein	Q8CI51-1	12	10	16.5	9.0
38	KIF2C	Kinesin-like protein KIF2C	Q922S8	10	10	15.9	11.5
39	DOCK6	Dedicator of cytokinesis protein 6	Q8VDR9-3	5	24	15.8	13.5
40	NEDD1	Protein NEDD1	P33215-1	8	14	15.7	15.3
41	GCP3	Gamma-tubulin complex component 3	P58854	25	26	15.5	32.4
42	DDX17	DEAD box polypeptide 17	Q3U741	15	16	15.5	11.0
43	PK3	Isoform M2 of Pyruvate kinase isozymes M1/M2	P52480-1	5	13	15.5	27.5
44	DHM1	5'-3' exoribonuclease 2	Q9DBR1-1	13	18	15.5	12.9
45	SFPQ	Splicing factor	Q8VIJ6	17	18	15.1	11.1
46	ZYX	Zyxin	Q3TCR9	9	12	15.0	14.2

Nr.	Gen-Name	Proteinbeschreibung	UniProt Nr.	UP		H/L	L/H
				(A)	(B)	(Vorwärts) (A)	(Rückwärts) (B)
47	CBP	CREB-binding protein	P45481	10	19	14.8	14.5
48	FBXL11	Isoform 1 of Lysine-specific demethylase 2A	P59997-1	5	9	14.7	15.6
49	MSK2	Ribosomal protein S6 kinase alpha-4	Q9Z2B9	20	19	14.5	14.1
50	HNRNPU	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U	Q8VEK3	12	16	14.4	9.6
51	MG11	SAM domain- and HD domain-containing protein 1 isoform 1	Q60710	15	24	14.2	13.4
52	EP300	Ep300 protein	B2RWS6	8	17	14.1	11.5
53	AOF2	Amine oxidase (Flavin containing) domain 2	A3KG93	20	24	13.9	16.3
54	CSRP2	Cysteine and glycine-rich protein 2	P97314	10	12	13.9	10.1
55	KIF4	Chromosome-associated kinesin KIF4	Q3UWH4	44	53	13.9	16.6
56	TOP3B	DNA topoisomerase 3-beta-1	Q9Z321	5	5	13.6	9.4
57	ENGASE	Cytosolic endo-beta-N-acetylglucosaminidase	Q8BX80-1	6	13	13.3	19.8
58	LOH11CR2A	Von Willebrand factor A domain-containing protein 5A	Q99KC8	16	20	13.3	18.2
59	BRE1A	E3 ubiquitin-protein ligase BRE1A	Q5DTM8-1	15	17	13.2	7.6
60	FUS	RNA-binding protein FUS;53 kDa protein	P56959	5	7	13.1	8.9
61	ISG20	Interferon-stimulated gene 20 kDa protein	Q9JL16-2	9	10	13.0	10.9
62	WASL	Neural Wiskott-Aldrich syndrome protein	Q91YD9	7	10	12.9	17.4
63	DTX3L	E3 ubiquitin-protein ligase DTX3L	Q3UIR3-1	10	19	12.9	11.9
64	DDX3	ATP-dependent RNA helicase DDX3X	Q62167	8	8	12.8	10.7
65	NCOR2	Nuclear receptor corepressor 2	Q9WU42-1	6	22	12.8	12.4
66	BRE1B	E3 ubiquitin-protein ligase BRE1B	Q3U319	17	19	12.6	6.9
67	HNRNPL	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L	Q3UMT7	4	5	12.6	8.8
68	LMN1	Lamin-A/C	P48678-1	34	37	12.6	11.9
69	NOSIP	Nitric oxide synthase-interacting protein	Q9D6T0-1	8	9	12.5	24.1
70	ZC3H11A	Zinc finger CCCH domain-containing protein 11A	Q6NZF1	14	13	12.5	13.8

Nr.	Gen-Name	Proteinbeschreibung	UniProt Nr.	UP		H/L	L/H
				(A)	(B)	(Vorwärts) (A)	(Rückwärts) (B)
71	PARP9	Poly [ADP-ribose] polymerase 9	Q8CAS9-2	16	28	12.3	12.7
72	CAT53	Serine/threonine-protein phosphatase 1 regulatory subunit 10	Q80W00-1	6	11	12.2	10.9
73	DOCK7	Dedicator of cytokinesis protein 7	Q8R1A4-1	50	65	12.1	10.8
74	LRRC41	Leucine-rich repeat-containing protein 41	Q8K1C9	4	7	12.1	15.0
75	LRCH2	Leucine-rich repeat and calponin homology domain-containing protein 2	Q3UMG5-1	6	8	11.8	10.0

Tab. 10: Die 75 stärksten angereicherten Proteine an FHL3 (in NE) - bezogen auf Experiment A

Nr.	Gen-Name	Proteinbeschreibung	UniProt Nr.	UP		H/L	L/H
				(A)	(B)	(Vorwärts) (A)	(Rückwärts) (B)
1	PARP9	Poly [ADP-ribose] polymerase 9	Q8CAS9-2	26	23	28.9	23.6
2	FIG4	Polyphosphoinositide phosphatase	Q91WF7	11	10	28.3	44.5
3	VAC14	Protein VAC14 homolog	Q80WQ2	25	21	28.1	44.1
4	FBX21	F-box only protein 21	Q8VDH1-1	14	14	26.3	99.2
5	BC006779	Novel protein	A2AS03	51	69	24.5	28.5
6	DTX3L	E3 ubiquitin-protein ligase DTX3L	Q3UIR3-1	19	12	23.6	32.3
7	SKP1	S-phase kinase-associated protein 1	Q9WTX5	9	12	23.4	23.8
8	ZCCHC11	Zinc finger, CCHC domain containing 11	B2RX14	22	31	22.7	22.5
9	TNFAIP3	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3 isoform 2	Q60769	10	11	21.8	16.7
10	DTL	Denticleless protein homolog	Q3TLR7-2	7	7	21.5	14.5
11	MG11	SAM domain- and HD domain-containing protein 1	Q60710	21	22	18.3	32.5
12	RIN1	Ras and Rab interactor 1	Q921Q7	11	10	17.9	29.0
13	PARP12	Poly [ADP-ribose] polymerase 12	Q8BZ20	6	5	16.8	11.6

Nr.	Gen-Name	Proteinbeschreibung	UniProt Nr.	UP		H/L	L/H
				(A)	(B)	(Vorwärts) (A)	(Rückwärts) (B)
14	TENC1	Tensin-like C1 domain-containing phosphatase	Q8CGB6-1	34	33	16.5	20.0
15	IRS1	Insulin receptor substrate 1;insulin receptor substrate 1	P35569	28	27	16.3	23.0
16	MED16	Mediator complex subunit 16	Q6PGF3	7	7	16.0	35.8
17	TBK1	Serine/threonine-protein kinase TBK1	Q9WUN2	8	9	15.8	18.7
18	PATL1	Protein PAT1 homolog 1	Q3TC46	5	5	15.3	23.8
19	TANC1	Isoform 1 of Protein TANC1	Q0VGY8-1	21	32	15.1	14.7
20	GFPT	Glucosamine-fructose-6-phosphate aminotransferase	P47856-1	13	15	14.3	8.2
21	KIAA0975	Nischarin	Q80TM9-1	16	22	14.1	19.0
22	DNAJC10	DnaJ homolog subfamily C member 10	A2ASA2	29	28	13.4	42.2
23	OSF2	Periostin	Q62009-1	6	6	13.1	9.6
24	PFKA	6-phosphofruktokinase	P47857	13	18	12.9	20.6
25	POLDIP2	Polymerase delta-interacting protein 2	Q91VA6	7	8	12.8	17.2
26	MAP2K3	Isoform 2 of Dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 3	O09110-1	6	7	12.0	6.7
27	POLD1	DNA polymerase delta catalytic subunit	P52431	19	20	11.7	19.1
28	ARF4	ADP-ribosylation factor 4	P61750	4	4	11.5	7.7
29	TCEB2	Transcription elongation factor B polypeptide 2	P62869	4	5	11.2	11.4
30	MCM3	DNA replication licensing factor MCM3	P25206	4	12	10.6	18.9
31	LOH11CR2A	Von Willebrand factor A domain-containing protein 5A	Q99KC8	12	13	10.5	27.7
32	SLFN9	Schlafen 9	B1ARD6	6	7	10.5	12.2
33	NF1	Neurofibromin	Q04690-1	26	34	10.5	24.4
34	XPO5	Exportin-5	Q924C1-1	20	26	10.3	9.0
35	RNF213	Ring finger protein 213	B1ATE2	94	126	10.3	4.2
36	FRAP	Isoform 1 of Serine/threonine-protein kinase mTOR	Q9JLN9-1	21	29	10.2	13.9

Nr.	Gen-Name	Proteinbeschreibung	UniProt Nr.	UP		H/L	L/H
				(A)	(B)	(Vorwärts) (A)	(Rückwärts) (B)
37	HSPA12B	Heat shock 70 kDa protein 12B	Q9CZJ2	6	8	10.2	16.6
38	PFKL	Phosphofruktokinase	Q8CD98	12	16	10.0	12.2
39	SIK3	Serine/threonine-protein kinase QSK	Q6P4S6-1	12	9	9.9	8.0
40	MSK2	Ribosomal protein S6 kinase alpha-4	Q9Z2B9	15	15	9.9	35.2
41	FBA	F-box only protein 3	Q9DC63	5	5	9.8	6.7
42	HEATR7A	HEAT repeat containing 7A isoform 1	Q80T84	11	8	9.1	7.7
43	BAT2L	HLA-B associated transcript 2-like isoform 1	A2AN33	7	6	9.1	7.8
44	CAD	Carbamoyl-phosphate synthetase 2	B2RQC6	41	41	8.9	6.8
45	FN1	Fibronectin	B9EHT6	28	19	8.9	33.0
46	PXDN	Peroxidasin homolog	Q3UQ28	18	16	8.8	10.2
47	DDX1	ATP-dependent RNA helicase DDX1	Q91VR5	6	7	8.8	9.1
48	CUL2	Isoform 1 of Cullin-2;Isoform 2 of Cullin-2	Q9D4H8-1	6	6	8.8	7.0
49	MCM5	Minichromosome maintenance deficient 5	P49718	10	12	8.6	12.4
50	BAG3	BCL2-associated athanogene 3	A6H663	7	6	8.5	14.4
51	CNOT1	CCR4-NOT transcription complex subunit 1	Q6ZQ08-4	23	27	8.5	6.5
52	ARL1	ADP-ribosylation factor-like protein 1	P61211	5	5	8.5	5.9
53	GCP3	Gamma-tubulin complex component 3	P58854	13	18	8.4	16.5
54	RPS16	Rps16 protein	Q5CZY9	4	4	8.4	11.4
55	KIF7	Kif7 protein	B2RUB1	6	5	8.4	5.9
56	PRPSAP1	Phosphoribosyl pyrophosphate synthetase-associated protein 1	Q9D0M1	5	6	8.3	17.7
57	MDN1	Midasin homolog	A2ANY6	18	8	8.3	6.6
58	HEATR5B	HEAT repeat-containing protein 5B	Q8C547-1	20	21	8.0	10.4
59	RENT1	Regulator of nonsense transcripts 1	Q9EPU0-1	8	8	7.9	7.2

Nr.	Gen-Name	Proteinbeschreibung	UniProt Nr.	UP		H/L	L/H
				(A)	(B)	(Vorwärts) (A)	(Rückwärts) (B)
60	PRR8	Isoform 1 of RNA-binding protein 33	Q9C XK9-1	7	11	7.9	89.1
61	GCN1L1	GCN1 general control of amino-acid synthesis 1-like 1	B2RWW6	64	89	7.9	9.0
62	R3HDM1	R3H domain	B9EHE8	8	11	7.8	16.7
63	IQGAP3	IQ motif containing GTPase activating protein 3	B9EKT6	24	31	7.7	10.7
64	WDFY3	WD repeat and FYVE domain-containing protein 3	Q6VNB8-2	14	34	7.4	14.5
65	ABCF2	ATP-binding cassette sub-family F member 2	Q99LE6	15	19	7.2	13.5
66	GVIN1	Interferon-induced very large GTPase 1	Q80SU7	12	16	7.1	5.0
67	UBE3C	Ubiquitin-protein ligase E3C	Q80U95	17	27	7.1	16.1
68	HSC70	Heat shock cognate 71 kDa protein	P63017	23	24	7.1	9.5
69	HSPA5	78 kDa glucose-regulated protein	P20029	18	16	7.1	9.1
70	RPS9	40S ribosomal protein S9	Q6ZWN5	8	7	7.1	12.4
71	ECM29	Proteasome-associated protein ECM29 homolog	Q6PDI5-2	29	39	7.0	11.3
72	ATX2	Ataxin-2	O70305-1	12	21	7.0	20.7
73	STAT1	Putative uncharacterized protein	P42225	12	13	6.8	5.7
74	RPS18	40S ribosomal protein S18	P62270	6	6	6.7	8.2
75	PEX1	Peroxisome biogenesis factor 1	Q5BL07-1	8	9	6.6	5.4

Tab. 11: Die 75 stärksten angereicherten Proteine an FHL3 (in S100) - Bezogen auf Experiment A

Auffällig ist zunächst, dass in den Daten aller SILAC-Pull-Down-Experimente (A-D) keine bereits bekannten FHL3-Interaktionspartner (siehe Abschnitt 1.4.2) aufgeführt werden. Lediglich der Myoglobin-Gen-spezifische Transkriptionsfaktor Foxk1 wurde aus dem Kern (nur im Experiment B) sowie aus dem Cytosol (Experiment C und D), als an FHL3 angereichert detektiert, wies aber mit niedrigen UP-Werten nicht die nötigen Kriterien auf, um als sicher nachgewiesen zu gelten. Die Diskrepanz, dass von den wenigen Literatur-bekannten Interaktionspartnern, die vornehmlich aus Myozytenursprung stammen, keiner als eindeutig identifiziert wurde, ist sicherlich hauptsächlich dem Effekt des unterschiedlichen Proteinexpressionsverhältnisses in Zellen unterschiedlichen Typs geschuldet.

Aus den aufgelisteten Proteinen mit Fibroblastenursprung (Tab. 10 und Tab. 11) wurden insgesamt sechs ausgewählt, um näher untersucht zu werden. Bei den nachfolgenden Experimenten sollte die FHL3-spezifische Protein-Anreicherung per Western Blot dokumentiert werden (siehe Abschnitt 2.2.2). Unter den ausgesuchten Proteinen befanden sich vier, die im Kernextrakt gefunden worden sind (MCM3, POLD, TLK1 und CBP), eines das aus dem cytosolischen Extrakt stammt (FIG4) und eines, welches in beiden angereichert zu finden war (DTXL3). Die ausgewählten Proteine stehen dabei stellvertretend für Proteingruppen die einen Zusammenhang zwischen FHL3 und wichtigen zellulären Funktionen herstellen. Für vier dieser Proteine werden in Abb. 68 a-d exemplarisch die Massenspektren von einem der eindeutig zugeordneten Peptide (*unique peptide*) gezeigt. Die Spektren stammen aus den Vorwärtsexperimenten A bzw. C, bei denen ein erhöhtes H/L-Verhältnis einer Anreicherung an FHL3-Protein entspricht. Bei den Peptiden von MCM und TLK1 (Abb. 68 a bzw. b) mit nuklearen Ursprung handelt es sich um Exemplare, die tryptisch nach Lysin gespalten worden sind. Sie sind jeweils dreifach geladen und die Massendifferenzen von 4 bzw. 8 Da, zwischen L (*light*)- und H (*heavy*)-Signal, resultiert aus dem Isotopenmarkierungsunterschied zwischen Lys-0 und Lys-4. Die doppelte Massendifferenz des TLK1-zugehörigen Peptids (Abb. 68 b) geht aus einer Fehlsplattstelle bei Lys-700 hervor. Die ausgewählten Peptide der Proteine FIG4 und DTX3L aus dem ursprünglichen cytosolischen Extrakt sind Peptide, die je einer tryptischen Spaltung nach Arginin unterlagen und doppelt geladen sind. Die Massendifferenz von sechs entspricht der zwischen Arg-0 und Arg-6. Bei allen vier MS-Spektren erkennt man, dass das Signal der spezifischen *heavy*-Peptide im Vergleich zu den *light*-Peptiden deutlich erhöht ist und diese damit deutlich an FHL3 angereichert gefunden worden sind. Wie bereits in 2.1.2.2 erwähnt, entsprechen die Verhältniswerte (H/L bzw. L/H) der Proteine, welche in Tab. 10 und Tab. 11 ausgeführt werden, dem Median der Verhältniswerte der gefundenen Peptide.

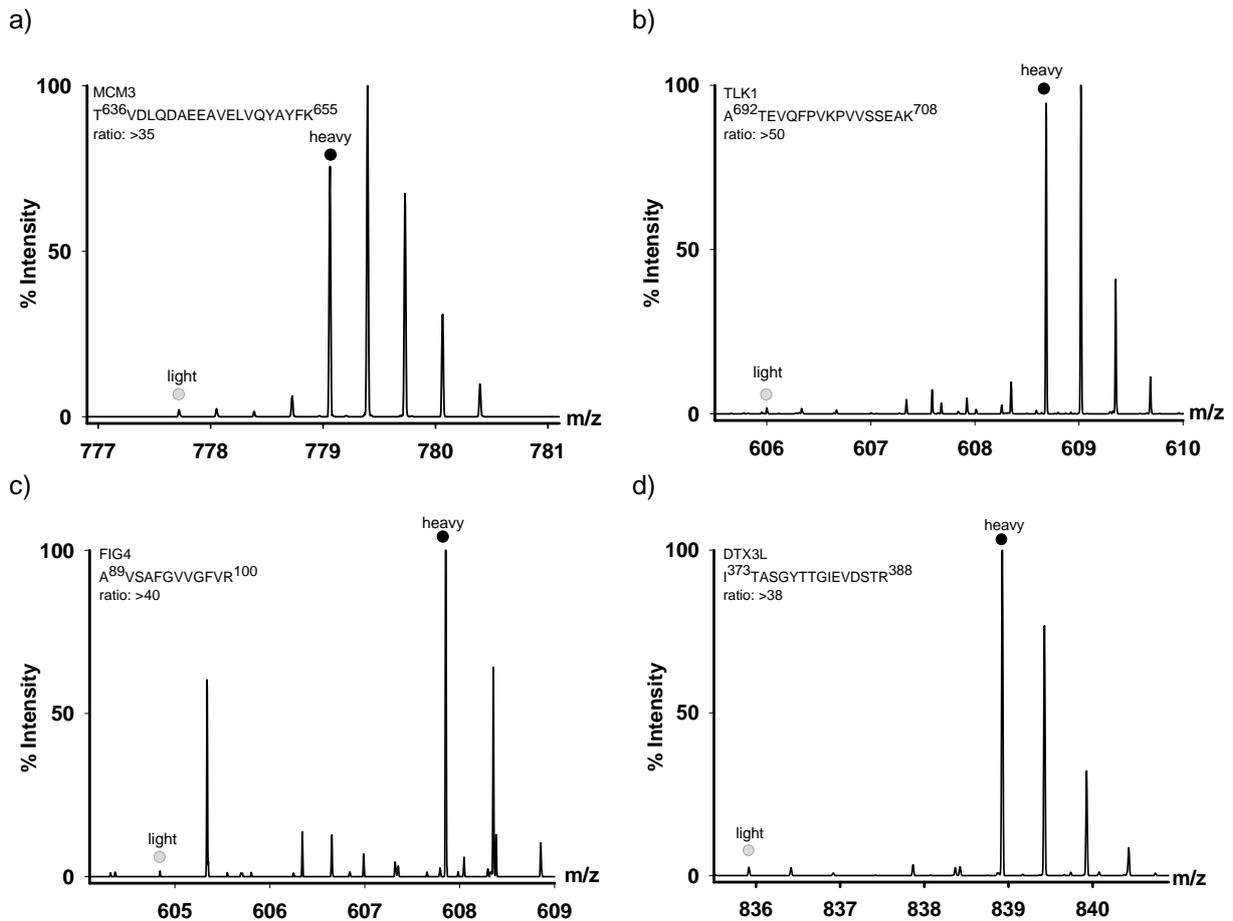


Abb. 68: MS-Spektren ausgewählter Peptide der Proteine: a) MCM3 b) TLK1 c) FIG4 und d) DTX3L

## 2.2.2 Verifizierung ausgesuchter FHL3-Interaktionspartner

Die DNA-Replikation-lizenzierenden Faktoren MCM3 und MCM5 sind zwei der sechs Komponenten des eukaryotischen MCM (*Minichromosome Maintenance*)-Komplexes und gehören mit den Positionen Nr. 1 und 4 in Tab. 10 mit Anreicherungsfaktoren von mindestens 29 zu den am stärksten an FHL3 angereicherten Proteinen aus dem Kernextrakt. Verursacht durch Differenzen bei der Extraktfraktionierung findet man sie im schwächeren Umfang auch aus dem cytosolischen Extrakt an FHL3 angereichtert (Tab. 11). Der MCM-Komplex ist dafür bekannt, sich als hexamerische Helikaseeinheit während der DNA-Replikation ringförmig um den DNA-Strang zu legen und u.a. dafür zu sorgen, dass ein Genomabschnitt während der S-Phase einmalig repliziert wird.<sup>[202-203]</sup> Die Helikasekomplexbestandteile MCM3 und MCM5 liegen dabei strukturell (MCM2-MCM-6-MCM4-

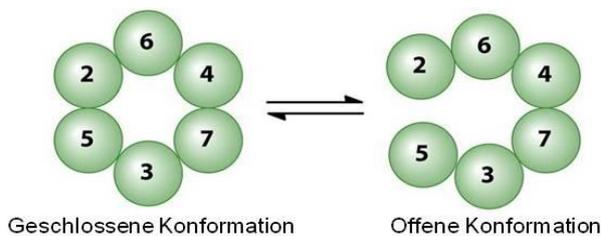


Abb. 69: MCM-Komplex-Konformationen

MCM7-MCM3-MCM5) direkt nebeneinander (Abb. 69).<sup>[204]</sup> Ein konkreter Zusammenhang zu FHL3 wurde noch nicht beschrieben, aber interessanterweise wurde eine Wechselwirkung von MCM7, welches direkt neben MCM3 liegt, mit FHL2 aufgezeigt.<sup>[205]</sup> MCM7 wurde zwar ebenfalls im SILAC-Gesamtdatensatz gefunden, aber nur im

Experiment B mit 2 UP (L/H-Wert: 5,4) und fiel damit durch das Quantifizierungsaster. Die Interaktion von FHL3 und MCM3 konnte mittels Western Blotting bestätigt werden (Abb. 70)

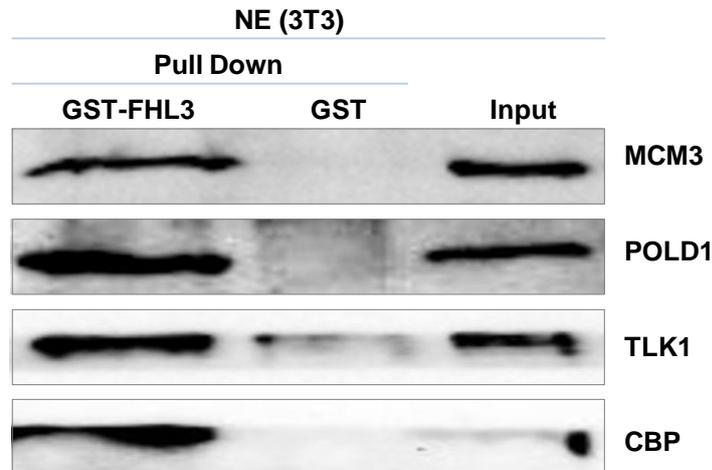


Abb. 70: Western Blot ausgesuchter Proteine aus dem nuklearen 3T3-Extrakt

Da die LIM-Zinkfinger seit einiger Zeit als Dimerisationsdomänen bekannt sind<sup>[206-207]</sup> und bereits FHL2-FHL3-Heterodimerbildung nachgewiesen wurde<sup>[110-111]</sup> (siehe auch Abschnitt 1.4), könnte sich, zusammen mit den hier ermittelten Daten, die Existenz einer solche Interaktion in Bezug auf den MCM-Komplex andeuten. Interessanterweise wurden für die MCM-Komplex-Komponenten, die nicht an FHL3 angereichert gefunden worden sind bzw. die nicht quantifiziert wurden (MCM7, MCM4, MCM6 und MCM2), hohe Affinitäten zum Kern-Histon H3<sup>[208]</sup> und eine Interaktion mit dem Acetylierungskomplex HBO1 nachgewiesen.<sup>[209]</sup> In beiden Fällen sollen verschiedene Domänen in MCM2 für die Bindung verantwortlich sein.<sup>[210]</sup> Ferner wurde publiziert, dass der MCM2-7-Komplex dem Chaperon ASF1 durch H3-H4-Brückenbindung an der Replikationsgabel hilft alte und neue Histone zu positionieren.<sup>[211]</sup>

Des Weiteren findet man mit der katalytischen Untereinheit der DNA-Polymerase  $\delta$  (POLD1) in Tab. 10 (Nr. 34) zusätzlich ein Schlüsselenzym der eukaryotischen DNA-Synthese. Am Rande findet man, verwaltet in der STRING-Datenbank (Version 9.0), einzelne Bezugspunkte von POLD1 zu MCM3 und MCM5 bzw. zu anderen Komponenten des MCM-Komplexes (Abb. 71).

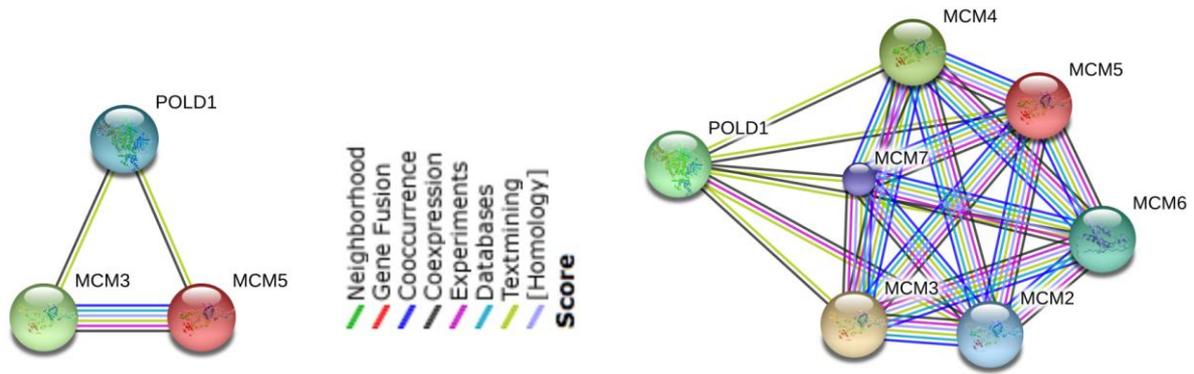


Abb. 71: Bestätigte und vorhergesagte Interaktionen (vergleiche Legende) zwischen POLD1 und Komponenten des MCM-Komplexes

Die DNA-Polymerase POLD1 weist zusätzlich zu einer hohen Prozessivität eine 3'→5'-Exonuklease-Aktivität auf.<sup>[212-213]</sup> Diese intrinsische Korrekturlese-Funktionalität unterdrückt die Entstehung von anormalen Phänotypen kanzerogenen Ursprungs, welche sich klar abgrenzen von Tumortypen, deren Entstehung unter der Kontrolle von der parallel gesteuerten DNA-Polymerase  $\epsilon$  (POLE) stehen.<sup>[214]</sup> Im Übrigen wurde POLE3 (*DNA polymerase epsilon subunit 3*) auch im SILAC-Datensatz aufgeführt, allerdings wurde es nach den bereits erwähnten Kriterien als nicht quantifizierungsrelevant eingestuft. POLD1 weist Anreicherungsfaktoren von 17 (Experiment A) und 21 (Experiment B) auf (Tab. 10). Die Bindung zu FHL3 konnte per Western Blotting (Abb. 70) nachgewiesen werden. Ebenso konnten die fünf Untereinheiten des Replikationsfaktors  $\zeta$  (RFC) 1-5 aus den Daten der SILAC-Experimente identifiziert werden, die bei der Positionierung von POLD1 an die DNA involviert sind. RFC1-5 weisen mindestens drei UP und ähnliche Verhältnisse um die vier auf und gehören damit zu den Proteinen die in Abb. 66 im ersten Quadranten zu finden sind.

Die ubiquitär in Pflanzen und Tieren exprimierte Serin-/Threonin-Kinasen TLK1 (*Tousled-like kinase 1*) und TLK2 (Nr. 10 bzw. 29, Tab. 10) zeigen untereinander 84% Sequenzhomologie, gehören zur hoch konservierten Familie der TL-Kinasen und können Heterodimere ausbilden.<sup>[215]</sup> Während der S-Phase in Säugetieren erreicht ihre Aktivität ein Maximum, wobei ein Zusammenhang zum Aufbau des Chromatins, DNA-Reparatur und zur Chromatinkondensation besteht.<sup>[216]</sup> Dies steht in direkter Verknüpfung mit der Tatsache, dass es sich bei den zwei bekannten Phosphorylierungszielen um das H3/H4-Histonchaperone ASF 1 (*Anti-silencing function protein 1*)<sup>[217]</sup> und Histone H3<sup>[60]</sup> handelt. Untersuchungen legen nahe, dass die Unterbindung von Proteasom-vermittelten ASF1-Abbau eine Aufgabe der TLK-vermittelten Phosphorylierung ist und dass die Hauptphosphorylierungsstellen in ASF1 im Konsensusmotiv (D/E)-N-S-(L/M) liegen.<sup>[218]</sup> Nachdem für TLK1 in Studien gezeigt worden ist, dass es außerdem Histon H3 an Serin-10 phosphoryliert und beispielsweise in Hefe die induzierte Funktionsstörung von IPL1 (siehe auch Abschnitt 1.2.2) kompensiert, wurde vorgeschlagen, es in die Liste der H3-Kinasen aufzunehmen.<sup>[60]</sup> Zudem ist zwischen dem Aurora B-Homolog in *C. elegans* (AIR2, *Aurora/IPL1-related protein kinase 2*) und TLK1 eine Substrat-Aktivator-Beziehung aufgedeckt worden, in der die, durch AIR2 phosphorylierte, TLK1 die Kinaseaktivität von AIR2 gegenüber Histon H3 steigern kann.<sup>[219]</sup> Auch in *Trypanosoma brucei*, einem einzelligen eukaryotischen Parasiten,

weisen die TLK-homologen Kinasen sowohl Phosphorylierungen durch die Aurora B Kinase 1 (AUK1), als auch Phosphorylierungsaktivität gegenüber H3 und dem Chromatin-aufbauenden Faktor ASF auf, was generell den Verlauf der S-Phase und den Spindelaufbau dient.<sup>[220]</sup> TLK1 und TLK2 sind im Vorwärts- sowie im Rückwärtsexperiment (A und B) des SILAC-Pull-Downs, um den Faktor 13-23 an FHL3 angereichert gefunden worden, aufgrund dessen wurde die Interaktion zu TLK1 ausgewählt um sie per Immunodetektion zu bestätigen (Abb. 70). Diese Ergebnisse sind besonders unter dem Aspekt interessant, da FHL3 im SILAC-Pull-Down des ersten Projektes dieser Arbeit um den Faktor 8 am unmodifizierten H3-Tail-Peptid angereichert gefunden wurde und somit einen der stärksten Interaktionspartner des H3-Tail darstellt (Nr. 2, Tab. 6 und Abb. 42). Die hier nachgewiesene Affinität der Histon H3-assoziierten Kinasen TLK1 und 2 zu FHL3 können durchaus als deutlicher Hinweis einer direkten oder indirekten FHL3-H3-Tail-Wechselwirkung gewertet werden.

Wie in Abschnitt 1.4 bereits erläutert, sind Mitglieder der FHL-Proteinfamilie (FHL2 und ACT) als transkriptionelle Coaktivatoren der Transkriptionsfaktoren CREB/CREM<sup>[110, 116]</sup> bekannt. Das CREB-bindende Protein (CBP) und das teils Homologien aufweisende Ep300 sind durch ihre Histonacetylierungsaktivität beide an der Chromatin-Remodellierung beteiligt und sind ebenfalls ubiquitäre Coaktivatoren der Transkription.<sup>[221-223]</sup> Die beiden eben genannten riesigen Proteine (>260 kDa) wurden mittels des SILAC-Pull-Downs aus dem nuklearen Extrakt an GST-FHL3 angereichert und weisen Verhältniswerte zwischen 12 und 15 auf (Nr. 47 und 52, Tab. 10). Mit einer Sequenzhomologie von 51,8 %<sup>[108]</sup> zwischen humanen FHL2 und FHL3 (Abschnitt 1.4) ist es nicht erstaunlich, dass letztgenanntes ebenfalls in die CBP/Ep300-abhängige transkriptionelle Aktivierung von bestimmten Genen involviert sein könnte.<sup>[224]</sup> Per Western Blot konnte die CBP-FHL3-Interaktion nachgewiesen werden (Abb. 70).

Die Poly-[ADP-Ribose]-Polymerase 9 (PARP 9) und die E3-Ubiquitin-Proteinligase DTX3L (*Deltrix-3-like protein*) wurden aus dem nuklearen (Nr. 71 bzw. 63 Tab. 10) sowie aus dem cytosolischen Extrakt (Nr. 1 bzw. 6, Tab. 11) durch Affinität zu FHL3 isoliert. Anders als PARP1, einem an der DNA-Reparatur beteiligten Protein und Hauptvertreter der Poly-ADP-ribosylierenden Enzyme, zeigt PARP9 bisher keine entsprechende Aktivität.<sup>[225-226]</sup> Es gehört zu den Proteinen, die in aggressiven B-Zell-Lymphomen als überexprimiert gefunden worden sind.<sup>[227]</sup> Das DLBCL (*Diffuse large B-cell lymphoma*) gehört zu den häufig vorkommenden hochmalignen Non-Hodgkin-Lymphomen und ist im fortgeschrittenem Stadium durch Chemotherapie noch in 50 Prozent der Fälle heilbar.<sup>[228-229]</sup> DTX3L, auch als BBAP (B-lymphoma- and BAL-associated protein) bezeichnet, ist eine RING-Domäne-enhaltende Ligase, die unter dem Umstand der DNA-Schädigung zur Monoubiquitinierung von Lysin-91 in Histon H4 führt und somit zum Zellschutz beiträgt.<sup>[230]</sup> Vor einigen Jahren wurde eine Interaktion zwischen PARP9 und DTX3L aufgedeckt.<sup>[231]</sup> Durch die INF- $\gamma$ -(Interferon gamma) induzierbare gesteigerte Häufigkeit von PARP9 (auch: BAL1 bzw. B-aggressive lymphoma 1) in Lymphomgewebe ist ebenso DTX3L überexprimiert. Es übernimmt die Rolle eines PARP9-Shuttleproteins zwischen Kern und Cytosol und steuert somit die subzelluläre Lokalisation von PARP9.<sup>[229]</sup> Es wird vermutet, dass weitere Aufklärung der PARP9-stimulierten Genaktivierung und der Rolle von DTX3L als Schutzprotein gegen die DNA-schädigenden chemotherapeutischen Mittel als Basis zur Entwicklung

einer therapeutischen Antwort gegen Lymphome genutzt werden könnte.<sup>[229-230]</sup> Eine Interaktion dieser Proteine mit FHL3 oder einem der anderen FHL-Familienvertreter ist bisher weder im Zusammenhang mit Karzinogenese noch unter anderen Gesichtspunkt belegt worden. Dabei zeichnen sich PARP9 und DTX3L im SILAC-Pull-Down durch hohe Anreicherungsfaktoren aus (Tab. 10, Tab. 11 sowie Abb. 66 und Abb. 67). Diese reichen von einem durchschnittlichen Faktor von 13 (Kern) bis zu einem Faktor von 27 (Cytosol), wobei sie mit letzteren an der Spitze der angereicherten Proteine stehen. In den Immunoblots der Abb. 72 wurden ein Antikörper gegen DTX3L benutzt, der die Anreicherung des Proteins an FHL3, lokalisiert in Kern sowie Cytosol, nochmals deutlich macht.

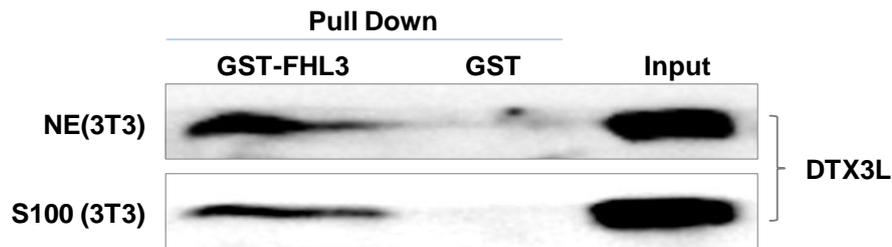


Abb. 72: Western-Blots von DTX3L-Pull-Down aus nuklearen (oben) und cytosolischen (unten) 3T3-Extrakt

Das Phospholipid Phosphatidylinositol-3,5-bisphosphat [PtdIns(3,5)P<sub>2</sub>] ist Bestandteil von Endosomenmembranen höherer Eukaryoten und Vakuolen der Hefe. Es bestimmt nicht nur deren Morphologie<sup>[232-233]</sup>, sondern ist in vielfältige Signalwege, die Cytoskelettregulation und funktionell in die Translokation (*Membrane Trafficking*), verwickelt.<sup>[234]</sup> Das Phosphatidylinositol-3,5-bisphosphatlevel bezüglich der 5'-OH-Phosphorylierung wird durch einen tertiären Komplex (PAS), bestehend aus dem PIKfyve-Aktivator VAC14 (*ArPIKfyve*, *Associated Regulator of PIKfyve*) und dem Kinase-/Phosphatasepaar PIKfyve und FIG4 gesteuert.<sup>[235-236]</sup> Der Einfluss von VAC14 schützt FIG4 außerdem vor proteasomalen Abbau.<sup>[237]</sup> Zudem wurde dokumentiert, dass das mittels der Funktionalität des PAS-Komplexes regulierte Level an PtdIns(3,5)P<sub>2</sub> obligatorisch für die Lebensfähigkeit des Organismus zu sein scheint.<sup>[238]</sup> So wurde beispielweise bei einer Studie an Mäusen gezeigt, dass das Fehlen der Komplexkomponente VAC14 zur Degeneration bestimmter Regionen des zentralen und peripheren Nervensystems und infolgedessen zum Tod führt.<sup>[239]</sup> Alle drei Proteine sind in den Experimenten C und D aus dem Cytosol mittels des FHL3-Proteinköders deutlich angereichert worden. So wie es ihrer natürlichen Lokalisation entspricht, wurden sie nicht im Kernextrakt gefunden. FIG4 und VAC14 werden in Tab. 11 unter den Nr. 2 und 3 aufgeführt. PIKfyve ist trotz hoher *ratio counts* lediglich aufgrund zu weniger *unique peptides* nicht zur Quantifizierung herangezogen worden. Die Phosphatase FIG4 (siehe auch Abb. 67) schien ein lohnendes Ziel, um die Anreicherung an FHL3 per Western Blotting erfolgreich zu bestätigen (Abb. 73).



Abb. 73: Western Blot von FIG4 aus dem cytosolischen 3T3-Extrakt

Die Gesamtheit der hier dargestellten Ergebnisse des Projektes 2, bringt FHL3 mit vielen zuvor unentdeckten Interaktionspartnern in Verbindung. Schließlich wurden dadurch wertvolle Hinweise geliefert, bei welchen Zell-spezifischen Signalwegen das Adapterprotein involviert sein könnte. Bisher war wenig über die Interaktionspartner und die Rolle des Proteins, außerhalb des Muskelzell-Kontextes bekannt. Anhand des 3T3-Mäusefibroblasten-Modellsystems wurde zunächst nachgewiesen, dass FHL3 sowohl im Cytosol als auch im Kern zu finden ist. In SILAC-Pull-Down-Experimenten mit cytosolischen (S100) und nuklearem Extrakt (NE) wurden je nach Experiment 244 bzw. 484 Proteine eindeutig an FHL3 angereichert identifiziert. Diese wurde größtenteils noch nie in Beziehung zu FHL3 oder zu einem anderen der FHL-Proteinfamilienmitglieder beschrieben. Ausgesuchte FHL3-Binder konnten durch zusätzliche Western Blot-Analyse als diese bestätigt werden und stellen FHL3 in Zusammenhang mit bestimmten zellulären Vorgängen. Zum einen handelte es sich bei den identifizierten nuklearen Proteinen um den transkriptionelle Coaktivator CBP und Schlüsselkomponenten der eukaryotischen DNA-Synthese (MCM3 und POLD1). Zum anderen handelt es sich mit FIG4, einer PtdIns(3,5)P2-spezifischen Phosphatase aus der cytosolischen Fraktion, um ein Enzym welches FHL3 mit endosomal gesteuerten Abläufen verknüpft. Die DTX3L-Anreicherung an FHL3, cytosolischen und nuklearen Ursprungs, deutet außerdem darauf hin, dass das Adapterprotein außerdem eine Rolle bei der Krebsentwicklung spielen könnte. Schließlich wurde auch die nukleare Serin/Threonin-Kinase TLK1, welche bekanntermaßen Serin-10 an H3 phosphoryliert, als FHL3-Interaktionspartner identifiziert. Diese Beobachtung wiederum stellt einen Bezug zu den Ergebnissen im ersten Projekt dar und bestätigte, dass FHL3 in Histon-spezifische Abläufe involviert ist.



## 3 MATERIAL

### 3.1 Chemikalien

Die verwendeten Lösungsmittel DMF, DCM und ACN wurden von Fisher Scientific GmbH (Schwerte) bezogen. Die Standard-Fmoc-Aminosäurederivate wurden bei GL Biochem (Shanghai, China), alle anderen speziellen Fmoc-Aminosäurebausteine, wie Dipeptidbausteine und phosphorylierte Derivate (pS/pT) bei Novabiochem (Merck KGaA, Darmstadt) und die Aktivierungsreagenzien (HBTU, HOBT) von Iris Biotech (Marktredwitz) erworben. L-Phosphonomethylenalanin wurde von Biotrend Chemikalien GmbH (Köln) bezogen. Die zur PCR oder für die Sequenzierung nötigen Oligonukleotide wurden von der Firma Biotex GmbH (Berlin) synthetisiert. Alle anderen verwendeten Chemikalien sind, soweit nicht anders vermerkt, von Carl Roth GmbH (Karlsruhe) oder Sigma-Aldrich Chemikalien GmbH (München) und wiesen den Reinheitsgrad p.a. auf.

### 3.2 Lösungen, Klonierungs-Enzyme und Kits

Alle bei der Klonierung verwendeten Enzyme, Reaktions- und Probenpuffer, DNA- sowie Proteinmarker stammen von Fermentas. Alle Lösungen und Medien, die bei der Zellkultur bzw. SILAC-Zellkultur verwendet wurden, stammen von Invitrogen GmbH (Karlsruhe) oder von Thermo Scientific GmbH (Schwerte).

Für die DNA-Isolierung aus *E. coli*, PCR-Ansätzen, Agarosegelen wurden entsprechende gebräuchliche Komplettpakete (Kits) eingesetzt. Diese und weitere Kits wurden wie folgt bezogen (Tab. 12).

Kit	Verwendung
GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit (Fermentas)	DNA-Extraktion aus <i>E. coli</i> -Kulturen
GeneJET™ PCR Purification Kit (Fermentas)	DNA-Extraktion aus PCR-Ansätzen
GeneJET™ Gel Extractions Kit (Fermentas)	DNA-Extraktion aus Agarosegelen
Pierce ECL Western Blotting Substrate (Thermo Scientific)	Western Blot-Detektion
EnzChek Phosphate Assay Kit (Molecular Probes)	Phosphatkonzentrationsbestimmung
CloneJET™ PCR Cloning Kit (Fermentas)	Zwischenklonierung

Tab. 12: Verwendete Kits

### 3.3 Antikörper

Antikörper wurden wie in Tab. 13 und Tab. 14 aufgelistet von Santa Cruz, Abcam bzw. Qiagen bezogen.

Antigen	Isotyp	[µg/ml]	Firma
<b>14-3-3β</b>	<b>rabbit-poly-IgG</b>	<b>200</b>	<b>SantaCruz</b>
<b>14-3-3γ</b>	rabbit-poly-IgG	200	SantaCruz
<b>14-3-3ζ</b>	rabbit-poly-IgG	200	SantaCruz
<b>APG2</b>	rabbit-poly-IgG	200	SantaCruz
<b>CBP</b>	rabbit-poly-IgG	200	SantaCruz
<b>DTX3L</b>	rabbit-poly-IgG	1000	Abcam
<b>FHL3</b>	rabbit-poly-IgG	1000	Abcam
<b>FIG4</b>	rabbit-poly-IgG	1000	Abcam
<b>H4Kac12</b>	rabbit-poly-IgG	200	SantaCruz
<b>HAT1</b>	goat-poly-IgG	200	SantaCruz
<b>HSC70</b>	rabbit-poly-IgG	500	Abcam
<b>MCM3</b>	goat-poly-IgG	200	SantaCruz
<b>Penta-His</b>	mouse-mono-IgG	(100 µg)	Qiagen
<b>POLD1</b>	goat-poly-IgG	200	SantaCruz
<b>RBBP7</b>	rabbit-poly-IgG	1000	Abcam
<b>TLK1</b>	rabbit-poly-IgG	200	Abcam
<b>WDR5</b>	rabbit-poly-IgG	1000	Abcam
<b>β-Tubulin</b>	mouse-mono-IgG3	200	SantaCruz

Tab. 13: Primäre Antikörper

Antigen	Isotyp	[µg/ml]	Firma
(goat) anti-rabbit	IgG	400	SantaCruz
(donkey) anti-goat	IgG	400	SantaCruz
(goat) anti-mouse	IgG	400	SantaCruz

Tab. 14 : HRP-konjugierte sekundäre Antikörper

### 3.4 pET-Vektoren

Plasmide aus dem pET-*E. coli*-T7-Expressionssystem stammen von Novagen (Merck KGaA, Darmstadt)

#### 3.4.1 pET23b(+)

Der pET23b(+)-Vektor wurde für die Expression von rekombinanten Proteinen mit C-terminalen His6-Tag eingesetzt. In Abb. 74 ist die pET23a-d(+)-Vektorkarte mit der Klonierungsregion gezeigt.

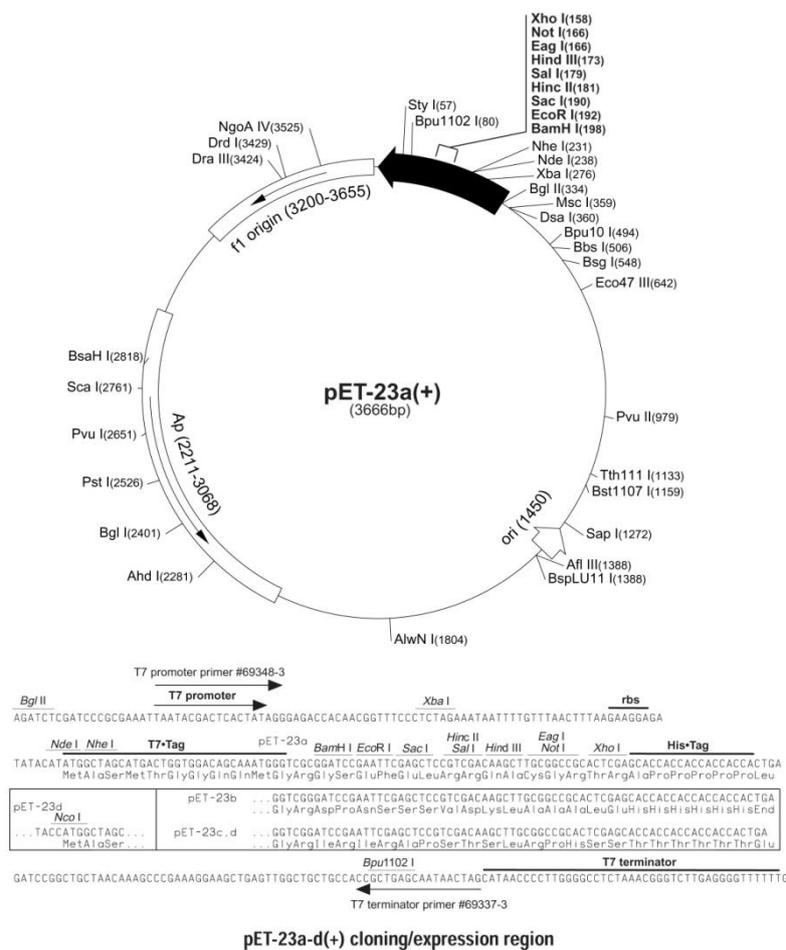
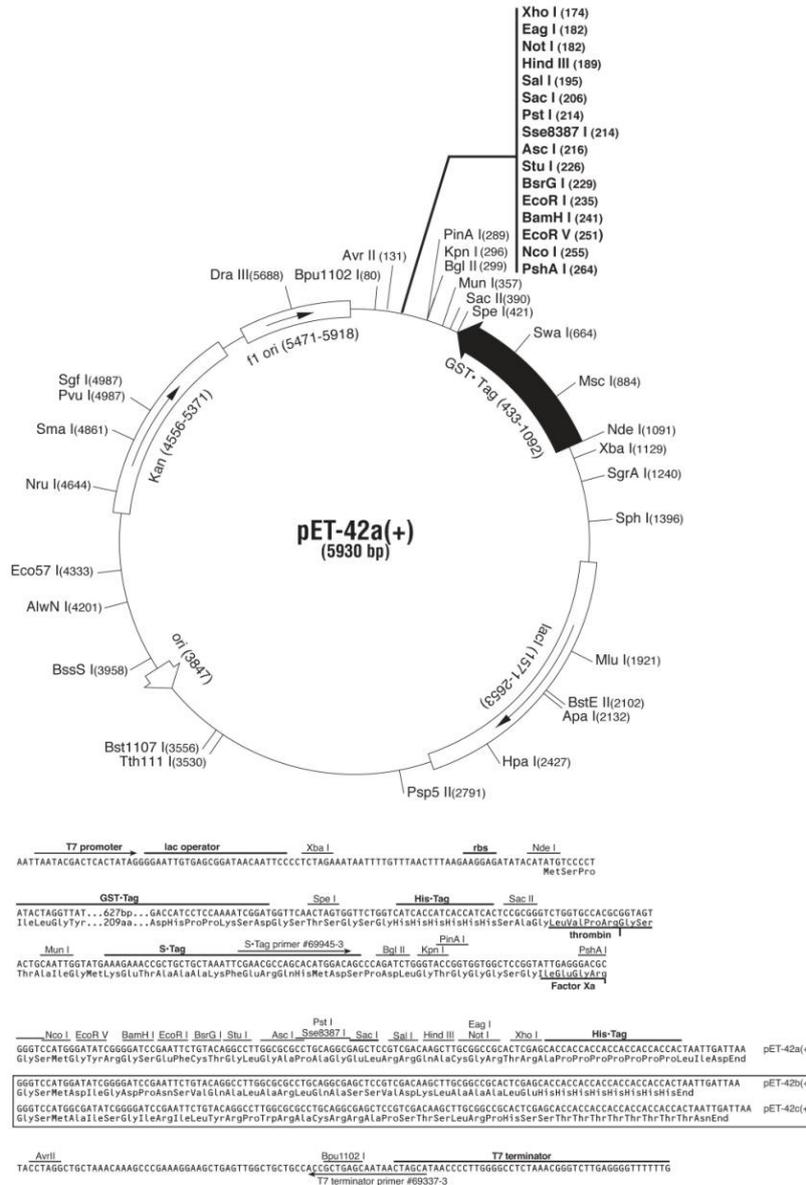


Abb. 74: pET23a-d(+)-Vektorkarte

### 3.4.2 pET42b(+)

Dieser Vektor gestattet die Expression von den Proteinen in Fusion mit einem N-terminalen GST-Tag. Der Abb. 75 kann man die pET42a-c(+)-Vektorkarte mit der Klonierungsregion entnehmen.



pET-42a(+) cloning/expression regions

Abb. 75: pET42a-c(+)-Vektorkarte

## 3.5 Proteine und Enzyme

Die rekombinanten 14-3-3  $\zeta$  und  $\gamma$ -Isoformen und der Histon-Mix aus Kälberthymus stammten von Sigma-Aldrich. CDK1-Cyclin B wurde bei New England BioLabs (Frankfurt am Main) erworben.

## 3.6 cDNA-Klone

Die cDNA-Klone wurden in Form von Agarosestocks von ImaGenes GmbH (Berlin) bezogen.

## 3.7 Bakterienstämme

*E. coli*-Stämme kompetenter Zellen stammen von Stratagen (Agilent Technologies, Waldbronn) oder Novagene (Merck KGaA, Darmstadt).

### 3.7.1 *E. coli* XL1-blue

Die routinemäßige Klonierung mit dem *E. coli*-Stamm XL1-blue beinhaltet die Vervielfältigung von Plasmidkonstrukten zur weiteren Bestimmung und für die Sequenzierung. Der Genotyp lautet wie folgt:  
*E. coli recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F'proAB lac<sup>f</sup>ZΔM15 Tn10 (Tet<sup>r</sup>)]*

### 3.7.2 *E. coli* BL21(DE3)pLys und Rosetta (DE3)pLysS (Expressionsstämme)

Das Genom der *E. coli*-Stämme BL21(DE3) pLysS und Rosetta(DE3) enthält den  $\lambda$  Prophagen (DE3 lysogen), indem das Gen für die T7-RNA-Polymerase unter Kontrolle des lacUV5-Promotors steht. Ferner enthält er eine zusätzlich Sequenz (lacI), die für den lac-Repressor kodiert. Damit eignen sich diese Stämme besonders gut für die IPTG-induzierte Expression von rekombinanten Proteinen aus Vektorkonstrukten, bei denen eine T7-Promotorsequenz dem Gen vorgeschaltet ist, so wie es beim pET-Vektorsystem der Fall ist. Die Expression der T7-RNA-Polymerase steht unter Kontrolle des lacUV5-Promotors. Außerdem ist im Vektor die Genexpression unter Kontrolle des T7-Promoters geregelt. Die Transkription und Translation wird bei beiden durch das lac-Repressorproteins inhibiert. Die Induktion der Genexpression ist durch die Inaktivierung desselbigen durch IPTG-Zugabe geregelt, wobei dadurch die Expression der T7-RNA-Polymerase eingeleitet wird und diese, die Gene unter T7-Promotorkontrolle transkribieren kann.

BL21(DE3)pLysS enthält ein eigenes Chloramphenicol-resistentes Plasmid (pLysS), welches im geringen Maß die Expression eines T7-Polymerase-Inhibitors (T7-Lysozyme) ermöglicht<sup>[240-241]</sup> und somit die Basalexpression des Zielproteins in IPTG-Abwesenheit unterdrückt.<sup>[242-243]</sup> Diese Eigenschaft wirkt sich besonders positiv aus, wenn das Protein für den Wirtsstamm toxisch ist.

Ein zusätzliches Plasmid im Rosetta(DE3)pLysS Stamm enthält tRNA-Gene für Codons, die in *E. coli* selten vorkommen (AGG, AGA, AUA, CUA, CCC, GGA) und ermöglicht somit auch die Proteinexpression von Genen die ein erhöhtes Level solcher Codons aufweisen.

Genotyp von *E. coli* BL21 (DE3) pLysS: B F<sup>-</sup> *dcm ompT hsdS*(r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) *gal*  $\lambda$ (DE3)[pLysS Cam<sup>r</sup>]

Genotyp von *E. coli* Rosetta(DE3)pLysS: F<sup>-</sup> *ompT hsdS*<sub>B</sub>(r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) *gal dcm* (DE3) RARE (Cam<sup>R</sup>)

### 3.8 Geräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Analysenwaagen	CPA224S-OCE AC-1200D	Satorius AG, Göttingen Denver Instruments Copany, USA
CO <sub>2</sub> -Brutschrank	CB 150	Binder GmbH, Tuttlingen
Elektroporator	Easyject Prima EquiBio	Thermo Electron Corporation, USA
Elektrophorese- kammer	Mini Trans-Blot cell	Biorad, München
ESI-TOF MS	Mariner <sup>TM</sup> Biospectrometry Workstation	PerSeptive Biosystem Inc., USA
Feinwaage	AT21 Comparator	Mettler, Schweiz
Hochdruck- Zellaufschluss- systeme	French Pressure cell press, EmulsiFlex-C3 Hochdruck- Homogenisator	SLM Aminco, USA Avestin, Mannheim
Horizontale Minigel- Elektrophorese	PerfectBlue Gelsystem Mini S für 7x8 cm Gele	PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen
HPLC-Anlage	Varian ProStar mit isokratischen Hochdruckpumpen ProStar 210 & UV-Vis Detektor ProStar 325	Varian Deutschland GmbH, Darmstadt
Lumineszenz- Transilluminator	Lumi-Imager F1 Workstation	Boehringer-Mannheim GmbH, Mannheim
Lyophilisator	Alpha 2-4 LSC	Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode am Harz
Inverses Mikroskop	Wilovert 30	Helmut Hund GmbH, Wetzlar
Multifunktions- mischer	Roto Shake Genie	Scientific Industries Inc., USA
NMR-Spektrometer	AV300	Bruker Daltonik GmbH, Bremen
Peptidsynthese- automat	ResPep XL Synthesizer	Intavis Bioanalytical Instruments AG, Köln
pH-Meter	inoLab pH Level2	WTW, Weilheim
Rotationsverdampfer /Heizbad	RV10 basis/ HB10 basic	IKA, Staufen
Rotierender Plattformschüttler	Unimax 1010	Heidolph Instruments, Schwabach
Rotoren (Spezialeinsätze)	JLA 10.500 (10.000rpm) für Avanti J JA 25.50 (25.000 rpm) für Avanti J TLA 100.4 (100K rpm) für Optima TLX	Beckmann, USA Beckman, Ireland Beckman, USA
Schüttelinkubator	Innova 4230 Refrigerated Incubator Shaker	New Brunswick Scienfic , USA
Spannungsquelle	Electrophoresis Power Supply EPS 601	Amersham pharmacia biotech, Schweden
Spektralphotometer	ND-1000 Spectrometer	PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Thermocycler	Gene Amp PCR System 2400, Perkin Elmer	Norwalk, USA
Thermoschüttler	Thermomixer confort	Eppendorf, Hamburg
Ultraschallgerät	Sonorex RK 52H	Bandelin elektronik, Berlin
UV-Transluminator	TCX-15.M	Vilber Lourmat, Eberhardzell

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
<b>UV-Vis-Spektrophotometer</b>	DU 640	Beckman, USA
<b>Vakuumpumpe/ -Kontroller</b>	CVC 24/ MZ2C	Vacuubrand GmbH + Co KG, Wertheim
<b>Vakuumentrifugen</b>	Integrated SpeedVac System ISS100/ Thermo-Savant SPD 1010 SpeedVac System	Savant Instruments Inc., USA Thermo Fisher Scientific, Langenselbold
<b>Vortex-Schüttler</b>	Vortex Genie2	Scientific Industries Inc., USA
<b>Waagen</b>	Explorer	Ohaus, Schweiz
<b>Western-Blot-Apparatur</b>	Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell	Biorad, München
<b>Zentrifugen</b>	Minispin plus Universal 30RF Zentrifuge Avanti J-25 OptimaTLX Ultrazentrifuge Centrifuge 5702 R	Eppendorf, Hamburg Hettich, Tuttlingen Beckman Coulter GmbH, Krefeld Beckman Coulter GmbH, Krefeld Eppendorf, Hamburg

Abb. 76: Geräteliste

### 3.9 Programme

ESI-Massenspektrometer:	Mariner Instrument Control Panel Version 4.0.0.0 (Applied Biosystems)
ESI-Massenspektren:	Data Explorer®Software Version 4.10 (Applied Biosystems)
Bioinformatik:	DNA-Star - EditSequ, MapDraw, MegAlign, Protean, Windows 32 (DNASStar, Inc.)
HPLC:	Galaxie Chromatography Data System Version 1.9.3.2 (Varian)
Nano-Drop:	Nano Drop ND-1000 V3.5.2, (Coleman Technologies Inc.)
Lumineszenz-Transilluminator:	Lumi Analyst Version 3.0.00.00 (Boehringer-Mannheim GmbH)
NMR-Datenauswertung:	Topspin 2.1 (Bruker)
Tabellenkalkulation/Diagramme :	Microsoft Office Excel 2007 (Microsoft) und Sigma Plot Version 11.0 (Systat Software, Inc.)
Textverarbeitung:	Microsoft Office Word 2007 (Microsoft)
Grafik-Erstellung:	Microsoft Office PowerPoint 2007 (Microsoft) Adobe Photoshop 6.0.1 (Adobe)

Tab. 15: Programmliste

## 4 METHODEN

### 4.1 Analytischer Service

#### 4.1.1 DNA-Sequenzierung

Zur Überprüfung von Gensequenzen in Vektorkonstrukten wurden DNA-Sequenzierungen (Methode: Kettenabbruchmethode nach Sanger) durch die Firma Stratec molecular (Berlin) durchgeführt.

#### 4.1.2 Bestimmung der Festphasenbeladung mit Peptiden

Für die Aminosäureanalyse von Matrix-gekoppelten Peptiden wurden die Firma Genaxxon bioscience (Ulm) beauftragt. Folgendes Protokoll wurde dafür angegeben: Zunächst wurden die getrockneten Proben in ein Hydrolyseröhrchen überführt, mit 500 µL 6M HCl versetzt, dieses unter Vakuum verschmolzen und die Proben bei 110°C für 24 Std. hydrolysiert. Anschließend wurden die Proben acht Std. in der Vakuumzentrifuge bei 36°C getrocknet. Die getrockneten Proben wurden in 500 µL Probenverdünnungspuffer (Na-Acetatpuffer; pH 2,2) aufgenommen. Die erhaltenen Lösungen wurden über einen 0,2 µm Zentrifugenfilter (Millipore PVDF Membran) filtriert. Es wurden gelbliche Flüssigkeiten erhalten, die nach entsprechender Verdünnung, der Aminosäureanalyse zugeführt wurden. Die Aminosäureanalyse wurde an einem Aminosäureanalysator LC3000 durchgeführt und erfolgte mittels Auftrennung des Probengemisches über eine Polymer-Kationenaustauschersäule, Partikelgröße 4µm, (LxD 125 x 4 mm), Nachsäulen-Derivatisierung mit Ninhydrin bei 125°C und photometrischer Detektion bei 570 nm. Das Probenvolumen betrug 20 µL. Die Datenaufnahme erfolgte mit der Chromatographie-Software ChromStar 6.0.

### 4.2 Chemische Methoden

#### 4.2.1 Chromatographische Methoden

HPLC-Läufe an der Varian-ProStar wurden standardmäßig unter Verwendung eines linearen Lösungsmittelgradienten von 5 bis 95% B in 40 min, unter Einsatz der entsprechenden Säule, bei einer Maßstabs-abhängigen Flussrate von 1 ml/min (analytisch: Nucleosil, 100-5, C1,8 EC, LxD 250x4,6 mm, Machery-Nagel, Düren), 4 mL/min (semipräparativ: VariTide, RPC, LxD 250x10 mm,

Varian Deutschland GmbH, Darmstadt) bzw. 13 mL/min (präparativ: Dynamax, Microsorb, 300-10, C18 LxD 250x21,4 mm, Varian Deutschland GmbH) durchgeführt. Für analytische Läufe wurde ein Probenschleifen-definiertes Volumen von 20  $\mu\text{L}$  (Probenkonzentration: 1-2 mg/mL), für semipräparative Läufe 2 mL (bis 6 mg/mL) und für präparative Peptidaufreinigung 5 mL (bis 5 mg/mL) eingesetzt. Als Laufmittel A diente  $\text{H}_2\text{O}$ , 0,1% TFA (v/v), als Laufmittel B 80% ACN in  $\text{H}_2\text{O}$ , 0,1% TFA (v/v/v). Zur Detektion der Peptide wurde die Wellenlänge ( $\lambda$ ) 218 nm genutzt.

#### 4.2.2 Allgemeine massenspektrometrische Methoden (ESI-TOF-MS)

Die Identität von Verbindungen einschließlich der Peptide wurde durch Messungen am ESI-TOF-Massenspektrometer, unter Verwendung einer Lösung (ca. 0,5-1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) in 50% ACN in  $\text{H}_2\text{O}$ , 0,1% Ameisensäure (v/v/v) bei einer Detektorspannung von 1850 V im positiven Modus überprüft.

#### 4.2.3 SILAC-spezifische massenspektrometrische Methoden

##### 4.2.3.1 MS-Probenpräparation

Für die MS-Analyse wurden die Proteine im Acrylamidgel durch Behandlung mit Trypsin verdaut und die resultierenden Peptide aus dem Gel herausgelöst.<sup>[244]</sup> Dafür wurde die Gelbande zunächst in vierzig Teile zerschnitten. Dabei wurde darauf geachtet, dass deutlich angefärbte Banden in einer Probe erhalten bleiben. Die Proben wurden drei Mal mit 500  $\mu\text{L}$  destilliertem Wasser, ein Mal mit 200  $\mu\text{L}$  25 mM Ammoniumhydrogencarbonat in ACN/ $\text{H}_2\text{O}$  (1:1) und ein Mal mit 200  $\mu\text{L}$  50 mM Ammoniumhydrogencarbonat, jeweils für 10 min, gewaschen. Anschließend wurden die Gelstücke durch Zugabe von 200  $\mu\text{L}$  ACN dehydriert und in einer Vakuumzentrifuge getrocknet. Die Proteine wurden im Gel durch Zugabe von 50 ng Trypsin (*sequencing grade modified*, Promega) in 10  $\mu\text{L}$  50 mM Ammoniumhydrogencarbonat über Nacht bei 37°C verdaut. Nach Abstoppen der Reaktion durch Zugabe von 10  $\mu\text{L}$  0,5% (v/v) TFA in ACN und 10-minütiger Behandlung der Proben im Ultraschallbad wurden die Überstände jeweils in ein Glasvial überführt. Die Gelstücke wurden mit ACN dehydriert und der Überstand mit dem vorherigen kombiniert. Nachdem die Proben in einer Vakuumzentrifuge vom Lösungsmittel befreit und in 6  $\mu\text{L}$  0,1% (v/v) TFA, 5% (v/v) ACN in  $\text{H}_2\text{O}$  gelöst wurden, wurden sie bei -20°C bis zur Messung gelagert.

##### 4.2.3.2 Nano-LC-ESI-Tandem-MS

Die LC-MS/MS-Analysen wurden mit einem LTQ Orbitrap XL-Massenspektrometer (Thermo Scientific, Dreieich, DE), mit einem vorgeschaltetem Eksigent 2D Nano-LC-System (Axel Semrau GmbH, Sprockhövel, DE), durchgeführt.<sup>[135]</sup> Als Verbindung vom LC-System zum Massenspektrometer diente eine Nanosprayquelle (Proxeon, Odense, Dänemark) mit einem 10  $\mu\text{m}$  *i.d.* PicoTip ESI Emitter (New Objective, Woburn, MA, USA). Es wurden jeweils 5  $\mu\text{L}$  der Proben (bei konzentrierten Proben die GST oder GST-FHL3 enthielten nur 2  $\mu\text{L}$ ) auf eine Vorsäule (PepMap, C18, 5  $\mu\text{m}$ , 100 Å, LxD 5 mm x 300  $\mu\text{m}$ , Dionex, Idstein, DE) injiziert und diese unter Verwendung von 0,1% TFA, 2% ACN in  $\text{H}_2\text{O}$  aufkonzentriert. Die Trennung der Peptide erfolgte auf einer analytische Säule (PepMap, C18, 3  $\mu\text{m}$ , 100 Å, LxD 250 mm x 75  $\mu\text{m}$ , Dionex) mit einer Flussrate von 200 nL/min in einem

Lösungsmittelsystem aus A: 0,1% Ameisensäure (v/v) in H<sub>2</sub>O und B: 0,1% Ameisensäure (v/v) in ACN das unter Verwendung eines linearen Gradienten von 3 auf 50% B in 90 min gefahren wurde. Die Anfertigung der MS/MS-Spektren erfolgte im datenabhängigen Modus unter Erzeugung vom MS-Scans mit einer 30.000-Auflösung im Orbitrap und paralleler MS/MS-Scans der vier intensivsten Vorläuferionen in der LTQ. Der Massenbereich des MS-Scans befand sich im Bereich von m/z 350-1500 mit einer dynamischen Ausschlusszeit für Vorläuferionen von 120 s. Die automatische Ionenzahlmessung wurde auf  $1 \times 10^6$  bzw. 20.000 für Orbitrap-MS bzw. LTQ-MS/MS Scans gesetzt.

#### 4.2.3.3 MS-Datenverarbeitung und Quantifizierung

Zur Identifizierung und Quantifizierung der SILAC-Daten wurde die Software MaxQuant (Version 1.1.1.36)<sup>[137-138]</sup> verwendet. Generierte Peaklisten wurden an die Andromeda Suchmaschine<sup>[245]</sup> übermittelt und ein Abgleich mit einer IPI Maus-Protein-Datenbank (Version 3.68) vorgenommen. Die Massentoleranz der Vorläufer- und Tochterionen wurde generell auf 20 ppm und 0,35 Da gesetzt. Als variable Modifizierungen wurden sowohl Oxidationen am Methionin als auch Acetamidaddukte am Cystein berücksichtigt. Grundlage für die Einhaltung der Falschidentifizierungshäufigkeit (FDR) mit < 0,1% war die statistische Fehlerwahrscheinlichkeit (PEP) basierend auf einer implizierten inversen *Nonsense*-Datenbank. Ein Protein wurde als identifiziert angesehen, wenn es in zwei Experimenten identifiziert worden ist und mindestens mehr als ein einzigartiges Peptid (UP, *unique peptides*) der Sequenz in einem der Experimente zugeordnet werden konnte (Projekt 1) bzw. in beiden Experimenten mehr als zwei UP (Projekt 2) aufwies. Proteinverhältnisse wurden akzeptiert, wenn in mindestens einem der zwei Experimente das Sequenzierungsereignis (*ratio counts*) mit > 1 zur Quantifizierung beitrug (Projekt 1) bzw. *ratio counts* > 2 in beiden Experimenten aufwies.

#### 4.2.4 Kernmagnetische Resonanzspektroskopie (NMR)

Das <sup>1</sup>H- und die <sup>13</sup>C-NMR-Spektren wurden an einem AV 300 MHz Spektrometer bei 25°C aufgenommen. Die chemische Verschiebung ( $\delta$ ) in ppm wurde am Lösungsmittel DMF-d<sup>7</sup> als Standard ausgerichtet. Signalmultiplizitäten wurden, wie folgt abgekürzt: d = Dublett, q = Quadruplett, m = Multipllett. Kohlenstoffatome wurden abgekürzt mit: Q<sub>q</sub> = Quartäres C-Atom, C<sub>t</sub> = Tertiäres C-Atom, C<sub>s</sub> = Sekundäres C-Atom und Q<sub>p</sub> = Primäres C-Atom

#### 4.2.5 Synthesen

##### 4.2.5.1 Fmoc-L-Phosphonomethylenalanin-Synthese

Es wurden 40 mg (220  $\mu$ mol) L-Phosphonomethylenalanin und 23 mg (220  $\mu$ mol) Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> in 8 mL 50% Aceton in H<sub>2</sub>O gelöst und innerhalb einer Std. 70 mg (210  $\mu$ mol) N-(9-Fluorenylmethoxycarbonyloxy)-succinimid portionsweise unter Rühren zugefügt. Nach pH-Wert-Einstellung auf 10, durch Zugabe von 1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lsg., wurde die Lösung über Nacht bei RT gerührt. Die wässrige Phase wurde zunächst zwei Mal mit je 10 mL Diethylether gewaschen. Nach Abtrennung der organischen Phase wurden 20 mL Ethylacetat zugegeben, der pH mittels Zugabe von konz. HCl auf 1 eingestellt und die wässrige Phase ausgeschüttelt. Nach nochmaligen Ausschütteln mit 5 mL

Ethylacetat wurden die organischen Phasen vereinigt und drei Mal mit 10 mL H<sub>2</sub>O gewaschen. Die organische Phase wurde über Mg<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Es wurde ein weißlicher Feststoff erhalten. Ausbeute = 41 mg (101 μmol, 48%), ESI-MS: m/z (Fmoc-L-Pma, [M+H]<sup>+</sup>) = 406, t<sub>R</sub> = 25,7 min, <sup>1</sup>H-NMR (DMF-d<sub>7</sub>): δ = 7,9 ppm (d, 2H, CH=CH, H-Ar); 7,8 (m, 2H, CH=CH, H-Ar) 7,5-7,3 (m, 2H, CH=CH, H-Ar); 4,4 (m, 4H, 1x CH-CH<sub>2</sub>/1xCH<sub>2</sub>-O-C=O/1xNH-CH-CO<sub>2</sub>H); 2,1 (q, CH<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>); 1,9 (m, CH<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>-PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>), <sup>13</sup>C-NMR (DMF-d<sub>7</sub>): δ = 174,4 (C<sub>q</sub>, CO<sub>2</sub>H); 157,6 (C<sub>q</sub>, CO<sub>2</sub>R); 145,1 (C<sub>t</sub>, Ar-C); 142,1 (C<sub>t</sub>, Ar-C); 128,7 (C<sub>t</sub>, Ar-C); 128,1 (C<sub>t</sub>, Ar-C); 126,5 (C<sub>t</sub>, Ar-C); 121,0 (C<sub>t</sub>, Ar-C); 67,2 (C<sub>s</sub>, C-CO<sub>2</sub>-); 55,5 (C<sub>p</sub>, N-C-CO<sub>2</sub>H); 48,1 (C<sub>p</sub>, Ar-C-Ar); 26,6 (C<sub>s</sub>, C-PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>); 24,5 (C<sub>s</sub>, C-C-PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>).

#### 4.2.5.2 Peptidsynthese

Die Synthese aller Peptide wurde unter den Standardbedingungen der Fmoc-(Fluorenylmethoxycarbonyl)-Schutzgruppenstrategie an der Festphase (SPPS)<sup>[94]</sup> durchgeführt. Bei den verwendeten Fmoc-L-Aminosäuren handelte es sich um Bausteine mit den aufgelisteten Schutzgruppen (Tab. 16, Tab. 17 und Tab. 19). Die strategisch günstigen Stellen an denen zur Aggregationshemmung Fmoc-Dipeptidbausteine in Form von Pseudoprolinen (ψ-Me, Mepro) oder Fmoc-Gly-N-α-(Dmb)Gly-OH in die Aminosäuresequenz eingebaut wurden sind Tab. 18 zu entnehmen.

Standard-AS mit geschützten Seitengruppen						
<b>Fmoc-Baustein</b>	C	K	Q	R	S	T
<b>Schutzgruppe/Modifikation</b>	Trt	Boc	Trt	Pbf	tBu	tBu

Tab. 16: Übersicht der Aminosäuren mit gängigen Schutzgruppen

Dipeptid				
<b>Fmoc-Baustein</b>	Gg	At	Ks	Qt
<b>Schutzgruppe/Modifikation</b>	G-N-α-(Dmb)G	A-T(ψMe, Mepro)	K(Boc)-S(ψMe, Mepro)	Q(Trt)-T(ψMe, Mepro)

Tab. 17: Übersicht der verwendeten Dipeptidbausteine

Bezeichnung	Peptidsynthesesequenz
H3tailpS10	A R T K Q T A R K <b>pS</b> T G G K A P R K Q L A T K A A R K S A P A T G K
D-H3tailCys	A R T K Q T A R K S T G G dmb K A P R K Q L <u>A</u> t K A A R K S A P A T G C
H3-tailCys	A R T K <u>Q</u> t A R <u>K</u> s T G G K A P R K Q L <u>A</u> t K A A R <u>K</u> s A P A T G C
H3tailPma10Cys	A R T K <u>Q</u> t A R K <b>Pma</b> S T G G K A P R K Q L <u>A</u> t K A A R <u>K</u> s A P A T G C
H3tailpS10Cys	A R T K <u>Q</u> t A R K <b>pS</b> T <u>Gg</u> K A P R K Q L <u>A</u> t K A A R <u>K</u> s A P A T G C
H3tailpT3Cys	A R <b>pT</b> K <u>Q</u> t A R K S T <u>Gg</u> K A P R K Q L <u>A</u> t K A A R <u>K</u> s A P A T G C
H3tailpT6Cys	A R T K Q <b>pT</b> A R <u>K</u> s T G G K A P R K Q L <u>A</u> t K A A R <u>K</u> s A P A T G C
H3tailpT11Cys	A R T K <u>Q</u> t A R K S <b>pT</b> <u>Gg</u> K A P R K Q L <u>A</u> t K A A R <u>K</u> s A P A T G C
H3tailpS28Cys	A R T K <u>Q</u> t A R K S T <u>Gg</u> K A P R K Q L <u>A</u> t K A A R K <b>pS</b> A P A T G C

Tab. 18: Übersicht der H3-Tail-Sequenzen und Markierung der Dipeptid-Positionen (D-AS in grau)

Die Synthese der Peptide erfolgte größtenteils am Syntheseautomaten unter Verwendung einer Aktivator-Stammlösung von 0,5 M 2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumhexafluorophosphat (HBTU)/ 0,5 M Hydroxybenzotriazole (HOBt), 4 M N-Methylmorpholin (NMM) als Base und 20% Piperidin zur Fmoc-Schutzgruppenabspaltung in einem DMF/NMP-Lösungsmittelsystem. Die Herstellung des H3tailpS10-Peptid erfolgte an einer NovaSyn®TGR-Festphase (Novabiochem) im 50 µmol-Maßstab. Der Synthesemaßstab aller anderen Peptide wurde auf 25 µmol gesetzt und standardmäßig eine TentaGel R RAM Festphase (0,19 mmol/g, R Rapp Polymere GmbH; Tübingen) verwendet. Die Kupplung der pSer/pThr-Aminosäuren erfolgte manuell unter Einsatz von vier Äquivalenten (100 µmol) entsprechender monobenzyl-geschützter Fmoc-Bausteine, 95 µmol HBTU und HOBt und 150 µmol DIPEA in 400 µl DMF für zwei Stunden. Für H3tailpS10 wurden entsprechend dem Synthesemaßstab doppelte Mengen eingesetzt.

	Dmb-AS	Phospho-AS		
<b>Fmoc-Baustein</b>	Gdmb	pS	pT	Pma
<b>Schutzgruppe/Modifikation</b>	N-α-Dmb	PO(OBzl)-OH	TO(OBzl)-OH	CH <sub>2</sub> -PO(OH) <sub>2</sub>

Tab. 19: Übersicht über den Gdmb-Baustein, Phosphoserin- und Phosphothreonin-Bausteine sowie Pma

Die Synthese des H3tailPmaCys-Peptid erfolgte ab Thr11 manuell. Alle natürlichen Aminosäuren wurden generell per Doppelkupplung im 5-fachen Überschuss (125 µmol) eingesetzt und die Reaktion unter geringem Aktivatorunterschuss an HBTU/HOBt (120 µmol), in 500 µl 400 mM NMM in DMF, für je zwei Std. durchgeführt. Fmoc-L-Phosphonomethylenalanin (Fmoc-L-Pma) wurde manuell zunächst für 2 Std. und anschließend ÜN, unter Verwendung von zwei Äquivalenten (50 µmol) per Doppelkupplung in die Sequenz eingefügt. Nach jedem Kupplungsschritt wurde die Festphase mit 5 ml 6% 2,6-Lutidin/5% Essigsäureanhydrid in DMF für fünf Minuten behandelt (*Capping*). Die Abspaltung der Fmoc-Gruppe erfolgte generell mit 20% Piperidin in DMF für dreimal zehn Minuten. Die Festphasen wurde zwischen den Schritten exzessiv mit DMF und Dichlormethan (DCM) gewaschen. Die Seitenkettenentschützung und Abspaltung vom Harz erfolgte mit insgesamt 10 ml TFA/Phenol/Triisopropylsilan(TIPS)/H<sub>2</sub>O (85:5:5:5) für mindestens vier Stunden. Die

Abspaltungslösungen wurde auf ca. 2 mL am Rotationsverdampfer eingeeengt und die Peptide anschließend in Diethylether (-20°C) gefällt. Abschließend wurden sie zweimal mit kaltem Diethylether gewaschen, in H<sub>2</sub>O gelöst und am Lyophilisator ÜN vom Lösungsmittel befreit. Die Identität und Reinheit der HPLC aufgereinigten Peptide wurden per ESI-MS und analytischer HPLC überprüft. Analytische HPLC: :  $t_R$  (H3tailpS10) = 10,9 min,  $t_R$  (D-H3tailCys und H3tailCys) = 13,3-13,5 min,  $t_R$  (H3tailPmaCys) = 13,1  $t_R$  (phosphorylierte H3-Peptide) = 12,6-13,1 min, ESI-MS (Hauptsignal): m/z (H3tailpS10, [M+6H]<sup>6+</sup>) = 601,2; m/z (D-H3tailCys und H3tail, [M+7H]<sup>7+</sup>) = 500,5; m/z (H3tailPmaCys, [M+6H]<sup>6+</sup>) = 596,8; m/z (phosphorylierte H3tailCys-Peptide, [M+6H]<sup>6+</sup>) = 597,0.

#### 4.2.6 Herstellung kovalent gebundener H3-Tail-Peptide an Agarosematrix

Als Festphase zur Peptidimmobilisierung diente SulfoLink Agarose (*SulfoLink Coupling Resin*, Thermo Scientific GmbH), welche laut Hersteller imstande ist pro mL Matrixmaterial 1 mg Peptid durch Ausbildung einer Thioetherbindung kovalent zu binden. Zunächst wurde der Überstand der Matrixsuspension entfernt und die Agarosekügelchen mit Kopplungspuffer (50 mM TrisHCl, 5 mM EDTA·2Na, pH 8,5) äquilibriert. Die Inkubation mit 1 mM Peptidlösung in Kopplungspuffer erfolgte mit 7-fachen Peptidüberschuss, also 1:1 (v/v) zur SulfoLink Suspension (50%) für eine Std., bei RT, unter Schütteln. Die Peptidlösung wurde anschließend entfernt und die Festphase drei Mal mit Kopplungspuffer gewaschen, bevor mit 1 Vol. Blocking-Lösung (50 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol in Kopplungspuffer) alle verbliebenen reaktiven Iodacetylgruppen blockiert wurden. Nach einer Std. Inkubationszeit bei RT unter Schütteln wurde der Überstand entfernt und die Peptid-beladene Agarose wurde sechsmal mit 1 M NaCl-Lösung, zweimal mit H<sub>2</sub>O und viermal mit Lagerpuffer (50% ACN in H<sub>2</sub>O) gewaschen. Nach Zugabe von einem Vol. Lagerpuffer zur Festphase wurden die resultierende Suspension, ggf. aliquotiert und bei -20°C gelagert. Der Verlust an Peptid-beladenen Matrixmaterial, der während der Prozedur durch Abnehmen der Überstände entstand, konnte durch Verwendung einer Filterspritze minimiert werden.

### 4.3 Molekularbiologische Methoden

#### 4.3.1 SDS-PAGE

Die diskontinuierliche SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese), die sich durch ein mit Sammelgel überschichtetes Trenngel auszeichnet, wurde nach Laemmli durchgeführt<sup>[246]</sup>, indem folgender Laufpuffer (1% SDS (w/v), 25 mM Tris, 192 mM Glycin) und folgendes Rezept für die Herstellung der Gele verwendet wurden.

Sammelgel	Trenngel	Chemikalie
125 mM (pH 6,8)	375 mM (pH 8,8)	Tris-HCl
3,75%	10-15%	Acrylamid/Bisacrylamid 37,5:1 (w/v)
0,1%	0,1%	SDS (w/v)
0,1%	0,1%	TEMED (v/v)
0,04%	0,04%	APS (w/v)

Tab. 20: SDS-Gel Rezept

Der Anteil an Acrylamid (10, 12 oder 15%) im Gel wurde dem interessierenden Auftrennungsbereich, je nach Proteingröße angepasst. Um eine bessere Auflösung bei der Proteinauftrennung im gesamten Proteingrößenbereich, wie es z.B. für die SILAC-Proben erforderlich war, zu erhalten, wurden Tris-Glycin-Gradientengele (4–20%, Biorad, Mini-Protean TGX, München) verwendet. Diese Gele wurden bei 135 V laufen gelassen, eine Stunde mit Fixierlösung (40% MeOH, 10% AcOH in H<sub>2</sub>O) behandelt, mit kolloidaler SILAC-Coomassie-Lösung (37% Methanol (v/v), 17% Ammoniumsulfat (w/v), 3% (v/v) Phosphorsäure, 0,1% Coomassie-Brilliantblau G-250 (w/v) - leicht abgeändert von der Neuhoff-Färbelösung<sup>[247]</sup>), gefärbt und danach mehrere Stunden mit 1% Essigsäure entfärbt, bis sich die Banden deutlich farblich absetzten. Alle anderen Gele wurden standardmäßig bei 180 V laufen gelassen, danach drei Mal mit H<sub>2</sub>O gewaschen und dabei kurz, ohne Aufkochen, in der Mikrowelle erwärmt. Die Färbelösung wurde durch 2-stündiges Rühren von 70 mg Coomassie-Brilliantblau G-250 in 1 L H<sub>2</sub>O und anschließende Zugabe von 3 mL konz. HCl zubereitet und für 10-30 min mit dem Gel inkubiert. Die Banden wurden nach 5-20 Minuten sichtbar und hoben sich nach längerem Waschen mit H<sub>2</sub>O deutlich vom Hintergrund ab.

### 4.3.2 Agarosegelelektrophorese

DNA-haltige Proben wurden zu analytischen oder präparativen Aufreinigungszwecken standardmäßig in einem 1%igen Agarosegel (w/v), komplementiert mit 0,3 mg Ethidiumbromid/L, in TAE-Puffer (400 mM Tris-Acetat, 1 mM EDTA, pH : 8,6) bei 120 mA für 30-40 min gelelektrophoretisch getrennt. Die Detektion im Gel erfolgte auf einem UV-Transilluminator.

### 4.3.3 Immundetektion von Proteinen (Western Blotting)

Für die Immundetektion spezifischer Proteine wurden die, per SDS-PAGE aufgetrennten Proteine aus dem SDS-Polyacrylamidgel auf eine Nitrocellulosemembran, bei 200 mA für 2 Std. (RT) oder ÜN (8°C) bei 20 mA, transferiert. Die Protein-beladene Membran wurde im Anschluss durch einstündige Inkubation mit 2% Milchpulver (*Blotting grade*) in Waschpuffer bei RT geblockt. Die Inkubation der Membran mit Primär- und Sekundärantikörpern erfolgte nacheinander in Blockpuffer. Die Membran wurde dafür für eine Std. bei RT oder ÜN bei 8°C in Antikörperlösung in Folie eingeschweißt und geschüttelt. Unspezifisch bindende Antikörper wurden zwischen den Schritten durch drei Mal 5-minütiges Waschen mit Waschpuffer entfernt.

<b>Blotpuffer</b>	12 mM TrisHCl, 96 mM Glycin, 0,015 % SDS, 20% MeOH, pH: 8,3 (RT)
<b>Waschpuffer</b>	20 mM TrisHCl, 150 mM NaCl, 0,1% Tween-20, pH: 7,2-7,4 (RT)
<b>Blockpuffer</b>	2% Milchpulver im Waschpuffer
<b>Antikörperlsg.</b>	1:200-1:1000 Verdünnung im Blockpuffer
<b>Stripping-Lsg.</b>	50 mM Tris-HCl, 2% SDS, 100 mM $\beta$ -Mercaptoethanol, pH 6,8 (RT)

Tab. 21: Verwendete Puffer und Lösungen für das Western Blotting

Die Immunodetektion der Proteine erfolgte durch HRP (Meerrettichperoxidase)-konjugierte Sekundärantikörper und wurde durch ein ECL (*Enhanced Chemiluminescence*)-Detektionskit am Lumineszenz-Transilluminator visualisiert. Nach abgeschlossener Detektion wurde, nach Bedarf, die mit Primär/Sekundärantikörperkomplex-beladene Membran durch Behandlung mit „Stripping“-Lösung für 15 min bei 50°C vom Antikörperkomplex befreit. Anschließend wurde sie, nach mehrmaligem Waschen mit Waschpuffer und Behandlung mit Blockingpuffer, erneut zur Immundetektion genutzt, indem sie mit anderen Protein-spezifischen Antikörpern inkubiert wurde.

#### 4.3.4 Allgemeines Arbeiten mit *E. coli*

Bei der Kultivierung von *E. coli*-Stämmen wurden die üblichen Vorgehensweisen zum Arbeiten an der Sterilbank befolgt. Alle verwendeten Verbrauchsmaterialien, Gefäße und eingesetzte Lösungen wurden durch Autoklavieren bei 120°C bei 2 bar für 15 min oder durch Sterilfiltration (Porengröße: 0,20  $\mu$ m) entsprechend hergestellt. Die Identitäten der Klone wurden durch stetigen Einsatz entsprechender Mengen Antibiotika (100  $\mu$ g/ml Ampicillin, 30  $\mu$ g/ml Kanamycin, 34  $\mu$ g/ml Chloramphenicol) in LB-(Luria/Miller *broth*)-Kultivierungsmedium oder auf Luria/Miller *broth*-Agarplatten gewährleistet. Zur Antibiotikaresistenz siehe auch Tab. 22.

#### 4.3.5 Herstellung elektrokompenter Zellen

Die original *E. coli*-Stämme von XL1-blue und Rosetta(DE3) wurden ohne Antibiotika, BL21(DE3)pLysS mit Zusatz von Chloramphenicol kultiviert. Nach Animpfen eines 500 mL LB-Ansatzes im Erlenmeyer-Schüttelkolben mit einer entsprechender ÜN-Kultur und anschließender Inkubation bei 37°C bis zu einer OD<sub>600nm</sub> von 0,6, wurden die Zellen zunächst für 30 min auf Eis heruntergekühlt und anschließend pelletiert. Zentrifugationsschritte erfolgten bei 5000g für 10 min bei 4°C. Das Zellpellet wurde zunächst mit 500 mL H<sub>2</sub>O, dann mit 250 mL H<sub>2</sub>O gewaschen, bevor es mit 10 mL 10%iger Glycerinlsg. äquilibriert und letztlich in 1 mL 10%iger Glycerinlsg. aufgenommen und resuspendiert wurde. Es wurden 40  $\mu$ L Aliquots hergestellt, welche in N<sub>2</sub> (l) schockgefroren und bei -80°C gelagert wurden.

#### 4.3.6 Klonierung

Die bei der Klonierung genutzten Techniken wie PCR (Polymerasekettenreaktion), Hydrolytische DNA-Spaltung durch Restriktionsendonukleasen, Ligation von DNA-Fragmenten werden in diesem Abschnitt zusammenfassend behandelt.

Bei der Klonierung wurde wie folgt vorgegangen: Nach Isolierung der ImaGenes-cDNA-Klone aus einer ÜN-Kultur (GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit, Fermentas) wurden die Gensequenzen mittels designer Oligonukleotidprimer per PCR entsprechend mit Restriktionsschnittstellen versehen und amplifiziert. Tab. 22 bietet hierbei einen Überblick über den Ursprung des Gens, den Zielvektor, Oligonukleotidprimer und die verwendete Schnittstellen. Mit letztgenannten gibt sie auch Aufschluss über die eingesetzten Restriktionsenzyme für den anschließenden Restriktionsverdau von amplifizierten Genen und Plasmiden. Der Vollständigkeit halber werden alle verwendeten Plasmide in Tab. 22 aufgeführt.

Gen	Organismus	c-DNA-Clone (Reststanz)	Vektor (Resistenz)	Schnitt- stellen	Vorwärtsprimer (5' zu 3')	Rückwärtsprimer (5' zu 3')	Gen- konstrukt
<b>PP1α</b>	Mus musculus	IRAVp968B1150D <sup>+</sup> (Amp)	pET23b(+) (Amp)	NdeI/XhoI	TTT CAT ATG TCC GAC AGC GAG AAG CTC	AAA CTC GAG TTT CTT GGC TTT GGC AGA ATT G	His-PP1α
<b>WDR5</b>	Mus musculus	MGC clone 1025 (Amp)	PMCGS7 (Amp)	-	-	-	His-TEV- WDR5*
<b>HAT</b>	Mus musculus	IRAVp968H0895D <sup>+</sup> (Amp)	pET23b(+) (Amp)	NdeI/XhoI	TTT CAT ATG GCG GCC TTG GAG AAA TTT C	AAA CTC GAG CTC TTG AGC AAG TCG CTC AAT G	HAT1-His
<b>RBBP7</b>	Mus musculus	IRAVp968H039D <sup>+</sup>	pET42b(+) (Amp)	SacII/AvrII	TTT CCG CGG AAA ACC TGT ATT TTC AGT CTG CGA GTA AAG AGA TGT TTG AAG	AAA CCT AGG TTA AGA TCC TTG CCC CTC CAG	GST-TEV- RBBP7
<b>FHL3</b>	Mus musculus	IRCKp5014M117Q <sup>+</sup> (Kan)	pET42b(+) (Kan)	SacII/AvrII	TTT CCG CGG AAA ACC TGT ATT TTC AGT CTA GCG AGG CAT TTG ACT GTG	AAA CCT AGG TCA GGG GCC TGC TTG GC	GST-TEV- FHL3
<b>GST</b>	-	- (Kan)	pET42b(+) (Kan)	NdeI/AvrII	TTT CAT ATG TCC CCT ATA CTA GG	AAA CCT AGG TGT GAT GGT GAT GGT GAT G	GST-His
<b>HSC70</b>	Homo sapiens	-	PCA528 (Kan)	-	-	-	His-SUMO- HSC70**
<b>APG2</b>	Homo sapiens	-	pCA528 (Kan)	-	-	-	His-SUMO- APG2**
<b>ULP1</b>	Saccharomyces cerevisiae	-	pCA535 (Kan)	-	-	-	ULP1-His**
<b>TEV</b>	Tobacco etch virus	-	pET23b(+) (Amp)	-	-	-	His-TEV***

<sup>+</sup> bezogen von ImGenes (jetzt Teil von *Source BioScience LifeSciences*)

\* Geschenk von Prof. Dr. M.S. Cosgrove

\*\* Geschenk von Prof. B. Bukau

\*\*\* Geschenk von Dr. M. Beyermann

Tab. 22: Allgemeine Klonierungs-Übersicht

Die im folgendem aufgeführte Zusammensetzung der PCR-Reaktionsansätze durchliefen folgende Thermozyklen (Abb. 77), wobei die Primerhybridisierungstemperatur entsprechend der Oligonukleotidsequenz angepasst wurde.

PCR-Reaktionansatz		Zyklusprogrammierung	
2,5 µl	10xPfu-Puffer + MgSO <sub>4</sub>	1x	94°C, 2min (Einzelstrangbildung)
2,5 µl	dNTPs (2 mM)	7x	94°C, 30s (Denaturierung) 56-58°C, 30s (Primerhybridisierung 1) 72°C, 3min (Elongation)
1 µl	Vorwärtsprimer (10 µM)		
1 µl	Rückwärtsprimer (10 µM)		
1 µl	Templat-DNA (100-500 pg)	19x	94°C, 30s (Denaturierung) 61-63°C, 30s (Primerhybridisierung 2) 72°C, 3min (Elongation)
0,5 µl	Pfu-Polymerase	1x	72°C, 7 min (vollständige Elongation) 10°C, ∞ (Lagerung)
<u>16,5 µl</u>	H <sub>2</sub> O		
25 µl	Gesamtvolumen		

Abb. 77: Allgemeiner PCR-Reaktionsansatz (links) und PCR-Thermozyklenübersicht (rechts)

Der PCR-Ansatz wurde nach vollständigem Zyklendurchlauf durch Auftragung einer Probe im ETBr-1%-Agarose kontrolliert und die DNA aus den Ansatz anschließend isoliert (GeneJET™ PCR Purification Kit, Fermentas).

Die Ligation des amplifizierten PCR-Produkts in den Zielvektor erfolgte teilweise über Zwischenklonierung in den pJET1.2/blunt Vektor (CloneJET™ PCR Cloning Kit, Fermentas), in den die DNA direkt nach der PCR mittels T4-Ligase per *Blunt-end*-Klonierung für eine Stunde bei 16°C ligiert wurde. Nach Elektrotransformation des entsprechenden pJET1.2-Genkonstrukts in *E. coli* (XL1-blue) wurde dieses in einer ÜN-Kultur, komplementiert mit Amp, bei 37°C vervielfältigt. Das Plasmid wurde isoliert (GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit, Fermentas) und ebenso wie der Zielvektor mit den entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut (Abb. 78 links). Je nach Komplementarität, die Enzymaktivität betreffend, wurden die beiden Restriktionsenzyme 1:1 oder 1:2 im passenden Puffersystem (1x Puffer: Tango bzw. Orange, Fermentas)<sup>7</sup> eingesetzt. Zu einem Teil konnte die Zwischenklonierung umgangen werden und die zum Vektor bindungskompatiblen Restriktionsschnittstellen direkt im PCR-Produkt durch Inkubation mit Restriktionsenzymen freigelegt werden. Generell wurde das Restriktionsprodukt des Gens (= Insert) und der geschnittene Zielvektor auf einem ETBr-1%-Agarosegel separiert und anschließend aus dem Gel extrahiert (GeneJET™ Gel Extractions Kit, Fermentas). Die Ligation von Insert und Expressionsplasmid erfolgte per T4-Ligasereaktion (Abb. 78 rechts). Bei den Ligationsansätzen betrug das molare Verhältnis Vektor : Insert jeweils 1:4. Die Menge an Insert-DNA wurde, wie folgt berechnet:

$$\frac{\text{ng}_{\text{Vektor}} \times \text{kb}_{\text{Insert}}}{\text{kb}_{\text{Vektor}} \times \frac{1}{4}} = \text{ng}_{\text{Insert}}$$

<sup>7</sup> siehe hierzu auch <http://www.fermentas.com/en/tools/doubledigest>

Der Einsatz an Vektor-DNA betrug zwischen 50-100 ng.

Restriktionsansatz (5 Std-ÜN, 37°C)		Ligationsansatz (16°C, ÜN)	
4 µl	10x Puffer (Orange bzw. Tango)	2 µl	10x T4-Ligasepuffer
1 µl	DNA ( 1-2 µg/µL)	x µl	Insert ( 4 Anteile)
1-2 µl	Restriktionsenzym 1	y µl	Vektor (1 Anteil)
1-2 µl	Restriktionsenzym 2	<u>0,5 µl</u>	T4-Ligase
<u>y µl</u>	H <sub>2</sub> O	20 µl	Gesamtvolumen
40 µl	Gesamtvolumen		

Abb. 78: Allgemeiner Restriktionsansatz (links) und Ligationsansatz (rechts)

Nach Elektrotransformation (siehe Absatz 4.3.7) in den *E. coli*-Stamm XL21-blue wurde das Plasmid mittels einer ÜN-Kultur (37°C) vervielfältigt und in die *E. coli*- Expressionssysteme BL21 (DE3) pLysS oder, falls die Codonverteilung des Genes es erforderte, in Rosetta(DE3), transformiert (siehe auch Tab. 23). Die Aufbewahrung der Plasmid-haltigen *E. coli*-Stämme erfolgte durch Erzeugung von Glycerolstocks (ÜN-Kultur/H<sub>2</sub>O/Glycerol; 2:1:1), die bei -80°C gelagert wurden.

### 4.3.7 Elektrotransformation

Es wurden jeweils 0,7 µL Ligationsansatz bzw. 1-10 ng Plasmid zusammen mit 40 µL elektrokompetenter Zellen in eine auf Eis vorgekühlte 1 oder 2 mm Elektroküvette transferiert. Nach Elektrotransformation bei 1800 V (1 mm Küvette) bzw. 2500 V (2 mm Küvette) wurde umgehend 1 mL LB-Medium (37°C) zugegeben und die Zellsuspension für eine Std. bei 37°C inkubiert. Nach einem kurzen Zentrifugationsschritt wurde der größte Teil des Überstand abgenommen und das Zellpellet anschließend im Mediumrest (ca. 30 µL) resuspendiert. Die gesamte Zellsuspension wurde auf einer LB-Agar-Selektionsplatte, komplementiert mit entsprechendem Antibiotikum, ausplattiert. Die Klonkolonien entstanden nach Inkubation bei 37°C, über Nacht.

## 4.4 Proteinbiochemische Methoden

### 4.4.1 Proteinexpression

Die Expression von Proteinen und Fusionsproteinen in *E. coli* erfolgte durch Animpfen einer 10 mL-ÜN-Kultur mit dem entsprechenden Klon und deren anschließende Überführung in einen 700 mL LB-Medium-Ansatz in 2 L-Kulturkolben. Es wurden standardmäßig zwei oder bei schlecht exprimierenden Proteinen (GST-RBBP7) vier Expressionskulturen eines Klons angesetzt und bei 37°C bis zu einer OD<sub>600nm</sub> von 0,5 bzw. 0,6 bei 240 rpm geschüttelt. Die Kulturen wurden anschließend, wenn die Expressionstemperatur niedriger als 37°C gewählt wurde, zunächst auf Eis herunter gekühlt. Die

Induktion der Genexpression erfolgte durch Zugabe einer 1-molaren IPTG-Stammlösung bis zur Endkonzentration von 0,5 oder 1 mM. Die Expression erfolgte abhängig vom Protein für vier Std. bei 30°C bzw. 37°C oder ÜN bei 20°C (siehe Tab. 23).

Genkonstrukt	Expressionsstamm ( <i>E. coli</i> )	Expressionsbedingungen	Protein (Konstruktnamen)	Protease	Protein nach Proteolyse
His-PP1 $\alpha$	BL21 (DE3) pLysS	OD: 0,6 1mM IPTG 1 mM MnCl <sub>2</sub> 20°C, ÜN	PP1 $\alpha$	-	-
His-TEV-WDR5*	BL21 (DE3) Rosetta	OD: 0,5 1 mM IPTG 20°C, ÜN	WDR5	-	-
HAT1-His	BL21 (DE3) pLysS	OD: 0,6 1 mM IPTG 20°C, ÜN	HAT1	-	-
GST-TEV-RBBP7	BL21 (DE3) Rosetta	OD: 0,6 1 mM IPTG 20°C, ÜN	GST-RBBP7	TEV	RBBP7
GST-TEV-FHL3	BL21 (DE3) pLysS	OD: 0,6 1 mM IPTG 20°C, ÜN	GST-FHL3	TEV	FHL3
GST-His	BL21 (DE3) pLysS	OD: 0,6 1 mM IPTG 20°C, ÜN	GST	-	-
His-SUMO-HSC70**	BL21 (DE3) Rosetta	OD: 0,6 0,5 mM IPTG 30°C, 4 Std.	His-SUMO-HSC70	ULP1	HSC70
His-SUMO-APG2**	BL21 (DE3) Rosetta	OD: 0,6 0,5 mM IPTG 37°C, 4 Std.	His-SUMO-APG2	ULP1	APG2
ULP1-His**	BL21 (DE3) Rosetta	OD: 0,6 0,5 mM IPTG 30°C, 4 Std.	ULP1-His	-	-
His-TEV***	BL21 (DE3) pLysS	OD: 0,6; 1 mM IPTG 20°C, ÜN	His-TEV	-	-

Tab. 23: Übersichtstabelle zur Proteinexpression und Tag-Abspaltung

#### 4.4.2 Aufreinigung von Proteinen

Die Zellen wurden bei 5000g für 10 min bei 4°C sedimentiert, der Überstand entfernt und die Zellen in Affinitätssystem-abhängigen eiskalten Puffern resuspendiert, wobei für die Aufreinigung von Poly-His-markierten Proteinen 50 mM TrisHCl, 300 mM NaCl, 12,5 mM Imidazol, 0,5 mM PMSF, pH: 8 und bei GST-markierten Proteinen 50 mM TrisHCl, 140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 0,5 mM PMSF/EDTA, pH: 7,3 als Lyse und Waschpuffer verwendet wurde. Geringe Mengen an Imidazol (12,5 mM) im Lyse- bzw. Waschpuffer bei der Aufreinigung Poly-His-getaggtter Proteine dienen der Reduzierung von

unspezifisch bindenden Proteinen und erhöhten somit deutlich die Aufreinigungseffizienz. Wenn die Zellyse nicht umgehend erfolgte, wurde die Zellsuspension bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert. PMSF und EDTA wurden den Puffern erst kurz vor der Lyse zugeführt. Die Zellen wurden am Homogenisator oder an der *French press* unter Druck (1000-1500 bar) aufgeschlossen und das Lysat durch Zentrifugation bei 15.000g für 45 min bei  $4^{\circ}\text{C}$  vom Pellet getrennt. Die Schritte der Proteinisolation fanden alle bei  $8^{\circ}\text{C}$  statt. Das jeweilige Affinitätsmaterial (0,5-1 mL Suspension) wurde mit Wasser gewaschen und mit Lysepuffer äquilibriert, bevor es mit dem Zellyseüberstand unter Rotation für 2-3 Std. inkubiert wurde (*Batch-Verfahren*). Danach wurde der Überstand durch einen Filter entfernt und das Protein-beladene Matrixmaterial mit 50-70 mL Waschpuffer gewaschen, um unspezifisch gebundene Proteine zu entfernen. Die Elution von der Festphase erfolgte durch fünfmalige Inkubation mit 2 mL Elutionspuffer unter Rotation für je fünf Minuten (Für His-getaggte Proteine: 50 mM TrisHCl, 300 mM NaCl, 250 mM Imidazol pH 8,8; für GST-getaggte Proteine: 50 mM TrisHCl, 10 mM reduziertes Glutathion, pH 8). Die Proteinreinheit der Fraktionen wurde per SDS-PAGE mittels Coomassiefärbung überprüft und die sauberen Fraktionen anschließend kombiniert. Proteine die nicht weiter umgesetzt werden sollten, wurden direkt gegen 1 L Dialysepuffer (50 mM TrisHCl, 100 mM NaCl, pH 7,6 (RT)) bei  $8^{\circ}\text{C}$  für einige Stunden bzw.  $\infty$  dialysiert, und der Dialysepuffer wurde währenddessen dreimal erneuert. Mit His-SUMO-HSC70 und His-SUMO-APG wurde ebenso verfahren um das Imidazol zu entfernen. Der MWCO (*molecular weight cut off*) der Dialysemembran wurde der Proteingröße angepasst, indem ein Verhältnis von 1/4 zum Molekulargewicht des Zielproteins eingehalten wurde. Die Proteine wurden ggf. in Zentrifugalkonzentratoren (Amicon Ultra, Millipore, Ireland oder Vivaspin 20, satorius stedim biotech, Göttingen) mit MWCO 10.000 (Proteine  $> 40$  kDa) oder MWCO: 5.000 (Proteine  $< 40$  kDa) aufkonzentriert. Bevor die Proteinlösungen aliquotiert und eingefroren wurden, wurde sie mit 20% Glycerol komplementierten und die Proteinkonzentration spektrometrisch mittels Nano-Drop bestimmt. Der Tab. 24 kann man das jeweilige Molekulargewicht und den zur Proteinkonzentrationsbestimmung verwendeten Extinktionskoeffizienten entnehmen.

Protein	PP1 $\alpha$	WDR5	HAT1	RBBP7	GST-FHL3	FHL3	GST	HSC70	APG2
MW [kDa]	38	37	49	48	60	32	26	71	94
$\epsilon$ ( $\cdot 10^4$ ) [ $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ]	38,6	69,6	42,8	90,2	79,1	36,6	41,2	31,1	54,0

Tab. 24: Übersicht der Molekulargewichte und der Extinktionskoeffizienten ( $\epsilon$ ) der rekombinanten Proteine

#### 4.4.3 Abspaltung von GST & SUMO von Fusionsproteinen

Für die Abspaltung des GST von den Fusionsproteinen GST-RBBP7, GST-FHL3 konnten die kombinierten Elutionsfraktionen direkt in 50 mM TrisHCl, 10 mM Glutathion, pH: 8 ( $8^{\circ}\text{C}$ ) mit TEV-Protease umgesetzt werden. Dafür wurde die Proteinlösung ggf. zunächst auf ein Volumen von 0,5-2 mL aufkonzentriert und anschließend mit 10-20  $\mu\text{L}$  TEV (1,6 mg/ml) in Anwesenheit von 1 mM DTT und 0,5 mM EDTA umgesetzt. Die Reaktionslösung konnte nach 1-2 Std. Inkubation bei  $8^{\circ}\text{C}$  unter Rotation in einen Dialyseschlauch (MWCO: 6.000-8.000) überführt werden, um über Nacht bei  $8^{\circ}\text{C}$

gegen 1L Dialysepuffer (50 mM TrisHCl, 100mM NaCl, pH 7,6 (RT)) dialysiert zu werden. Diese Vorgehensweise hatte den Vorteil, dass unter vollständiger Reaktionsumsetzung das Glutathion bereits per Dialyse entfernt werden konnte. Anschließend wurde der Spaltungsansatz mit 100  $\mu$ L Glutathion-Sepharose-Suspension 4B (GE Healthcare, München) und 10  $\mu$ L Ni-NTA-Agarose-Suspension (Qiagen GmbH, Hilden) für 1 Std. bei 8°C inkubiert, um His-TEV und GST abzutrennen. Die His-SUMO-Bestandteile der Fusionsproteine His-SUMO-HSC70 und His-SUMO-APG2 wurden durch Reaktion mit ULP1 proteolytisch abgespalten indem die gesamte Proteinlösung (8 mL) mit 20  $\mu$ L ULP1 (1,6 mg/ml) ÜN bei 8°C umgesetzt wurde. Aus dem Grund heraus, dass ULP1 bei der Aufreinigung aus *E. coli* für einen umfassenden Proteolyseschutz mit PMSF versetzt worden war (was zu einer reversiblen Inaktivierung der Cysteinprotease führte) war es notwendig dem Ansatz 1 mM DTT zuzufügen, um die Protease somit zu reaktivieren. Die His-getaggten Proteine ULP1 und SUMO konnten durch einstündige Inkubation mit 100  $\mu$ L Ni-NTA-Agarose aus der Proteinlösung entfernt werden. Generell wurde bei beiden Reinigungsansätzen der Überstand anschließend von der Matrix abgenommen und die Festphase zwei Mal mit 500  $\mu$ L Puffer gewaschen. Die Proteinreinheit dieser Fraktionen wurde per SDS-PAGE überprüft und die reinen Fraktionen anschließend vereint und ggf. per Zentrifugalkonzentratoren aufkonzentriert. Für die Lagerung bei -20°C wurden den Proteinlösungen 20% Glycerol zugefügt.

#### 4.4.4 Enzym-basierte Assays

##### 4.4.4.1 Charakterisierung von PP1 $\alpha$ -Phosphatase

Für die Bestimmung der Anfangsgeschwindigkeit der Dephosphorylierung von *para*-Nitrophenylphosphat (pNPP) wurden verschiedene pNPP-Substratkonzentrationen (1, 10, 25, 35 und 50 mM) in Reaktionspuffer (50 mM HEPES, 100 mM NaCl, 2 mM DDT, 0,025% Tween-20, 1 mM MnCl<sub>2</sub>) mit 1,32  $\mu$ M PP1 $\alpha$  im 300  $\mu$ L-Maßstab bei 30°C umgesetzt. Die Reaktion wurde zu sechs verschiedenen Zeiten in Konzentrations-abhängigen Intervallen gemessen, welche Tab. 25 entnommen werden können.

pNPP-Konzentration [mM]	Messintervalle [min]						
1	0	8	15	30	62	90	
10	0	5	10	20	30	45	
25	0	3	8	13	18	25	
35	0	1	2	3	4	6	
50	0	0,5	1	1,5	2	2,5	

Tab. 25: Übersicht der pNPP-Ausgangskonzentrationen und der Messintervalle

Die Reaktionen wurden gestoppt, indem 50  $\mu$ L aus dem Reaktionsansatz abgenommen und diese in 950  $\mu$ L 1 M NaOH überführt wurden. Anschließend wurde die Absorption bei 405 nm bestimmt, was dem Absorptionsmaximum von pNP entsprach. Die Umsetzung konnte mithilfe des

Extinktionskoeffizienten ( $\epsilon$ ) von pNP ( $18700 \text{ [M}^{-1} \text{ cm}^{-1}]$ ) nach dem Lambert Beerschen Gesetz ermittelt werden:

$$\text{pNP [M]} = \frac{A_{405\text{nm}}}{\epsilon (\text{pNP}) [\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}] \cdot d [\text{cm}]} \cdot \text{VF}$$

Durch die Zugabe von  $950 \mu\text{L}$   $1\text{M}$  NaOH ergab sich ein zu berücksichtigender Verdünnungsfaktor (VF) von 20. Der Blindwert wurde vor Zugabe des Enzym bestimmt. Die Messergebnisse sind Abb. 29 zu entnehmen.

Um die Phosphataseaktivität an H3tailpS10 durch PP1 $\alpha$  nachzuweisen wurde das EnzChek®Phosphate Assay Kit von Molecular Probes (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) genutzt. Die verwendete Kalibriergerade wurde nach der Angabe im Assay Kit-Protokoll angefertigt und kann Abb. 79 entnommen werden.

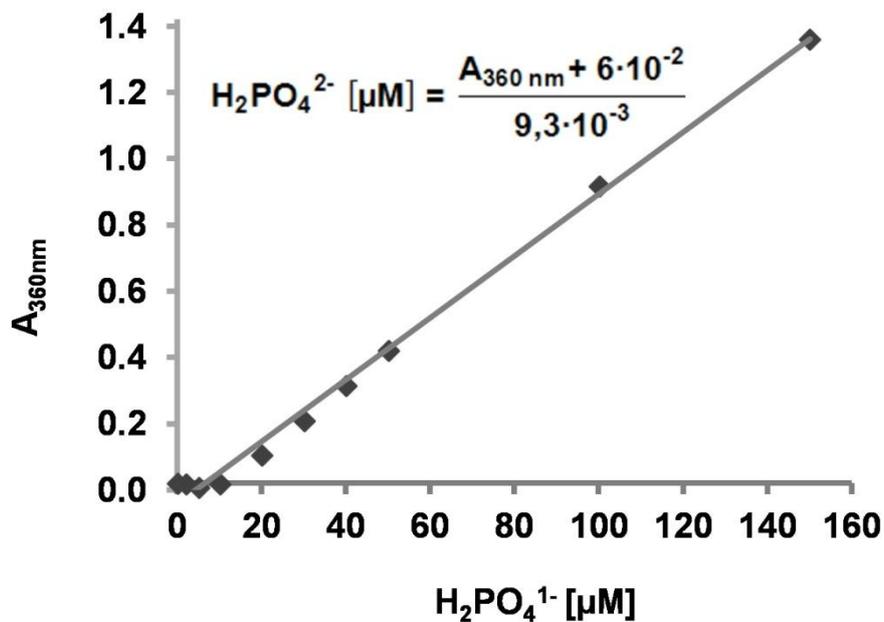


Abb. 79: EnzChek-Phosphat-Assay-Kalibriergerade und Formel zur Phosphatkonzentrationsbestimmung

Die Reaktion wurde wie im Assay Kit-Protokoll angegeben, allerdings im  $100 \mu\text{L}$ -Maßstab und unter Verwendung der doppelten Menge an Purine-Nukleosid-Phosphorylase (PNP), durchgeführt. Mit der zuletzt genannten Bedingung sollte gewährleistet werden, dass die Reaktion PP1 $\alpha$ -kontrolliert abläuft und demgemäß PP1 $\alpha$  das geschwindigkeitsbestimmende Enzym darstellt. Vor jedem Reaktionsstart, der durch Zugabe von PP1 $\alpha$ -Phosphatase erfolgte, wurde eine Vorinkubationszeit von mind. 10 min bei RT eingehalten. Die Probenansätze, die nicht sofort gemessen wurden, wurden bis kurz vor der Messung auf Eis inkubiert, um den Eigenzerfall des Substrats 2-Amino-6-Mercapto-7-Methylurin-Ribose (MESG) zu minimieren. Als Blindwert diente ein mitlaufender Kontroll-Assay, der ohne Zugabe von PP1 $\alpha$  gemessen wurde. Für die Ermittlung kinetischer Werte wurden Substartkonzentrationen

(H3tailpS10) von 2, 5, 50, 100 und 500  $\mu\text{M}$  im Assay-Ansatz mit einer konstanten Menge an PP1 $\alpha$  (66 nM) bei RT im UV/Vis-Spektrometer für 0-10 min inkubiert. Alle 20 s wurde eine Absorptionsmessung bei 360 nm aufgenommen und anschließend aus den Daten  $v_0$  bestimmt. Dafür wurde für jeden Messwert der jeweilige Zeitpunkt- und Substratkonzentrations-abhängige Blindwert abgezogen. Durch die Absorptionsmessung des bei 360 nm maximal-absorbierenden 2-Amino-6-Mercapto-7-methylpurins und unter der Verwendung der Kalibriergeraden können direkt Rückschlüsse auf die Dephosphorylierung des Substratpeptides H3tailpS10 gemacht werden.

#### 4.4.4.2 HAT1-Aktivitätstest

In je einem 20  $\mu\text{L}$ -Ansatz wurden rekombinantes HAT1 (5  $\mu\text{M}$ ) bzw. yHAT1 mit Acetyl-CoA (30  $\mu\text{M}$ ) und 4  $\mu\text{g}$  Histone aus dem Kälberthymus (Type II-A, Sigma-Aldrich) in 50 mM TrisHCl, 100 mM NaCl, pH: 7,6 für 2 Std., bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Bei den Negativkontrollen wurde auf die Zugabe von Acetyl-CoA verzichtet. Die Reaktionsansätze wurden anschließend auf einem SDS-Gel aufgetragen und die Proteine per Western Blot-Technik auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Zur Detektion von H4K12ac wurde ein entsprechender Antikörper verwendet (siehe Abschnitt 3.3).

#### 4.4.4.3 HAT1-Phosphorylierung durch CDK1-cyclin B-Kinase

Eine 10  $\mu\text{M}$  HAT1-Lösung wurde im (1x)-NEB-Puffer (mitgelieferter CDK1-cyclin B-Kinase Reaktionspuffer, 50 mM TrisHCl, 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1mM EGTA, 2mM DTT, 0,01% Brij 35, pH: 7,5) unter Zugabe von 200  $\mu\text{M}$  ATP und 10 *Units* (U) CDK1-cyclin B-Kinase (1U = Kinasemenge die 1 pmol Phosphat innerhalb von 1 min auf das Substrat PKTPKKAKKL-NH<sub>2</sub> (50mM) in einem Reaktionsvolumen von 30  $\mu\text{L}$  überträgt) für 2 Std. bzw. ÜN bei 30°C inkubiert. Für die MS-Analyse der Reaktion wurde der Ansatz durch SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt, die vermeintliche pHAT1-Bande (49 kDa) herausgeschnitten, die Proben wie in Abschnitt 4.2.3.1 beschrieben aufbereitet und schließlich der MALDI-MS-Messung zugänglich gemacht. Für den Pull-Down wurde die Reaktion in einem 30  $\mu\text{L}$ -Ansatz durchgeführt und dieser anschließend durch Zugabe von 30  $\mu\text{L}$  einer 1 mM Myoglobin-Lösung in Puffer (50 mM TrisHCl, 100 mM NaCl, pH 7,6) auf die Hälfte verdünnt, so dass eine Endkonzentration von 5  $\mu\text{M}$  „pHAT1“ in 500  $\mu\text{M}$  Myoglobin-Lösung erreicht wurde. Diese wurde mit (1x)-Phosphataseinhibitor (Phosphatase Inhibitor Cocktail Set V (50x), Calbiochem, USA) und 0,02% TritonX-100 komplementiert. Jeweils 20  $\mu\text{L}$  davon fanden für einen Pull Down unter den Bedingungen von Abschnitt 4.5.3 Verwendung.

## 4.5 Protein-Pull-Downs

### 4.5.1 Protein-Pull-Downs mit Peptiden

Zunächst wurde die Proteinkonzentrationen jeweiliger 3T3-Mausfibroblasten- oder HeLa-S3-Extrakte (Geschenk von Dr. W. Fischle), insbesondere die der nuklearen 3T3-SILAC-Extrakte einander angeglichen. Bedingt durch die Extraktpräparation wurden im SILAC-Experiment A 900  $\mu\text{L}$  (2 mg/mL) und in SILAC-Experiment B 650  $\mu\text{L}$  (6 mg/mL) pro SILAC-Extrakt (je Leicht, Mittelschwer, Schwer)

eingesetzt. Für Pull-Downs mit ungelabelten Extrakten wurden Konzentrationen von 0,1-1 mg/mL (300  $\mu$ L pro Pull-Down) verwendet. Bei Pull-Downs mit phosphorylierten H3-Tail-Peptidködern wurden die Extrakte zunächst für 1 ½ Std. mit (1x)-Phosphataseinhibitor (Phosphatase Inhibitor Cocktail Set V (50x), Calbiochem, USA) bei RT inkubiert. Das mit Puffer (20 mM HEPES, 20% Glycerol (v/v), 100 mM KCl, pH 7,9) äquilibrierte, Festphasenmaterial wurde pro Pull-Down-Probe mit je 300  $\mu$ L (SILAC: 900 $\mu$ L bzw. 650  $\mu$ L) Extrakt in Anwesenheit von 0,2% Triton-X (v/v) für 1 Std bei RT inkubiert. Die Zuordnung SILAC-Extrakt - Peptidköder wurde wie folgt gewählt: D-H3-Tail Leichtes Extrakt (L),L-H3-Tail Mittelschweres Extrakt (M) und H3Pma-Tail Schweres Extrakt (H). Nach der Inkubation wurde der Überstand entfernt und das Protein-beladene Material fünf- bzw. zehnmal (bei SILAC-Proben nur fünfmal) mit 500  $\mu$ L Pull-Down-Waschpuffer (20 mM HEPES, 300 mM NaCl, 20% Glycerol (v/v), 0,2% Triton X-100 (v/v), pH 7,9) gewaschen. Nach Kombination des Matrixmaterials wurde dieses in 20  $\mu$ L SDS-Probenpuffer, komplementiert mit 100 mM DTT (*Protein Loading Buffer Pack*, Fermentas, St. Leon-Rot), resuspendiert und anschließend für 5 min auf 95°C erhitzt. Die abgekühlte Matrixprobe der SILAC-Pull-Down-Proben wurde zusätzlich filtriert und das Filtrat wurde mit 15 mM Iodacetamid für 30 min bei RT unter Lichtausschluss inkubiert, bevor es wie der Überstand der anderen unacetylierten Proben auf ein Tris-Glycin-Gradienten- bzw. SDS-Gel aufgetragen wurde.

#### 4.5.2 Protein-Pull-Downs mit GST-FHL3

Für die GST-Pull-Downs wurde eine Glutathion-Sepharose 4B Matrixsuspension (GE Healthcare, München, DE) mit einer vom Hersteller angegebenen Bindungskapazität von 5 mg (0,2  $\mu$ mol) GST pro mL Medium, als Trägermaterial für die Proteine verwendet. Bei einer 75%igen Matrixsuspension entsprechen 13,4  $\mu$ L Suspension 10  $\mu$ L Matrix, welche eine maximale Beladung von 2 nmol (50  $\mu$ g) GST bzw. 2 nmol GST-Fusionsprotein ermöglicht. Pro Pull-Down wurden je 13,4  $\mu$ L Matrixsuspension, zunächst drei Mal mit 500  $\mu$ L Pull-Down Puffer (50 mM TrisHCl, 100 mM NaCl, pH 7,6) gewaschen, bevor das Trägermaterial für zwei Std. mit 100  $\mu$ L 20  $\mu$ M GST-FHL3 bzw. 20  $\mu$ M GST bei 8°C inkubiert wurde. Ungebundene Proteinreste wurden durch Waschen mit drei Mal 500  $\mu$ L Pull-Down-Puffer entfernt. Nach Äquilibrierung mit Puffer (20 mM HEPES, 100 mM KCl, 20% Glycerol (v/v), pH 7,9) wurden die Matrix-gebundenen Proteine mit 300  $\mu$ L 3T3-Kernextrakt (Gesamtproteinkonzentration: 4 mg/ml) für eine Std. bei RT in Gegenwart von 0,2 % Triton X-100 (v/v) inkubiert. Dadurch dass bei den SILAC-Experimenten jedes Matrix-gebundenen Protein jeweils mit leichten oder mittelschweren Extrakt inkubiert wurde, ergaben sich zwei unabhängige Experimente. Dasselbe Verfahren wurde auch mit den 3T3-Cytosolextrakten (4 mg/ml) durchgeführt. Nach der Inkubation wurde der Überstand entfernt und das Protein-beladene Material fünfmal mit 500  $\mu$ L Pull-Down-Waschpuffer (20 mM HEPES, 300 mM NaCl, 20% Glycerol, 0,2% Triton X-100 (v/v), pH 7,9) gewaschen. Nach Kombination des Matrixmaterials wurde dieses in 20  $\mu$ L SDS-Probenpuffer, komplementiert mit 100 mM DTT, resuspendiert und anschließend für 5 min auf 95°C erhitzt. Wie bereits im Abschnitt 4.5.1 beschrieben wurden die SILAC-Matrixproben zusätzlich mit Iodacetamid behandelt, bevor die Proteine per SDS-PAGE separiert wurden.

### 4.5.3 Pull-Downs rekombinanter Proteine mit Peptiden

Vor der Inkubation mit Proteinlösung wurden die Peptid-beladenen Matrixaliquots (20 µL) dreimal mit 500 µL Pull-Down-Puffer (50 mM TrisHCl, 100 mM NaCl, pH: 7,6) gewaschen und anschließend bei RT mit 20 µL 500 µM BSA oder Myoglobin in Pull-Down-Puffer unter Schütteln vorinkubiert. BSA und Myoglobin dienen vor und während des Pull-Downs als unspezifische Binder, werden im großen Überschuss eingesetzt und tragen damit maßgeblich zur Affinitätsspezifität der Zielproteine bei. Nach 30 min wurde der Überstand abgenommen. Das Matrixmaterial wurde anschließend 1 Std. bei RT mit 20 µL Proteinmischung unter Schütteln inkubiert, wobei die Zielproteine Konzentration von 5 µM in einer Lösung von 500 µM BSA bzw. Myoglobin, gelöst in Pull-Down-Puffer, aufwiesen. Nach Entfernung des Überstandes wurde die Festphase fünf- bzw. zehnmal mit 500 µL Pull-Down-Waschpuffer (20 mM HEPES, 300 mM KCl, 20% Glycerol (v/v), 0,2 % Triton X-100 (v/v), pH: 7,9) gewaschen. Die flüssige Phase wurde nach dem letzten Waschschrift vollständig entfernt, 20 µL Probenpuffer zur Festphase gegeben, für 5-10 min bei 95°C erhitzt und der Überstand auf ein SDS-Gel aufgetragen.

## 4.6 Zellbiologische Methoden

Bei der Zellkultivierung wurden die üblichen Vorgehensweisen zu Arbeiten an der Sterilbank befolgt. Alle verwendeten Verbrauchsmaterialien und eingesetzte Lösungen wurden steril bezogen oder wurden durch Autoklavieren bei 120°C bei 2 bar für 15 min oder durch Sterilfiltration (MILLIPORE Express® PLUS (PES)-Membran 0,22 µm) entsprechend hergestellt.

### 4.6.1 Zellkultur

Bei der verwendeten Zelllinie handelt es sich um Fibroblasten aus der Maus (3T3's) welche von der Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig erworben wurden (DSMZ-Nr. ACC 173). Diese Standardzelllinie wurde ursprünglich aus primären „Schweizer Albino“ Mäuseembryonen isoliert.<sup>[248]</sup> Sie besteht aus in Einzelschicht wachsenden, adhären Zellen mit Kontaktinhibition. Die Zellen wurden in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM GlutaMAX™) mit 10%igen Anteil an fetalen Kälberserum (FBS, Invitrogen) in Oberflächen-behandelten Zellkulturflaschen (Greiner bio-one, Frickenhausen) kultiviert. Die Verdopplungszeit der Zellen im Brutschrank in befeuchteter Atmosphäre betrug ungefähr zwei Tage bei 37°C und einem CO<sub>2</sub>-Anteil von 5%. Die Zellen wurden alle zwei bis drei Tage durch 2-3 minütige Inkubation mit 0,05% Trypsin + 0,2g/L EDTA-4Na passagiert. Dafür wurde zuvor das Nährmedium entfernt und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Die Trypsinaktivität wurde durch Zugabe von frischem DMEM (10% FBS) gestoppt. Von der Originalkultur wurden nach mehreren Passagen 1 ml-Stocks (1×10<sup>6</sup> Zellen/ml) angefertigt, indem die pelletierten Zellen in DMEM, FBS, DMSO (8:2:1) suspendiert und mit einer Abkühlrate von 1°C/min mittels einer „Mr. Frosty“-Cryobox (Nalgene, Thermo Scientific GmbH, Schwerte), bis -80°C eingefroren wurden. Die Langzeitlagerung der Aliquots in Kryoröhrchen erfolgte in N<sub>2</sub> (l). Für die Zellernte wurden ca. 15-20×10<sup>6</sup> Zellen aus den Zellkulturflaschen in 15 Gewebekulturschalen (145x20

mm, Th. Geyer, Renningen) umgesetzt und diese vier Tage kultiviert. Die Ernte und Präparation der Zellextrakte erfolgte wie im entsprechenden Abschnitt (4.6.3) beschrieben.

#### 4.6.2 SILAC Zellkultur

Für die Herstellung Isotopen-markierter nuklearer und cytosolischer Extrakte wurden die Zellen in SILAC-DMEM (SILAC Protein Quantifizierungs-Kit, Thermo Scientific) kultiviert. Die in diesem Medium fehlenden Aminosäuren Arginin und Lysin wurden wie folgt separat hinzugefügt: Für das leichte Medium wurden 0,13 g/L L-Lys-2HCl und 0,08 g/L L-Arg-HCl (Thermo Scientific GmbH), für das mittelschwere 0,13 g/L D4-L-Lys-2HCl (Silantes, München, Deutschland) und 0,08 g/L  $^{13}\text{C}_6$ -L-Arg-HCl (Cambridge Isotope Laboratories, Andover, MA) und für das schwere Medium 0,10 g/L  $^{13}\text{C}_6$ ,  $^{15}\text{N}_2$ -L-Lys-NH<sub>3</sub> (Silantes) und 0,08 g/L  $^{13}\text{C}_6$ ,  $^{15}\text{N}_4$ -L-Arg-HCl (Cambridge Isotope Laboratories) verwendet. Zu Beginn wurden pro SILAC-Medium  $0,5 \times 10^6$  Zellen aus unmarkierten DME-Medium in das SILAC-Medium umgesetzt. Die Kultivierung erfolgte in Gegenwart von 10% dialysierten FBS für fünf Tage, erst in 75 cm<sup>2</sup>- dann in 175 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen. Anschließend wurden die Zellen auf 15 Gewebekulturschalen ausgesät und diese für vier weitere Tage in den Inkubator überführt.

#### 4.6.3 Präparation von cytosolischen und nuklearen Zellextrakten

Die 3T3-Zellen wurden unter der Sterilbank geerntet, mit eiskalten Puffern behandelt und die entstehenden Suspensionen und Lösungen auf Eis gelagert. Alle Schritte während der Zellextraktherstellung wurden bei 0-4°C durchgeführt, Zentrifugen wurden entsprechend vorgekühlt. 4-(2-Aminoethyl)-benzensulfonylfluorid (AEBSF) und DTT wurden den Puffern erst kurz vor Anwendung zugefügt. Die Präparation erfolgte nach den Vorgaben des gängigen Dignam et al. Protokolls<sup>[149]</sup> und wird im folgendem Text ausführlich beschrieben. Zu Beginn wurde das Medium von den Kulturschalen entfernt, eiskaltes PBS zugegeben und mittels eines Zellschabers, die Zellen von der Schalenoberfläche gelöst und in Suspension gebracht. Die Zellpelletierung der in PBS suspendierten und kombinierten Zellen erfolgte bei durch Zentrifugation bei 1000 g für 10 min. Die Menge an Zellen betrug zum Erntezeitpunkt ca.  $8-12 \times 10^6$  Zellen pro Schale, was eine Gesamtausbeute an 1-2 ml Zellpellet (ca.  $1-2 \times 10^8$  Zellen) ergab. Das Pellet wurde zunächst in 5 Vol. PBS gewaschen, für 10 min bei 1000g zentrifugiert, danach in 5 Vol. Lysepuffer (10 mM HEPES 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM KCl, 0,5 mM DTT, 0,5 mM AEBSF, pH 7,9) suspendiert und für 10 min auf Eis stehen gelassen. Anschließend wurde erneut bei 1000g für 10 min zentrifugiert und das Pellet anschließend in 2 Vol. Lysepuffer aufgenommen. Die Zellyse erfolgte in einen 7 ml-Glas-Douncer (Wheaton U.S.A.) durch 10 Stöße mit dem engen („tight“) Glasstößel. Nach 10 min bei 1000 g wurde der Überstand abgenommen und das nukleare Pellet für 20 min bei 25.000 g vom Rest des Überstandes getrennt. Dieser wurde mit dem vorherigen Überstand kombiniert, mit 0,11 Vol. 300 mM HEPES, 1,4 M KCl, 30 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7,9 komplementiert und für 1 Std. bei 100.000 g zentrifugiert. In der Zwischenzeit wurde das nukleare Pellet durch 10 Stöße mit dem engen Stößel im Douncer lysiert, wobei 1ml Kernlysepuffer (20 mM HEPES, 25% Glycerol (v/v), 0,42 M NaCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5 mM AEBSF, 0,5 mM DTT, pH 7,9) pro  $10^8$  Zellen eingesetzt wurde. Die Suspension wurde für eine halbe Stunde auf Eis gerührt, bevor sie für 30 min bei 25.000 g zentrifugiert wurde. Der resultierende Überstand des Kernextraktes wurde

über Nacht gegen 50 Vol. Lagerpuffer (20 mM HEPES, 20% Glycerol (v/v), 100 mM KCl, 0,5 mM DTT, 0,5 mM AEBSF, pH 7,9) mittels einer Dialysemembran (MWCO: 3.500) dialysiert. Der Überstand des Cytosolextraktes wurde hingegen gegen 20 Vol. Lagerpuffer dialysiert. Nach einem Zentrifugationsschritt bei 25.000 g für 30 min wurde klares nukleares Extrakt erhalten. Die entstandenen Extrakte wurden aliquotiert, in N<sub>2</sub> (l) schockgefroren und bei -80°C bis zum Einsatz aufbewahrt.



## 5 AUSBLICK

Mit dem Triple-SILAC-Experimente (Projekt 1) sind zwei neue Konzepte in die Proteomforschung eingeflossen. Zum einen wurde ein Phosphonat (Phosphonomethylenalanin, Pma) erfolgreich als H3-Serin-10-Mimetikum für die Isolation und Identifizierung von diversen 14-3-3-Isoformen eingesetzt. Im Gegensatz zu Phosphoserin-bindenden Proteinen konnten jedoch keine Protein-Phosphatasen mit dem H3tailPma-Peptid aus Zellkernextrakten isoliert werden. In diesem Zusammenhang könnte für zukünftige Experimente anstelle von Pma das fluorierte Phosphonodifluoromethylenalanin (Pfa) getestet werden, da dieses mit einem  $pK_{a2}$ -Wert von 5,1 wesentlich dichter an dem des natürlichen pSer (5,7) liegt. Demgegenüber verfügt Pma über eine  $pK_{a2}$ -Wert von 7,1. Allerdings ist generell nicht auszuschließen, dass einige Proteine nicht nur über den peptidischen Tail der Histone binden, sondern eine zusätzliche Interaktion mit der globulären H3-Histondomäne oder mit einem anderen Histon des Nucleosoms eingehen und dies ausschlagende Wirkung auf die Bindungsaffinität haben könnte. Solche Wechselwirkungen könnten besonders für die Interaktion mit den regulatorischen Untereinheiten der Protein-Phosphatasen wichtig sein. In diesem Zusammenhang könnten in anknüpfenden Experimenten die Chancen erhöht werden H3-Tail-spezifische Phosphatase-Komplexe oder andere spezifische phosphorylierungs-abhängige H3-Tail-Binder zu finden, indem man eine Nucleosom-basierten Köder verwendet. Unter Anwendung von semisynthetischen Methoden wäre es möglich ein solches Pfa-modifiziertes H3-Histonkonstruktion herzustellen. Durch anschließende Kombination mit den restlichen rekombinant hergestellten Histonen, könnte außerdem ein künstliches Nucleosom mit inkorporierten Pfa-modifizierten H3-Protein generiert werden. Eine Möglichkeit ein solches Nucleosom als Pull-Down-Köder einzusetzen wäre über eine Immobilisierung mittels biotinylierter DNA an eine Avidin/Streptavidin-Agarose-Festphase denkbar. Des Weiteren bietet sich unter dem erwähnten Verfahren ebenfalls an, alle Serin- und Threonin-Phosphorylierungsstellen der Histone genauer und unter proteomanalytischen Gesichtspunkten zu untersuchen.

Das zweite Konzept bestand in differenziellen Pull-Down Experimenten mit H3-Peptidködern, bestehend aus D- oder L-Aminosäuren. Im direkten Vergleich war es dadurch möglich zwischen rein elektrostatischen Wechselwirkungen und spezifischen Bindungen zu differenzieren. Dieses Konzept sollte generell auf viele Proteomanalysen anwendbar sein. Bei den hier durchgeführten Experimenten erlaubte dieser Ansatz die Identifikation vieler spezifischer Bindeproteine des N-terminalen Tails von Histon H3. Von denen wurden einige weitergehend untersucht. Besonders interessant war in diesem Zusammenhang die Entdeckung der phosphorylierungs-abhängigen Binding von HAT1 an H3.

Weiterführende Forschungsinvestitionen legen nahe, dass es sich bei der HAT1-H3-Interaktion um eine indirekte Wechselwirkung handelt. Allgemein sind diese Entdeckungen konform mit neueren Beobachtungen, die HAT1 als subzellulär lokalisiertes Zellkernprotein dokumentieren.<sup>[189, 191-192, 249]</sup> Ein proteomanalytisches SILAC-basiertes Folgeprojekt mit immobilisierten HAT1 als Köder und Zellkernextrakten könnte die Funktion des Proteins im Zellkern und den Bezug zu Histon H3 weiter aufklären.

In dem zweiten Projekt wurde mit Hilfe SILAC-basierter Proteomanalyse das Interaktionsnetzwerk des Adapterproteins FHL3 untersucht. Dabei wurden 484 potentielle Interaktionspartner im Zellkernextrakt und 244 in den cytosolischen Fraktionen muriner Fibroblasten entdeckt. Die separate proteomanalytische Untersuchung der Zellkompartimente Cytosol und Kern machte es möglich einen direkten Bezug von FHL3 zu Lokalisations-spezifischen Bindeproteinen und ihren Funktionen zu erhalten. Unter den identifizierten Proteinen befanden sich größtenteils Proteine die bisher noch nie mit FHL3 oder einem anderen Mitglied der FHL-Familie in Zusammenhang gebracht worden sind. Ausgewählte neu entdeckte FHL3-Interaktionspartner wurden per Western Blot Analyse validiert. Die Forschungsergebnisse dieser Arbeit vermitteln, dass das FHL3-Protein vermutlich multifunktional mit Zellvorgängen, wie DNA-Replikation, DNA-Schädigung und transkriptioneller Aktivierung verknüpft ist. Außerdem scheint es bei endosomal-gesteuerten Vorgängen sowie bei der malignen Krebsentwicklung eine Rolle zu spielen. Letztere Entdeckung ist besonders interessant, da die entdeckten Interaktionspartner als Markerproteine für einen ungünstigen Krankheitsverlauf bei Patienten mit Non-Hodgkin-Lymphomen dienen.

Nicht zuletzt konnte, durch die Ergebnisse beider Projekte, auch eine Verknüpfung zwischen FHL3 und dem Histon H3-Tail offengelegt werden. Inwiefern direkte Protein-FHL3-Wechselwirkungen unter den ausfindig gemachten Interaktionspartnern und FHL3 existieren oder unter welchen Proteinen oder Proteinkomplexen das Adapterprotein vermittelt, würde sich durch nachfolgende Untersuchungen im Einzelnen klären lassen. Anbieten wurden sich in diesem Bezug Pull-Down-Versuche mit entsprechenden rekombinant hergestellten Proteinen. Allgemein können die in dieser Arbeit ermittelten Daten als Fundament genutzt werden, um die Funktionalität von FHL3 umfassender Aufklärung zugänglich zu machen.





## 6 LITERATURVERZEICHNIS

- [1] Luger, K., Mader, A. W., Richmond, R. K., Sargent, D. F., Richmond, T. J., *Nature*, **1997**, 389, 251-260.
- [2] Thoma, F., Koller, T., *Cell*, **1977**, 12, 101-107.
- [3] Sadava, D., Heller, H. C., Orians, G. H., Purves, W. K., Hillis, D. M., 8th Edition ed., Sinauer Associates, Inc., and W. H. Freeman and Company, **2006**.
- [4] Voet, D., Voet, J. G., 1. Auflage ed., John Wiley and Sons, Inc., **1994**.
- [5] Strahl, B. D., Allis, C. D., *Nature*, **2000**, 403, 41-45.
- [6] Jenuwein, T., Allis, C. D., *Science*, **2001**, 293, 1074-1080.
- [7] Sullivan, K. F., Hechenberger, M., Masri, K., *Journal of Cell Biology*, **1994**, 127, 581-592.
- [8] Gutierre, R. M., Hnilica, L. S., *Science*, **1967**, 157, 1324-1325.
- [9] Gurley, L. R., Danna, J. A., Barham, S. S., Deaven, L. L., Tobey, R. A., *European Journal of Biochemistry*, **1978**, 84, 1-15.
- [10] Goto, H., Tomono, Y., Ajiro, K., Kosako, H., Fujita, M., Sakurai, M., Okawa, K., Iwamatsu, A., Okigaki, T., Takahashi, T., Inagaki, M., *Journal of Biological Chemistry*, **1999**, 274, 25543-25549.
- [11] Shoemaker, C. B., Chalkley, R., *Journal of Biological Chemistry*, **1980**, 255, 1048-1055.
- [12] Preuss, U., Landsberg, G., Scheidtmann, K. H., *Nucleic Acids Research*, **2003**, 31, 878-885.
- [13] Metzger, E., Imhof, A., Patel, D., Kahl, P., Hoffmeyer, K., Friedrichs, N., Muller, J. M., Greschik, H., Kirfel, J., Ji, S., Kunowska, N., Beisenherz-Huss, C., Gunther, T., Buettner, R., Schule, R., *Nature*, **2010**, 464, 792-796.
- [14] Nowak, S. J., Corces, V. G., *Trends in Genetics*, **2004**, 20, 214-220.
- [15] Perez-Cadahia, B., Drobic, B., Davie, J. R., *Biochemistry and Cell Biology-Biochimie Et Biologie Cellulaire*, **2009**, 87, 695-709.
- [16] Prigent, C., Dimitrov, S., *Journal of Cell Science*, **2003**, 116, 3677-3685.
- [17] de la Barre, A. E., Gerson, V., Gout, S., Creaven, M., Allis, C. D., Dimitrov, S., *EMBO J*, **2000**, 19, 379-391.
- [18] De Souza, C. P., Osmani, A. H., Wu, L. P., Spotts, J. L., Osmani, S. A., *Cell*, **2000**, 102, 293-302.
- [19] Hendzel, M. J., Wei, Y., Mancini, M. A., Van Hooser, A., Ranalli, T., Brinkley, B. R., Bazett-Jones, D. P., Allis, C. D., *Chromosoma*, **1997**, 106, 348-360.

- [20] Hsu, J. Y., Sun, Z. W., Li, X., Reuben, M., Tatchell, K., Bishop, D. K., Grushcow, J. M., Brame, C. J., Caldwell, J. A., Hunt, D. F., Lin, R., Smith, M. M., Allis, C. D., *Cell*, **2000**, *102*, 279-291.
- [21] Kaszas, E., Cande, W. Z., *Journal of Cell Science*, **2000**, *113*, 3217-3226.
- [22] Van Hooser, A., Goodrich, D. W., Allis, C. D., Brinkley, B. R., Mancini, M. A., *Journal of Cell Science*, **1998**, *111*, 3497-3506.
- [23] Wei, Y., Mizzen, C. A., Cook, R. G., Gorovsky, M. A., Allis, C. D., *Proc Natl Acad Sci U S A*, **1998**, *95*, 7480-7484.
- [24] Wei, Y., Yu, L. L., Bowen, J., Gorovsky, M. A., Allis, C. D., *Cell*, **1999**, *97*, 99-109.
- [25] Allfrey, V. G., Faulkner, R., Mirsky, A. E., *Proc Natl Acad Sci U S A*, **1964**, *51*, 786-794.
- [26] Brownell, J. E., Zhou, J. X., Ranalli, T., Kobayashi, R., Edmondson, D. G., Roth, S. Y., Allis, C. D., *Cell*, **1996**, *84*, 843-851.
- [27] Garcia, B. A., Barber, C. M., Hake, S. B., Ptak, C., Turner, F. B., Busby, S. A., Shabanowitz, J., Moran, R. G., Allis, C. D., Hunt, D. F., *Biochemistry*, **2005**, *44*, 13202-13213.
- [28] Fischle, W., Tseng, B. S., Dormann, H. L., Ueberheide, B. M., Garcia, B. A., Shabanowitz, J., Hunt, D. F., Funabiki, H., Allis, C. D., *Nature*, **2005**, *438*, 1116-1122.
- [29] Loomis, R. J., Naoe, Y., Parker, J. B., Savic, V., Bozovsky, M. R., Macfarlan, T., Manley, J. L., Chakravarti, D., *Molecular Cell*, **2009**, *33*, 450-461.
- [30] Cerutti, H., Casas-Mollano, J. A., *Epigenetics*, **2009**, *4*, 71-75.
- [31] Lo, W. S., Gamache, E. R., Henry, K. W., Yang, D., Pillus, L., Berger, S. L., *Embo Journal*, **2005**, *24*, 997-1008.
- [32] Chadee, D. N., Hendzel, M. J., Tylipski, C. P., Allis, C. D., Bazett-Jones, D. P., Wright, J. A., Davie, J. R., *Journal of Biological Chemistry*, **1999**, *274*, 24914-24920.
- [33] Thomson, S., Clayton, A. L., Mahadevan, L. C., *Molecular Cell*, **2001**, *8*, 1231-1241.
- [34] Soloaga, A., Thomson, S., Wiggin, G. R., Rampersaud, N., Dyson, M. H., Hazzalin, C. A., Mahadevan, L. C., Arthur, J. S. C., *Embo Journal*, **2003**, *22*, 2788-2797.
- [35] Anest, V., Cogswell, P. C., Baldwin, A. S., *Journal of Biological Chemistry*, **2004**, *279*, 31183-31189.
- [36] Duncan, E. A., Anest, V., Cogswell, P., Baldwin, A. S., *Journal of Biological Chemistry*, **2006**, *281*, 12521-12525.
- [37] Zippo, A., De Robertis, A., Serafini, R., Oliviero, S., *Nature Cell Biology*, **2007**, *9*, 932-944.
- [38] Nowak, S. J., Corces, V. G., *Genes & Development*, **2000**, *14*, 3003-3013.
- [39] Johansen, K. M., Johansen, J., *Chromosome Research*, **2006**, *14*, 393-404.
- [40] Vicent, G. P., Ballare, C., Zaurin, R., Saragueta, P., Beato, M., *Ann N Y Acad Sci*, **2006**, *1089*, 59-72.
- [41] Cheung, P., Tanner, K. G., Cheung, W. L., Sassone-Corsi, P., Denu, J. M., Allis, C. D., *Molecular Cell*, **2000**, *5*, 905-915.
- [42] Clayton, A. L., Rose, S., Barratt, M. J., Mahadevan, L. C., *Embo Journal*, **2000**, *19*, 3714-3726.
- [43] MacDonald, N., Welburn, J. P. I., Noble, M. E. M., Nguyen, A., Yaffe, M. B., Clynes, D., Moggs, J. G., Orphanides, G., Thomson, S., Edmunds, J. W., Clayton, A. L., Endicott, J. A., Mahadevan, L. C., *Molecular Cell*, **2005**, *20*, 199-211.

- [44] Walter, W., Clynes, D., Tang, Y., Marmorstein, R., Mellor, J., Berger, S. L., *Molecular and Cellular Biology*, **2008**, *28*, 2840-2849.
- [45] Winter, S., Simboeck, E., Fischle, W., Zupkovitz, G., Dohnal, I., Mechtler, K., Ammerer, G., Seiser, C., *EMBO J*, **2008**, *27*, 88-99.
- [46] Lo, W. S., Trievel, R. C., Rojas, J. R., Duggan, L., Hsu, J. Y., Allis, C. D., Marmorstein, R., Berger, S. L., *Molecular Cell*, **2000**, *5*, 917-926.
- [47] Taylor, S. S., *J Biol Chem*, **1982**, *257*, 6056-6063.
- [48] Kang, T. H., Park, D. Y., Choi, Y. H., Kim, K. J., Yoon, H. S., Kim, K. T., *Molecular and Cellular Biology*, **2007**, *27*, 8533-8546.
- [49] Crosio, C., Fimia, G. M., Loury, R., Kimura, M., Okano, Y., Zhou, H. Y., Sen, S., Allis, C. D., Sassone-Corsi, P., *Molecular and Cellular Biology*, **2002**, *22*, 874-885.
- [50] Giet, R., Glover, D. M., *Journal of Cell Biology*, **2001**, *152*, 669-681.
- [51] Murnion, M. E., Adams, R. R., Callister, D. M., Allis, C. D., Earnshaw, W. C., Swedlow, J. R., *Journal of Biological Chemistry*, **2001**, *276*, 26656-26665.
- [52] Scrittore, L., Hans, F., Angelov, D., Charra, M., Prigent, C., Dimitrov, S., *Journal of Biological Chemistry*, **2001**, *276*, 30002-30010.
- [53] Hazzalin, C. A., Cuenda, A., Cano, E., Cohen, P., Mahadevan, L. C., *Oncogene*, **1997**, *15*, 2321-2331.
- [54] Thomson, S., Clayton, A. L., Hazzalin, C. A., Rose, S., Barratt, M. J., Mahadevan, L. C., *Embo Journal*, **1999**, *18*, 4779-4793.
- [55] DeManno, D. A., Cottom, J. E., Kline, M. P., Peters, C. A., Maizels, E. T., Hunzicker-Dunn, M., *Mol Endocrinol*, **1999**, *13*, 91-105.
- [56] Schmitt, A., Gutierrez, G. J., Lenart, P., Ellenberg, J., Nebreda, A. R., *Febs Letters*, **2002**, *518*, 23-28.
- [57] Sassone-Corsi, P., Mizzen, C. A., Cheung, P., Crosio, C., Monaco, L., Jacquot, S., Hanauer, A., Allis, C. D., *Science*, **1999**, *285*, 886-891.
- [58] Yamamoto, Y., Verma, U. N., Prajapati, S., Kwak, Y. T., Gaynor, R. B., *Nature*, **2003**, *423*, 655-659.
- [59] Salvador, L. M., Park, Y., Cottom, J., Maizels, E. T., Jones, J. C. R., Schillace, R. V., Carr, D. W., Cheung, P., Allis, C. D., Jameson, J. L., Hunzicker-Dunn, M., *Journal of Biological Chemistry*, **2001**, *276*, 40146-40155.
- [60] Li, Y., DeFatta, R., Anthony, C., Sunavala, G., De Benedetti, A., *Oncogene*, **2001**, *20*, 726-738.
- [61] de Carvalho, C. E., Zaijier, S., Smolikov, S., Gu, Y. J., Schumacher, J. M., Colaiacovo, M. P., *Genes & Development*, **2008**, *22*, 2869-2885.
- [62] Francisco, L., Wang, W. F., Chan, C. S. M., *Molecular and Cellular Biology*, **1994**, *14*, 4731-4740.
- [63] Tsai, M. Y., Wiese, C., Cao, K., Martin, O., Donovan, P., Ruderman, J., Prigent, C., Zheng, Y. X., *Nature Cell Biology*, **2003**, *5*, 242-248.
- [64] Aggen, J. B., Nairn, A. C., Chamberlin, R., *Chem Biol*, **2000**, *7*, 13-23.
- [65] Andreassen, P. R., Lacroix, F. B., Villa-Moruzzi, E., Margolis, R. L., *Journal of Cell Biology*, **1998**, *141*, 1207-1215.

- [66] Katayama, H., Zhou, H., Li, Q., Tatsuka, M., Sen, S., *Journal of Biological Chemistry*, **2001**, 276, 46219-46224.
- [67] Sugiyama, K., Sugiura, K., Hara, T., Sugimoto, K., Shima, H., Honda, K., Furukawa, K., Yamashita, S., Urano, T., *Oncogene*, **2002**, 21, 3103-3111.
- [68] Wera, S., Hemmings, B. A., *Biochemical Journal*, **1995**, 311 ( Pt 1), 17-29.
- [69] Barker, H. M., Brewis, N. D., Street, A. J., Spurr, N. K., Cohen, P. T., *Biochim Biophys Acta*, **1994**, 1220, 212-218.
- [70] Nowak, S. J., Pai, C. Y., Corces, V. G., *Molecular and Cellular Biology*, **2003**, 23, 6129-6138.
- [71] Clements, A., Poux, A. N., Lo, W. S., Pillus, L., Berger, S. L., Marmorstein, R., *Molecular Cell*, **2003**, 12, 461-473.
- [72] Shimada, M., Niida, H., Zineldeen, D. H., Tagami, H., Tanaka, M., Saito, H., Nakanishi, M., *Cell*, **2008**, 132, 221-232.
- [73] Goto, H., Yasui, Y., Nigg, E. A., Inagaki, M., *Genes to Cells*, **2002**, 7, 11-17.
- [74] Dunn, K. L., Davie, J. R., *Oncogene*, **2005**, 24, 3492-3502.
- [75] Dyson, M. H., Thomson, S., Inagaki, M., Goto, H., Arthur, S. J., Nightingale, K., Iborra, F. J., Mahadevan, L. C., *Journal of Cell Science*, **2005**, 118, 2247-2259.
- [76] Dunn, K. L., He, S. H., Wark, L., Delcuve, G. F., Sun, J. M., Chen, H. Y., Mai, S., Davie, J. R., *Genes Chromosomes & Cancer*, **2009**, 48, 397-409.
- [77] Metzger, E., Yin, N., Wissmann, M., Kunowska, N., Fischer, K., Friedrichs, N., Patnaik, D., Higgins, J. M. G., Potier, N., Scheidtmann, K. H., Buettner, R., Schule, R., *Nature Cell Biology*, **2008**, 10, 53-60.
- [78] Dai, J., Sultan, S., Taylor, S. S., Higgins, J. M. G., *Genes & Development*, **2005**, 19, 472-488.
- [79] Dai, J., Sullivan, B. A., Higgins, J. M. G., *Developmental Cell*, **2006**, 11, 741-750.
- [80] Seo, S. B., McNamara, P., Heo, S., Turner, A., Lane, W. S., Chakravarti, D., *Cell*, **2001**, 104, 119-130.
- [81] Schneider, R., Bannister, A. J., Weise, C., Kouzarides, T., *Journal of Biological Chemistry*, **2004**, 279, 23859-23862.
- [82] Fischle, W., Wang, Y. M., Allis, C. D., *Nature*, **2003**, 425, 475-479.
- [83] Garske, A. L., Oliver, S. S., Wagner, E. K., Musselman, C. A., LeRoy, G., Garcia, B. A., Kutateladze, T. G., Denu, J. M., *Nature Chemical Biology*, **2010**, 6, 283-290.
- [84] Zeitlin, S. G., Barber, C. M., Allis, C. D., Sullivan, K., *Journal of Cell Science*, **2001**, 114, 653-661.
- [85] Kunitoku, N., Sasayama, T., Marumoto, T., Zhang, D. W., Honda, S., Kobayashi, O., Hatakeyama, K., Ushio, Y., Saya, H., Hirota, T., *Developmental Cell*, **2003**, 5, 853-864.
- [86] Zeitlin, S. G., Shelby, R. D., Sullivan, K. F., *Journal of Cell Biology*, **2001**, 155, 1147-1157.
- [87] Houben, A., Demidov, D., Rutten, T., Scheidtmann, K. H., *Cytogenetic and Genome Research*, **2005**, 109, 148-155.
- [88] Burke, T. R., Kole, H. K., Roller, P. P., *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **1994**, 204, 129-134.
- [89] Lu, W., Gong, D. Q., Bar-Sagi, D., Cole, P. A., *Molecular Cell*, **2001**, 8, 759-769.

- [90] Schwarzer, D., Zhang, Z. S., Zheng, W. P., Cole, P. A., *Journal of the American Chemical Society*, **2006**, *128*, 4192-4193.
- [91] Yao, Z. J., King, C. R., Cao, T., Kelley, J., Milne, G. W. A., Voigt, J. H., Burke, T. R., *Journal of Medicinal Chemistry*, **1999**, *42*, 25-35.
- [92] Zheng, W. P., Schwarzer, D., LeBeau, A., Weller, J. L., Klein, D. C., Cole, P. A., *Journal of Biological Chemistry*, **2005**, *280*, 10462-10467.
- [93] Zheng, W. P., Zhang, Z. S., Ganguly, S., Weller, J. L., Klein, D. C., Cole, P. A., *Nature Structural Biology*, **2003**, *10*, 1054-1057.
- [94] Merrifield, R. B., *Journal of the American Chemical Society*, **1963**, *85*, 2149-8.
- [95] Dawson, P. E., Muir, T. W., Clarklewis, I., Kent, S. B. H., *Science*, **1994**, *266*, 776-779.
- [96] Muir, T. W., Sondhi, D., Cole, P. A., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **1998**, *95*, 6705-6710.
- [97] Freyd, G., Kim, S. K., Horvitz, H. R., *Nature*, **1990**, *344*, 876-879.
- [98] Karlsson, O., Thor, S., Norberg, T., Ohlsson, H., Edlund, T., *Nature*, **1990**, *344*, 879-882.
- [99] Way, J. C., Chalfie, M., *Cell*, **1988**, *54*, 5-16.
- [100] Kadmas, J. L., Beckerle, M. C., *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **2004**, *5*, 920-931.
- [101] Li, P. M., Reichert, J., Freyd, G., Horvitz, H. R., Walsh, C. T., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **1991**, *88*, 9210-9213.
- [102] Pérez-Alvarado, G. C., Miles, C., Michelsen, J. W., Louis, H. A., Winge, D. R., Beckerle, M. C., Summers, M. F., *Nature Structural Biology*, **1994**, *1*, 388-398.
- [103] Bach, I., *Mechanisms of Development*, **2000**, *91*, 5-17.
- [104] Dawid, I. B., Breen, J. J., Toyama, R., *Trends in Genetics*, **1998**, *14*, 156-162.
- [105] Coghill, I. D., Brown, S., Cottle, D. L., McGrath, M. J., Robinson, P. A., Nandurkar, H. H., Dyson, J. M., Mitchell, C. A., *Journal of Biological Chemistry*, **2003**, *278*, 24139-24152.
- [106] Chu, P. H., Ruiz-Lozano, P., Zhou, Q., Cai, C. L., Chen, J., *Mechanisms of Development*, **2000**, *95*, 259-265.
- [107] Morgan, M. J., Madgwick, A. J. A., *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **1999**, *255*, 245-250.
- [108] Johannessen, M., Moller, S., Hansen, T., Moens, U., Van Ghelue, M., *Cellular and Molecular Life Sciences*, **2006**, *63*, 268-284.
- [109] Chu, P. H., Bardwell, W. M., Gu, Y., Ross, J., Chen, J., *Molecular and Cellular Biology*, **2000**, *20*, 7460-7462.
- [110] Fimia, G. M., De Cesare, D., Sassone-Corsi, P., *Molecular and Cellular Biology*, **2000**, *20*, 8613-8622.
- [111] Samson, T., Smyth, N., Janetzky, S., Wendler, O., Muller, J. M., Schule, R., von der Mark, H., von der Mark, K., Wixler, V., *Journal of Biological Chemistry*, **2004**, *279*, 28641-28652.
- [112] Cowling, B. S., McGrath, M. J., Nguyen, M. A., Cottle, D. L., Kee, A. J., Brown, S., Schessl, J., Zou, Y. Q., Joya, J., Bonnemann, C. G., Hardeman, E. C., Mitchell, C. A., *Journal of Cell Biology*, **2008**, *183*, 1033-1048.

- [113] McGrath, M. J., Cottle, D. L., Nguyen, M. A., Dyson, J. M., Coghill, I. D., Robinson, P. A., Holdsworth, M., Cowling, B. S., Hardeman, E. C., Mitchell, C. A., Brown, S., *Journal of Biological Chemistry*, **2006**, *281*, 7666-7683.
- [114] Lee, S. M. Y., Li, H. Y., Ng, E. K. O., Or, S. M. W., Chan, K. K., Kotaka, M., Chim, S. S. C., Tsui, S. K. W., Waye, M. M. Y., Fung, K. P., Lee, C. Y., *Gene*, **1999**, *237*, 253-263.
- [115] Ng, E. K. O., Lee, S. M. Y., Li, H. Y., Ngai, S. M., Tsui, S. K. W., Waye, M. M. Y., Lee, C. Y., Fung, K. P., *Journal of Cellular Biochemistry*, **2001**, *82*, 1-10.
- [116] Fimia, G. M., De Cesare, D., Sassone-Corsi, P., *Nature*, **1999**, *398*, 165-169.
- [117] Muraro, T., Stephan, D., Tiso, N., Zimbello, R., Danieli, G. A., Hoffman, E. H., Valle, G., Lanfranchi, G., *Cytogenetics and Cell Genetics*, **1997**, *76*, 144-152.
- [118] Engle, E. C., Castro, A. E., Macy, M. E., Knoll, J. H. M., Beggs, A. H., *American Journal of Human Genetics*, **1997**, *60*, 1150-1157.
- [119] Nicole, S., Benhamida, C., Beighton, P., Bakouri, S., Belal, S., Romero, N., Viljoen, D., Ponsot, G., Sammoud, A., Weissenbach, J., Fardeau, M., Hamida, M. B., Fontaine, B., Hentati, F., *Human Molecular Genetics*, **1995**, *4*, 1633-1636.
- [120] Li, H. Y., Ng, E. K. O., Lee, S. M. Y., Kotaka, M., Tsui, S. K. W., Lee, C. Y., Fung, K. P., Waye, M. M. Y., *Journal of Cellular Biochemistry*, **2001**, *80*, 293-303.
- [121] Takahashi, K., Matsumoto, C., Ra, C., *Biochemical Journal*, **2005**, *386*, 191-200.
- [122] Turner, J., Nicholas, H., Bishop, D., Matthews, J. M., Crossley, M., *Journal of Biological Chemistry*, **2003**, *278*, 12786-12795.
- [123] Cottle, D. L., McGrath, M. J., Cowling, B. S., Coghill, I. D., Brown, S., Mitchell, C. A., *Journal of Cell Science*, **2007**, *120*, 1423-1435.
- [124] Meeson, A. P., Shi, X. Z., Alexander, M. S., Williams, R., Allen, R. E., Jiang, N., Adham, I. M., Goetsch, S. C., Hammer, R. E., Garry, D. J., *Embo Journal*, **2007**, *26*, 1902-1912.
- [125] Mils, V., Lee, S. M. Y., Joly, W., Hang, E. W. C., Baldin, V., Waye, M. M. Y., Ducommun, B., Kwok, S., Tsui, W., *Experimental Cell Research*, **2003**, *285*, 99-106.
- [126] Laitinen, O. H., Hytonen, V. P., Nordlund, H. R., Kulomaa, M. S., *Cellular and Molecular Life Sciences*, **2006**, *63*, 2992-3017.
- [127] Wysocka, J., *Methods*, **2006**, *40*, 339-343.
- [128] Klose, J., *Humangenetik*, **1975**, *26*, 231-243.
- [129] Ofarrell, P. H., *Journal of Biological Chemistry*, **1975**, *250*, 4007-4021.
- [130] Johnson, K. L., Muddiman, D. C., *J Am Soc Mass Spectrom*, **2004**, *15*, 437-445.
- [131] Korbel, S., Schumann, M., Bittorf, T., Krause, E., *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **2005**, *19*, 2259-2271.
- [132] Yao, X., Freas, A., Ramirez, J., Demirev, P. A., Fenselau, C., *Anal Chem*, **2001**, *73*, 2836-2842.
- [133] Mann, M., *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **2006**, *7*, 952-958.
- [134] Ong, S. E., Blagoev, B., Kratchmarova, I., Kristensen, D. B., Steen, H., Pandey, A., Mann, M., *Molecular & Cellular Proteomics*, **2002**, *1*, 376-386.
- [135] Lange, S., Sylvester, M., Schumann, M., Freund, C., Krause, E., *Journal of Proteome Research*, **2010**, *9*, 4113-4122.

- [136] Molina, H., Yang, Y., Ruch, T., Kim, J. W., Mortensen, P., Otto, T., Nalli, A., Tang, Q. Q., Lane, M. D., Chaerkady, R., Pandey, A., *J Proteome Res*, **2009**, *8*, 48-58.
- [137] Cox, J., Mann, M., *Nature Biotechnology*, **2008**, *26*, 1367-1372.
- [138] Cox, J., Matic, I., Hilger, M., Nagaraj, N., Selbach, M., Olsen, J. V., Mann, M., *Nature Protocols*, **2009**, *4*, 698-705.
- [139] de Godoy, L. M. F., Olsen, J. V., Cox, J., Nielsen, M. L., Hubner, N. C., Frohlich, F., Walther, T. C., Mann, M., *Nature*, **2008**, *455*, 1251-1254.
- [140] Gruhler, A., Olsen, J. V., Mohammed, S., Mortensen, P., Faergeman, N. J., Mann, M., Jensen, O. N., *Molecular & Cellular Proteomics*, **2005**, *4*, 310-327.
- [141] Gruhler, A., Schulze, W. X., Matthiesen, R., Mann, M., Jensen, O. N., *Molecular & Cellular Proteomics*, **2005**, *4*, 1697-1709.
- [142] Kruger, M., Moser, M., Ussar, S., Thievensen, I., Lubner, C. A., Forner, F., Schmidt, S., Zanivan, S., Fassler, R., Mann, M., *Cell*, **2008**, *134*, 353-364.
- [143] Kole, H. K., Smyth, M. S., Russ, P. L., Burke, T. R., *Biochemical Journal*, **1995**, *311*, 1025-1031.
- [144] Wellings, D. A., Atherton, E., in *Methods in Enzymology*, Vol. 289 (Ed.: Fields, G. B.), Academic Press, New York, **1997**.
- [145] Wöhr, T., Mutter, M., *Tetrahedron Letters*, **1995**, *36*, 3847-3848.
- [146] Wöhr, T., Wahl, F., Nefzi, A., Rohwedder, B., Sato, T., Sun, X. C., Mutter, M., *Journal of the American Chemical Society*, **1996**, *118*, 9218-9227.
- [147] Zahariev, S., Guarnaccia, C., Zanuttina, F., Pintar, A., Esposito, G., Maravic, G., Krust, B., Hovanesian, A. G., Pongor, S., *Journal of Peptide Science*, **2005**, *11*, 17-28.
- [148] Terrak, M., Kerff, F., Langsetmo, K., Tao, T., Dominguez, R., *Nature*, **2004**, *429*, 780-784.
- [149] Dignam, J. D., Martin, P. L., Shastry, B. S., Roeder, R. G., *Methods in Enzymology*, **1983**, *101*, 582-598.
- [150] Wysocka, J., Swigut, T., Milne, T. A., Dou, Y., Zhang, X., Burlingame, A. L., Roeder, R. G., Brivanlou, A. H., Allis, C. D., *Cell*, **2005**, *121*, 859-872.
- [151] Couture, J. F., Collazo, E., Trievel, R. C., *Nat Struct Mol Biol*, **2006**, *13*, 698-703.
- [152] Trievel, R. C., Shilatifard, A., *Nature Structural & Molecular Biology*, **2009**, *16*, 678-680.
- [153] Guccione, E., Bassi, C., Casadio, F., Martinato, F., Cesaroni, M., Schuchlantz, H., Luscher, B., Amati, B., *Nature*, **2007**, *449*, 933-U918.
- [154] Patel, A., Dharmarajan, V., Vought, V. E., Cosgrove, M. S., *Journal of Biological Chemistry*, **2009**, *284*, 24242-24256.
- [155] Ruthenburg, A. J., Wang, W., Graybosch, D. M., Li, H., Allis, C. D., Patel, D. J., Verdine, G. L., *Nat Struct Mol Biol*, **2006**, *13*, 704-712.
- [156] Iizuka, M., Stillman, B., *J Biol Chem*, **1999**, *274*, 23027-23034.
- [157] Utley, R. T., Cote, J., *Protein Complexes That Modify Chromatin*, **2003**, *274*, 203-236.
- [158] Iizuka, M., Takahashi, Y., Mizzen, C. A., Cook, R. G., Fujita, M., Allis, C. D., Frierson, H. F., Jr., Fukusato, T., Smith, M. M., *Gene*, **2009**, *436*, 108-114.

- [159] Saksouk, N., Avvakumov, N., Champagne, K. S., Hung, T., Doyon, Y., Cayrou, C., Paquet, E., Ullah, M., Landry, A. J., Cote, V., Yang, X. J., Gozani, O., Kutateladze, T. G., Cote, J., *Molecular Cell*, **2009**, *33*, 257-265.
- [160] Tachibana, M., Sugimoto, K., Fukushima, T., Shinkai, Y., *Journal of Biological Chemistry*, **2001**, *276*, 25309-25317.
- [161] Wu, H., Min, J., Lunin, V. V., Antoshenko, T., Dombrovski, L., Zeng, H., Allali-Hassani, A., Campagna-Slater, V., Vedadi, M., Arrowsmith, C. H., Plotnikov, A. N., Schapira, M., *PLoS One*, **2010**, *5*, e8570.
- [162] Chin, H. G., Pradhan, M., Esteve, P. O., Patnaik, D., Evans, T. C., Pradhan, S., *Biochemistry*, **2005**, *44*, 12998-13006.
- [163] Feng, Q., Cao, R., Xia, L., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Zhang, Y., *Molecular and Cellular Biology*, **2002**, *22*, 536-546.
- [164] Feng, Q., Zhang, Y., *Genes & Development*, **2001**, *15*, 827-832.
- [165] Tong, J. K., Hassig, C. A., Schnitzler, G. R., Kingston, R. E., Schreiber, S. L., *Nature*, **1998**, *395*, 917-921.
- [166] Wade, P. A., Geronne, A., Jones, P. L., Ballestar, E., Aubry, F., Wolffe, A. P., *Nature Genetics*, **1999**, *23*, 62-66.
- [167] Xue, Y. T., Wong, J. M., Moreno, G. T., Young, M. K., Cote, J., Wang, W. D., *Molecular Cell*, **1998**, *2*, 851-861.
- [168] Zhang, Y., LeRoy, G., Seelig, H. P., Lane, W. S., Reinberg, D., *Cell*, **1998**, *95*, 279-289.
- [169] Musselman, C. A., Mansfield, R. E., Garske, A. L., Davrazou, F., Kwan, A. H., Oliver, S. S., O'Leary, H., Denu, J. M., Mackay, J. P., Kutateladze, T. G., *Biochemical Journal*, **2009**, *423*, 179-187.
- [170] Christensen, J., Agger, K., Cloos, P. A., Pasini, D., Rose, S., Sennels, L., Rappsilber, J., Hansen, K. H., Salcini, A. E., Helin, K., *Cell*, **2007**, *128*, 1063-1076.
- [171] Seward, D. J., Cubberley, G., Kim, S., Schonewald, M., Zhang, L., Tripet, B., Bentley, D. L., *Nature Structural & Molecular Biology*, **2007**, *14*, 240-242.
- [172] Guo, X., Xu, Y. W., Wang, P., Li, Z., Xu, Y. H., Yang, H. R., *Acta Crystallographica Section F-Structural Biology and Crystallization Communications*, **2011**, *67*, 907-910.
- [173] Li, L., Greer, C., Eisenman, R. N., Secombe, J., *Plos Genetics*, **2010**, *6*.
- [174] Wang, G. G., Song, J. K., Wang, Z. X., Dormann, H. L., Casadio, F., Li, H. T., Luo, J. L., Patel, D. J., Allis, C. D., *Nature*, **2009**, *459*, 847-U846.
- [175] Tissiere, A., Mitchell, H. K., Tracy, U. M., *Journal of Molecular Biology*, **1974**, *84*, 389-&.
- [176] Parsell, D. A., Lindquist, S., *Annual Review of Genetics*, **1993**, *27*, 437-496.
- [177] Ellis, R. J., Vandervies, S. M., *Annual Review of Biochemistry*, **1991**, *60*, 321-347.
- [178] Guidon, P. T., Hightower, L. E., *Biochemistry*, **1986**, *25*, 3231-3239.
- [179] Hartl, F. U., *Nature*, **1996**, *381*, 571-580.
- [180] Nunes, S. L., Calderwood, S. K., *Biochem Biophys Res Commun*, **1995**, *213*, 1-6.
- [181] Zhu, X. T., Zhao, X., Burkholder, W. F., Gragerov, A., Ogata, C. M., Gottesman, M. E., Hendrickson, W. A., *Science*, **1996**, *272*, 1606-1614.
- [182] Flaherty, K. M., DeLuca-Flaherty, C., McKay, D. B., *Nature*, **1990**, *346*, 623-628.

- [183] Schmid, D., Baici, A., Gehring, H., Christen, P., *Science*, **1994**, 263, 971-973.
- [184] Johnson, C. A., White, D. A., Lavender, J. S., O'Neill, L. P., Turner, B. M., *Journal of Biological Chemistry*, **2002**, 277, 9590-9597.
- [185] Gragerov, A., Li, Z., Xun, Z., Burkholder, W., Gottesman, M. E., *Journal of Molecular Biology*, **1994**, 235, 848-854.
- [186] Rudiger, S., Germeroth, L., SchneiderMergener, J., Bukau, B., *Embo Journal*, **1997**, 16, 1501-1507.
- [187] Campos, E. I., Fillingham, J., Li, G., Zheng, H., Voigt, P., Kuo, W. H., Seepany, H., Gao, Z., Day, L. A., Greenblatt, J. F., Reinberg, D., *Nat Struct Mol Biol*, **2010**, 17, 1343-1351.
- [188] Grunstein, M., *Nature*, **1997**, 389, 349-352.
- [189] Verreault, A., Kaufman, P. D., Kobayashi, R., Stillman, B., *Current Biology*, **1997**, 8, 96-108.
- [190] Murzina, N. V., Pei, X. Y., Zhang, W., Sparkes, M., Vicente-Garcia, J., Pratap, J. V., McLaughlin, S. H., Ben-Shahar, T. R., Verreault, A., Luisi, B. F., Laue, E. D., *Structure*, **2008**, 16, 1077-1085.
- [191] Ejlassi-Lassalette, A., Mocquard, E., Arnaud, M. C., Thiriet, C., *Molecular Biology of the Cell*, **2011**, 22, 245-255.
- [192] Ai, X., Parthun, M. R., *Molecular Cell*, **2004**, 14, 195-205.
- [193] Chan, D. W., Wang, Y., Wu, M., Wong, J. M., Qin, J., Zhao, Y. M., *Proteomics*, **2009**, 9, 2343-2354.
- [194] Brandao, T. A. S., Hengge, A. C., Johnson, S. J., *Journal of Biological Chemistry*, **2010**, 285, 15874-15883.
- [195] Holtz, K. M., Stec, B., Kantrowitz, E. R., *Journal of Biological Chemistry*, **1999**, 274, 8351-8354.
- [196] Gauci, S., Helbig, A. O., Slijper, M., Krijgsveld, J., Heck, A. J. R., Mohammed, S., *Analytical Chemistry*, **2009**, 81, 4493-4501.
- [197] Dephoure, N., Zhou, C., Villen, J., Beausoleil, S. A., Bakalarski, C. E., Elledge, S. J., Gygi, S. P., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **2008**, 105, 10762-10767.
- [198] Olsen, J. V., Blagoev, B., Gnadt, F., Macek, B., Kumar, C., Mortensen, P., Mann, M., *Cell*, **2006**, 127, 635-648.
- [199] Dutnall, R. N., Tafrov, S. T., Sternglanz, R., Ramakrishnan, V., *Cell*, **1998**, 94, 427-438.
- [200] Benson, L. J., Phillips, J. A., Gu, Y., Parthun, M. R., Hoffman, C. S., Annunziato, A. T., *Journal of Biological Chemistry*, **2007**, 282, 836-842.
- [201] Qin, S., Parthun, M. R., *Molecular and Cellular Biology*, **2002**, 22, 8353-8365.
- [202] Forsburg, S. L., *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **2004**, 68, 109-131.
- [203] Labib, K., Tercero, J. A., Diffley, J. F. X., *Science*, **2000**, 288, 1643-1647.
- [204] Bochman, M. L., Schwacha, A., *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **2009**, 73, 652-683.
- [205] Chan, K. K., Tsui, S. K. W., Ngai, S. M., Lee, S. M. Y., Kotaka, M., Wayne, M. M. Y., Lee, C. Y., Fung, K. P., *Journal of Cellular Biochemistry*, **2000**, 76, 499-508.

- [206] Feuerstein, R., Wang, X. K., Song, D. C., Cooke, N. E., Liebhaber, S. A., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **1994**, *91*, 10655-10659.
- [207] Schmeichel, K. L., Beckerle, M. C., *Cell*, **1994**, *79*, 211-219.
- [208] Ishimi, Y., Ichinose, S., Omori, A., Sato, K., Kimura, H., *Journal of Biological Chemistry*, **1996**, *271*, 24115-24122.
- [209] Burke, T. W., Cook, J. G., Asano, M., Nevins, J. R., *Journal of Biological Chemistry*, **2001**, *276*, 15397-15408.
- [210] Holland, L., Downey, M., Song, X. M., Gauthier, L., Bell-Rogers, P., Yankulov, K., *European Journal of Biochemistry*, **2002**, *269*, 5192-5202.
- [211] Groth, A., Corpet, A., Cook, A. J. L., Roche, D., Bartek, J., Lukas, J., Almuzni, G., *Science*, **2007**, *318*, 1928-1931.
- [212] Byrnes, J. J., Downey, K. M., Black, V. L., So, A. G., *Biochemistry*, **1976**, *15*, 2817-2823.
- [213] Lee, S. H., *Nucleic Acids Research*, **1993**, *21*, 1935-1939.
- [214] Albertson, T. M., Ogawa, M., Bugni, J. M., Hays, L. E., Chen, Y., Wang, Y. P., Treuting, P. M., Heddle, J. A., Goldsby, R. E., Preston, B. D., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **2009**, *106*, 17101-17104.
- [215] Sillje, H. H. W., Takahashi, K., Tanaka, K., Van Houwe, G., Nigg, E. A., *Embo Journal*, **1999**, *18*, 5691-5702.
- [216] Carrera, P., Moshkin, Y. M., Gronke, S., Sillje, H. H. W., Nigg, E. A., Jackle, H., Karch, F., *Genes & Development*, **2003**, *17*, 2578-2590.
- [217] Mousson, F., Ochsenbein, F., Mann, C., *Chromosoma*, **2007**, *116*, 79-93.
- [218] Pilyugin, M., Demmers, J., Verrijzer, C. P., Karch, F., Moshkin, Y. M., *PLoS One*, **2009**, *4*.
- [219] Han, Z. B., Riefler, G. M., Saam, J. R., Mango, S. E., Schumacher, J. M., *Current Biology*, **2005**, *15*, 894-904.
- [220] Li, Z., Gourguechon, S., Wang, C. C., *Journal of Cell Science*, **2007**, *120*, 3883-3894.
- [221] Kwok, R. P. S., Lundblad, J. R., Chrivia, J. C., Richards, J. P., Bachinger, H. P., Brennan, R. G., Roberts, S. G. E., Green, M. R., Goodman, R. H., *Nature*, **1994**, *370*, 223-226.
- [222] Montminy, M., *Annual Review of Biochemistry*, **1997**, *66*, 807-822.
- [223] Yuan, L. W., Gambee, J. E., *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research*, **2001**, *1541*, 161-169.
- [224] Labalette, C., Renard, C. A., Neuveut, C., Buendia, M. A., Wei, Y., *Molecular and Cellular Biology*, **2004**, *24*, 10689-10702.
- [225] Aguiar, R. C. T., Takeyama, K., He, C. Y., Kreinbrink, K., Shipp, M. A., *Journal of Biological Chemistry*, **2005**, *280*, 33756-33765.
- [226] Aguiar, R. C. T., Yakushijin, Y., Kharbanda, S., Salgia, R., Fletcher, J. A., Shipp, M. A., *Blood*, **2000**, *96*, 4328-4334.
- [227] Ame, J. C., Spenlehauer, C., de Murcia, G., *Bioessays*, **2004**, *26*, 882-893.
- [228] Abramson, J. S., Shipp, M. A., *Blood*, **2005**, *106*, 1164-1174.
- [229] Juszczynski, P., Kutok, J. L., Li, C., Mitra, J., Aguiar, R. C. T., Shipp, M. A., *Molecular and Cellular Biology*, **2006**, *26*, 5348-5359.

- [230] Yan, Q. S., Dutt, S., Xu, R., Graves, K., Juszczynski, P., Manis, J. P., Shipp, M. A., *Molecular Cell*, **2009**, 36, 110-120.
- [231] Takeyama, K., Aguiar, R. C. T., Gu, L. Q., He, C. Y., Freeman, G. J., Kutok, J. L., Aster, J. C., Shipp, M. A., *Journal of Biological Chemistry*, **2003**, 278, 21930-21937.
- [232] Di Paolo, G., De Camilli, P., *Nature*, **2006**, 443, 651-657.
- [233] Odorizzi, G., Babst, M., Emr, S. D., *Trends in Biochemical Sciences*, **2000**, 25, 229-235.
- [234] Martin, T. F. J., *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, **1998**, 14, 231-264.
- [235] Sbrissa, D., Ikononov, O. C., Fu, Z. Y., Ijuin, T., Gruenberg, J., Takenawa, T., Shisheva, A., *Journal of Biological Chemistry*, **2007**, 282, 23878-23891.
- [236] Sbrissa, D., Ikononov, O. C., Shisheva, A., *Journal of Biological Chemistry*, **2002**, 277, 6073-6079.
- [237] Ikononov, O. C., Sbrissa, D., Fligger, J., Delvecchio, K., Shisheva, A., *Journal of Biological Chemistry*, **2010**, 285, 26760-26764.
- [238] Jin, N., Chow, C. Y., Liu, L., Zolov, S. N., Bronson, R., Davisson, M., Petersen, J. L., Zhang, Y. L., Park, S., Duex, J. E., Goldowitz, D., Meisler, M. H., Weisman, L. S., *Embo Journal*, **2008**, 27, 3221-3234.
- [239] Zhang, Y., Zolov, S. N., Chow, C. Y., Slutsky, S. G., Richardson, S. C., Piper, R. C., Yang, B., Nau, J. J., Westric, R. J., Morrison, S. J., Meisler, M. H., Weisman, L. S., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **2007**, 104, 17518-17523.
- [240] Moffatt, B. A., Studier, F. W., *Cell*, **1987**, 49, 221-227.
- [241] Studier, F. W., *Journal of Molecular Biology*, **1991**, 219, 37-44.
- [242] Huang, J. B., Villemain, J., Padilla, R., Sousa, R., *Journal of Molecular Biology*, **1999**, 293, 457-475.
- [243] Zhang, X., Studier, F. W., *Journal of Molecular Biology*, **1997**, 269, 10-27.
- [244] Rosenfeld, J., Capdevielle, J., Guillemot, J. C., Ferrara, P., *Analytical Biochemistry*, **1992**, 203, 173-179.
- [245] Cox, J., Neuhauser, N., Michalski, A., Scheltema, R. A., Olsen, J. V., Mann, M., *Journal of Proteome Research*, **2011**, 10, 1794-1805.
- [246] Laemmli, U. K., *Nature*, **1970**, 227, 680-&.
- [247] Neuhoff, V., *Biological Chemistry Hoppe-Seyler*, **1990**, 371, A10-A11.
- [248] Todaro, G. J., Green, H., *Journal of Cell Biology*, **1963**, 17, 299-313.
- [249] Poveda, A., Pamblanco, M., Tafrov, S., Tordera, V., Sternglanz, R., Sendra, R., *Journal of Biological Chemistry*, **2004**, 279, 16033-16043.



# 7 ANHANG

## 7.1 Abkürzungsverzeichnis

3T3	Zellen der 3T3-Zelllinie
A	Absorption
Abb.	Abbildung
Abs <sub>max</sub>	Absorptionsmaximum
Acetyl-CoA	Acetyl-Coenzym A
ACN	Acetonitril
ADP	Adenosindiphosphat
AEBSF	4-(2-Aminoethyl)-benzensulfonylfluorid
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin ( <i>bovine serum albumin</i> )
CoA	Coenzym A
CM	Chloramphenicol
δ	Delta/Chemische Verschiebung
d	Schichtdicke
Da	Dalton
DCM	Dichlormethan
DE	Deutschland
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMEM	<i>dulbecco's modified eagle medium</i>
DMF	N,N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxynukleosidtriphosphate
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DTT	Dithiothreitol
ε	Extinktionskoeffizient
[E] <sub>0</sub>	Anfangsenzymkonzentration
[E] <sub>T</sub>	Totale Enzymkonzentration
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure

ESI	Elektrospray-Ionisation
ETBr	Ethidiumbromid
FBS	Fötales Kälberserum ( <i>fetal bovine serum</i> )
FDR	<i>false discovery rate</i>
Fmoc	Fluorenylmethoxycarbonyl
FP	Fluorezenzpolarisation
GSH	Glutathion
GST	Glutathion-S-Transferase
H	<i>heavy</i>
HBTU	2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumhexafluorophosphat
HeLa	Zellen der HeLa-Zelllinie
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
His	Histidin/"His-Tag"
HOBt	Hydroxybenzotriazole
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie ( <i>high pressure liquid chromatography</i> )
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
IEP	Isoelektrischer Punkt
IER	<i>immediate-early response</i>
<i>i.d.</i>	<i>inner diameter</i>
IPI	<i>international protein index</i>
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-Thiogalactopyranosid
Kan	Kanamycin
kb	Kilobase
Kd	Dissoziationskonstante
kDa	Kilodalton
$k_{\text{kat}}$	Katalytische Konstante
$K_{\text{M}}$	Michaeliskonstante
L	light
l	liquid
$\lambda$	Wellenlänge
LB	Luria/Miller <i>broth</i> -Medium
LC	Flüssigkeitschromatographie ( <i>liquid chromatography</i> )
LTQ	<i>linear trap quadrupole</i>
LxD	Länge mal Durchmesser
M	<i>Middle/Marker</i>
m/z	Masse durch Ladung
mA	Milliampere
MALDI	<i>matrix-assisted laser desorption/ionization</i>
mAU	<i>milli absorptions units</i>
MBP	Maltose-bindendes Protein
MCS	<i>multiple cloning site</i>

MESG	2-Amino-6-Mercapto-7-Methylpurin-Ribose
min	Minute/n
mm	Millimeter
MS	Massenspektrometrie/ massenspektrometrisch
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
MW	Molekulargewicht ( <i>molecular weight</i> )
MWCO	<i>molecular weight cut off</i>
NE	Nukleares Extrakt
ng	Nanogramm
NMM	N-Methylmorpholin
NMP	N-Methylpyrrolidon
NMR	Kernmagnetische Resonanz ( <i>nuclear magnetic resonanz</i> )
NTA	Nitrilotriessigsäure
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung ( <i>phosphate buffered saline</i> )
PCR	Polymerase-Kettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
PEP	<i>posterior error probability</i>
P <sub>i</sub>	Phosphat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
pNP	<i>para</i> -Nitrophenol
PNP	Purin-Nukleosid-Phosphorylase
pNPP	<i>para</i> -Nitrophenylphosphat
ppm	<i>parts per million</i>
PTM	Posttranslationale Modifikation(en)
PVDF	Polyvinylidenfluorid
R	organischer Rest
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
RT	Raumtemperatur
[S]	Substratkonzentration
s	Sekunde
S100	Cytosolisches Extrakt
SAH	S-Adenosylhomocystein
SAM	S-Adenosylmethionine
SDS	Natriumdodecylsulfat
SG	Schutzgruppe
SILAC	<i>stable isotope labeling by amino acids in cell culture</i>
SPPS	<i>solid phase peptide synthesis</i>
Std.	Stunde/n
t	Zeit

Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TEV	<i>Tobacco Etch Virus</i>
TFA	Trifluoressigsäure
TIPS	Triisopropylsilan
TOF	<i>time of flight</i>
$t_R$	Retentionszeit
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	<i>Units</i>
ÜN	über Nacht
UP	<i>Unique peptide(s)</i>
UV	Ultraviolett
v	Reaktionsgeschwindigkeit
V	Volt
$v_0$	Anfangsgeschwindigkeit
VF	Verdünnungsfaktor
Vis	Visueller Spektralbereich
$v_{max}$	Maximalgeschwindigkeit
Vol., v	Volumen
WB	Western Blot
yHAT1	Histonacetyltransferase 1 aus Hefe

## 7.2 Aminosäurensymbole

A	Ala	Alanin
C	Cys	Cystein
D	Asp	Asparaginsäure
E	Glu	Glutaminsäure
F	Phe	Phenylalanin
G	Gly	Glycin
H	His	Histidin
I	Ile	Isoleucin
K	Lys	Lysin
L	Leu	Leucin
M	Met	Methionin
N	Asn	Asparagin
P	Pro	Prolin
Q	Gln	Glutamin
R	Arg	Arginin
S	Ser	Serin

T	Thr	Threonin
V	Val	Valin
W	Trp	Tryptophan
Y	Tyr	Tyrosin

### 7.3 Modifizierte Aminosäuren

Kac	-	$\epsilon$ -N-Acetyllysin
Kme <sub>1-3</sub>	-	$\epsilon$ -N-(Mono/Di/Tri)-Methyllysin
Rac	-	$\omega$ -N-Acetylarginin
Rme	-	$\omega$ -N-Methylarginin
Rme <sub>2 sym</sub>	-	$\omega$ -N,N-Dimethylarginin
Rme <sub>2 asym</sub>	-	$\omega$ -N,N'-Dimethylarginin
pS	pSer	Phosphoserin
pT	pThr	Phosphothreonin

## 7.4 Western Blots

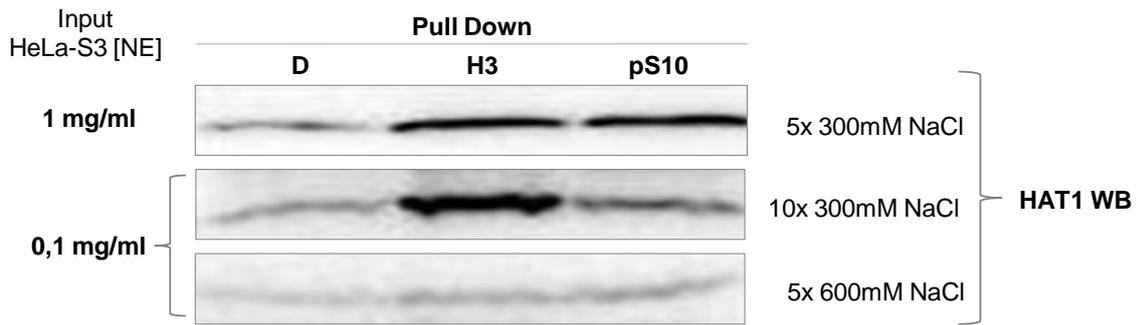


Abb. 80: Western Blot von HAT1-Pull Down unter verschiedenen Bedingungen

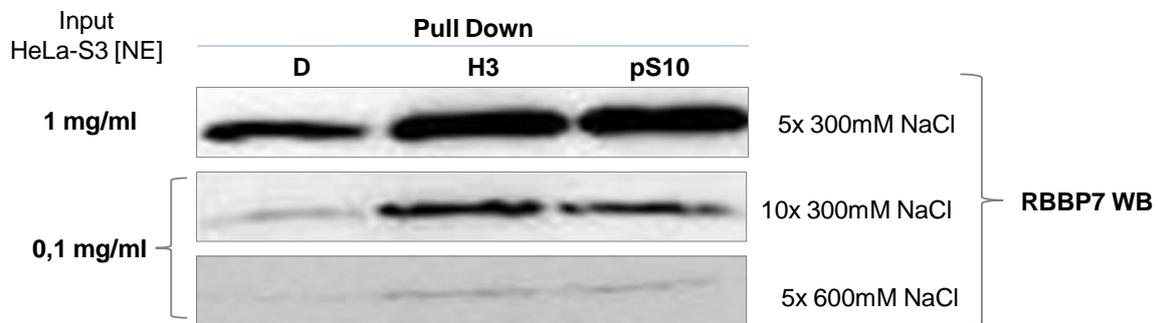


Abb. 81: Western Blot von RBBP7-Pull Down unter verschiedenen Bedingungen

## 7.5 MALDI-MS-Ergebnisse

	A	B	C	E	F	G	I	J	M	N
1	Table S1. 68,379 phosphopeptides were identified from 48 LC-MS/MS runs (12 SCX fractions each for G1 and M-phase cells, analyzed in duplicate) at a false discovery rate of 0.3%. A single peptide is shown for each unique site observed. Peptides harboring multiple phosphorylation sites may appear more than once. Peptide sequences show the phosphorylation site assignments returned by the Ascore algorithm. In some cases, these differ from those returned as the best match by SEQUEST which appear in the raw data.									
2	*Links to raw data fore each peptide can be accessed by clicking the site numbers.									
3	Green and red boxes indicate sites observed in G1 and M-phase samples respectively. The number of independent observations for each site is noted.									
4	IPI	Entrez	Protein Name	G	M	Site*	Score	Protein Description	Peptide	local 13
5947	IP100152692	92675	HARS2			197 <sup>21</sup>		histidyl-tRNA synthetase 2	SASS#GAEGDVSS#ERE	EDPSASSGAEGDV
5948	IP100152692	92675	HARS2			205 <sup>32</sup>		histidyl-tRNA synthetase 2	SASS#GAEGDVSS#ERE	AEGDVSSERE
5949	IP100024719	8520	HAT1	1	1	361 31		histone acetyltransferase 1	LIS#PYK	IKRRLISPYGGK
5950	IP100101048	26762	HAVCR1			228 <sup>14</sup>		hepatitis A virus cellular receptor 1	QNHFPVATS#PSSPQPAETHPTTLQGAIRR	HEPVAISPSSPQP
5951	IP100000541	10767	HBS1L			80 <sup>0</sup>		HBS1-like [S. cerevisiae]	GINYDEDFEDDDLYGQSVEDDYCISPST#AAQFIYSR	YCISPSTAAQFIY

Abb. 82: Ausschnitt aus der Tabelle gefundener mitotischer Phosphopeptide<sup>[197]</sup>

a) **Protein View**  
 Match to: **HAT1 MOUSE** Score: **3823**  
**Histone acetyltransferase type B catalytic subunit OS=Mus musculus GN=Hat1 PE=2 SV=1**  
 Found in search of M:\\$Orbitrap\2011\MS492\_HS360\MS492\_HS360\_H1p1.RAW  
Nominal mass (M<sub>r</sub>): 49247; Calculated pI value: 5.96  
 NCBI BLAST search of [HAT1 MOUSE](#) against nr  
 Unformatted [sequence string](#) for pasting into other applications  
 Taxonomy: [Mus musculus](#)  
 Variable modifications: Oxidation (M), PhosphoST (ST), Propionamide (C)  
 Cleavage by Trypsin/P: cuts C-term side of KR  
 Sequence Coverage: **86%**  
 Matched peptides shown in **Bold Red**

```

1  MAALEKFLVE YKSAVEKCLA EYKCNTNTAI ELKLVRFPE LENDIRTFPP
51  EYTHQLFGDD ETAFGYKGLK ILLYYIAGSL STLFVVEYSS KVDENFDCVE
101 ADDVEGKIRQ IIPPGFCTNT NDFLSLEKE TNFKPFGTLL HTYTVPSQTG
151 GETFTFQIHK ADMTCRGFRE YHERLQTFLM WFIETASFID VDDERWHYFL
201 VFEKYNKDG A TLFATVGYMT VYNYVYPDK TRPRVSQMLI LTPFQQQGHG
251 AQLLETVHRY YISFPTVLDI TAEDPSRSYL KLRDFVLVKF CQFLPSFSRE
301 RLLQGFSEDM AIQAQOMFKI NKQHARRVYE ILRLLVTMS DAEQYRSYRL
351 DIKRRLISPY KKQRDLAKM KKCLRPEELT NQMNQIEISV QHEQLEERFQ
401 ELVEDYRRVI ERLAQE
    
```

b)

Enzym	Start	End	Obs.	Mr(calc)	Miss	Sequence	Modification	Ions Score	
								Probe HAT1	Probe pHAT1
Trypsin	355	361	438.77	875.52	1	R.RLISPYK.K		51	44
	<b>355</b>	<b>361</b>	<b>478.75</b>	<b>955.49</b>	<b>1</b>	<b>R.<b>RLISPYK.K</b></b>	PhosphoST (ST)		<b>34</b>
	355	362	502.82	1003.62	2	R.RLISPYKK.K		32	28
	<b>355</b>	<b>362</b>	<b>362.20</b>	<b>1083.58</b>	<b>2</b>	<b>R.<b>RLISPYKK.K</b></b>	PhosphoST (ST)		<b>12</b>
	356	361	360.72	719.42	0	R.LISPYK.K		29	18
	<b>356</b>	<b>361</b>	<b>400.70</b>	<b>799.39</b>	<b>0</b>	<b>R.<b>LISPYK.K</b></b>	PhosphoST (ST)		<b>22</b>
	356	362	424.77	847.52	1	R.LISPYKK.K		44	39
AspN	<b>356</b>	<b>362</b>	<b>464.75</b>	<b>927.48</b>	<b>1</b>	<b>R.<b>LISPYKK.K</b></b>	PhosphoST (ST)		<b>29</b>
	351	365	643.73	1928.18	0	L.DIKRR <b>LISPYKKKQR</b> .D		30	40
	<b>351</b>	<b>365</b>	<b>670.39</b>	<b>2008.15</b>	<b>0</b>	<b>L.DIKRR<b>LISPYKKKQR</b>.D</b>	PhosphoST (ST)		<b>8</b>

Abb. 83: MS-Resultat a) HAT1-Sequenzabdeckung (rot) b) Gefundene HAT1 S358-Phosphopeptide (rot)

## 7.6 Coomassiegele

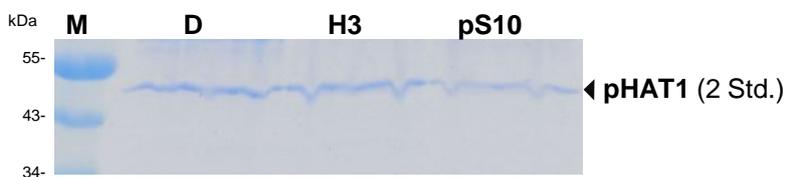


Abb. 84: Coomassiegel von pHAT1-Pull-Down (2Std. Kinasen-Umsatz)